

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



## **DOKTORSKÁ PRÁCE**

Studium interakce forkhead transkripčního faktoru FOXO4  
s DNA a s proteinem 14-3-3

**RNDr. Petr Vácha**

Školitel: Prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2015

Prohlašuji, že tuto disertační práci jsem vypracoval samostatně, že jsem řádně citoval veškeré použité zdroje a že tato práce nebyla použita k získání akademického titulu v jiné instituci.

Tímto prohlášením uděluji souhlas s uložením této práce v elektronické databázi systému mezi-univerzitního projektu Theses.cz za účelem neustálé kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Okrouhlu dne 8.6.2015

.....  
Petr Vácha

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl vyjádřit své díky zejména své manželce a oběma dcerám, bez jejichž podpory by sepsání této práce bylo absolutně nemyslitelné. Dále svým rodičům a nejbližším. V neposlední řadě bych rád poděkoval svému školiteli profesoru Tomáši Obšilovi za vedení během studia a též za jeho nekonečnou podporu, trpělivost a obětavost.

Tato práce vznikla na Přírodovědecké fakultě UK v Praze na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie a na oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu, Akademie věd České republiky, v.v.i. Práce se zakládá na studiích uveřejněných v následujících publikacích. Jejich kopie jsou součástí práce jako přílohy 1-3.

#### Publikace I.

**Vacha P.**, Zuskova I., Bumba L., Herman P., Vecer J., Obsilova V., Obsil T.: Detailed kinetic analysis of the interaction between the FOXO4-DNA-binding domain and DNA. *Biophys Chem.* (2013) **184**, 68-78.

Podíl: 70%.

V této studii jsem byl odpovědný za přípravu FOXO4-DBD WT a všech mutantních forem tohoto proteinu, ověření jejich konformace pomocí CD spektroskopie a přípravu vzorků pro SPR a fluorescenční měření.

#### Publikace II.

Silhan J, **Vacha P.**, Strnadova P, Vecer J, Herman P, Sulc M, Teisinger J, Obsilova V, Obsil T. 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *J Biol Chem.* (2009) **284**, 19349-60.

Podíl: 25%

V rámci této studie jsem byl odpovědný za přípravu proteinů FOXO4 a 14-3-3. Dále jsem se podílel na přípravě proteinů pro FRET experimenty.

#### Publikace III.

Veisova D, Macakova E, Rezabkova L, Sulc M, **Vacha P.**, Sychrova H, Obsil T, Obsilova V. Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochem J.* (2012) **443**, 663-70

Podíl: 10%

V rámci této studie jsem byl odpovědný za přípravu kvasničných forem proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2).

# Obsah

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>10</b>
<b>1 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>12</b>
1.1 ÚVOD.....	12
1.2 TRANSKRIPČNÍ FAKTORY A REGULACE TRANSKRIPCE .....	13
1.2.1 <i>Forkhead transkripční faktory</i> .....	15
1.2.2 <i>FOXO transkripční faktory</i> .....	19
1.2.3 <i>Struktura FOXO transkripčních faktorů</i> .....	21
1.2.4 <i>Regulace aktivity FOXO transkripčních faktorů</i> .....	21
1.2.5 <i>Vazba FOXO transkripčních faktorů na DNA</i> .....	22
1.2.6 <i>Transkripční faktor FOXO4</i> .....	23
1.3 PROTEINY 14-3-3 .....	24
1.3.1 <i>Struktura proteinů 14-3-3 a jejich protein-proteinové interakce</i> .....	26
1.3.2 <i>Funkce proteinů 14-3-3 v regulaci buněčného cyklu a při apoptotické signalizaci</i> .....	28
1.3.3 <i>Funkce proteinů 14-3-3 v signalizaci růstu</i> .....	31
1.3.4 <i>Funkce proteinů 14-3-3 při potlačování nádorového bujení</i> .....	33
1.3.5 <i>Proteiny 14-3-3 v nižších organismech</i> .....	33
1.3.6 <i>Způsob vazby proteinů 14-3-3 k jejich vazebným partnerům</i> .....	34
1.4 14-3-3ζ A FOXO4 .....	35
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>39</b>
3.1 SEZNAM LABORATORNÍHO MATERIÁLU, CHEMIKÁLIÍ A PŘÍSTROJŮ.....	39
3.1.1 <i>Laboratorní materiál</i> .....	39
3.1.2 <i>Chemikálie</i> .....	39
3.1.3 <i>Přístroje</i> .....	41
3.2 METODY .....	43
3.2.1 <i>Příprava experimentálního materiálu</i> .....	43
3.2.1.1 <i>Navržení pracovních konstruktů</i> .....	43
3.2.1.2 <i>Příprava pracovních konstruktů</i> .....	43
3.2.1.3 <i>Metoda PCR</i> .....	46
3.2.1.4 <i>Cílená bodová mutageneze pomocí PCR</i> .....	47
3.2.1.5 <i>Elektroforéza na TBE-agarózovém gelu</i> .....	48
3.2.1.6 <i>Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA</i> .....	49

3.2.1.7	Izolace plazmidové DNA .....	50
3.2.1.8	Expres pracovních konstruktů .....	51
3.2.1.9	Purifikace pracovních konstruktů .....	51
3.2.1.10	Fosforylace proteinů .....	58
3.2.1.11	Značení sondou 1,5-IAEDANS .....	58
3.2.1.12	Značení sondou 5-IAF .....	59
3.2.1.13	Měření koncentrace proteinů .....	59
3.2.1.14	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF .....	60
3.2.1.15	Expres a purifikace proteinových konstruktů FOXO4 <sub>11-213</sub> .....	60
3.2.1.16	Expres a purifikace proteinových konstruktů FOXO4 <sub>82-207</sub> .....	63
3.2.1.17	Expres a purifikace proteinových konstruktů 14-3-3ζ .....	66
3.2.2	<i>Experimentální metody</i> .....	69
3.2.2.1	Měření stacionární fluorescence .....	69
3.2.2.2	Měření časově rozlišené fluorescence .....	70
3.2.2.3	Metoda SPR .....	73
3.2.2.4	CD spektroskopie .....	74
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>75</b>
4.1	PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH KONSTRUKTŮ .....	75
4.1.1	<i>Příprava expresních vektorů a cílená bodová mutagenese</i> .....	75
4.1.2	<i>Purifikace proteinových konstruktů</i> .....	75
4.1.2.1	Purifikace proteinových konstruktů FOXO4 <sub>82-207</sub> .....	75
4.1.2.2	Purifikace proteinových konstruktů FOXO4 <sub>11-213</sub> .....	79
4.1.2.3	Purifikace proteinových konstruktů 14-3-3ζ .....	82
4.2	OVĚŘENÍ VLASTNOSTÍ PROTEINOVÝCH KONSTRUKTŮ FOXO4 .....	85
4.2.1	<i>Ověření strukturní integrity proteinových konstruktů FOXO4-DBD pomocí CD spektroskopie</i> .....	85
4.2.2	<i>Ověření vazebných vlastností proteinových konstruktů</i> .....	86
4.2.2.1	Ověření DNA vazebných vlastností konstruktů FOXO4 <sub>11-213</sub> .....	86
4.2.2.2	Ověření vazebných vlastností konstruktů FOXO4 <sub>11-213</sub> vzhledem k proteinu 14-3-3ζ .....	87
4.3	STUDIUM INTERAKCÍ FOXO4-DBD S PROTEINEM 14-3-3ζ .....	88
4.3.1	<i>Sledování změn v okolí místně definovaného fluoroforu</i> .....	88
4.3.1.1	Sledování časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS .....	88
4.3.1.2	Sledování časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS .....	91
4.3.1.3	Časově rozlišené dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence .....	93
4.3.1.4	Zhášení fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS ..	95
4.3.2	<i>Stanovení intermolekulárních vzdáleností v komplexu FOXO4-DBD: 14-3-3ζ metodou Försterova rezonančního přenosu energie</i> .....	96

4.4	STUDIUM MECHANISMU VAZBY FOXO4-DBD S DNA .....	97
4.4.1	<i>Studium kinetiky interakcí na DNA vazebném rozhraní FOXO4-DBD</i> .....	98
4.4.2	<i>Sledování vlivu délky injekce analytu na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA</i> .....	103
4.4.3	<i>Studium konformačních změn FOXO4-DBD při vazbě na DNA</i> .....	104
<b>5</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>106</b>
5.1	STUDIUM MOLEKULÁRNÍHO MECHANISMU INTERAKCÍ FOXO4-DBD S PROTEINEM 14-3-3ζ .....	106
5.2	STUDIUM KINETIKY INTERAKCE FOXO4-DBD S DNA.....	108
5.3	STUDIUM KONFORMAČNÍCH ZMĚN FOXO4-DBD PŘI VAZBĚ NA DNA.....	109
5.4	DETAILNÍ ANALÝZA DNA VAZEBNÉHO ROZHŘANÍ FOXO4-DBD .....	110
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>120</b>
	PŘÍLOHA 1 - VÁCHA P ET AL., 2013 .....	120
	PŘÍLOHA 2 - ŠILHÁN H ET AL., 2009.....	131
	PŘÍLOHA 3 - VEISOVÁ D ET AL., 2012 .....	143
	PŘÍLOHA 4 - PRIMÁRNÍ SEKVENCE PRACOVNÍCH KONSTRUKTŮ VE FORMÁTU FASTA151	
	PŘÍLOHA 5 - BAKTERIÁLNÍ EXPRESNÍ VEKTORY .....	152

## Abstrakt

Tato doktorská práce se zabývá studiem interakcí lidského forkhead transkripčního faktoru FOXO4 s DNA a s regulačním proteinem 14-3-3. Hlavním cílem této práce byla detailní charakterizace interakce DNA-vazebné domény proteinu FOXO4 se dvěma kanonickými sekvencemi DNA a dále objasnění úlohy proteinu 14-3-3 v procesu regulace funkce FOXO4.

Transkripční faktory FOXO jsou účinnými aktivátory transkripce genů, čímž ovlivňují celou řadu buněčných procesů. Protein FOXO4 patří do rodiny forkhead transkripčních faktorů, což je skupina několika desítek proteinů, jejichž společným znakem je velmi konzervovaná DNA-vazebná doména. Podstata DNA-vazebné specifity těchto proteinů, tedy co přesně determinuje drobné odlišnosti ve vazebných vlastnostech jednotlivých forkhead proteinů, je i přes množství dostupných strukturních dat stále nejasné. Proto byla provedena detailní charakterizace interakcí mezi DNA-vazebnou doménou proteinu FOXO4 a DNA pomocí rezonance povrchového plazmonu (SPR) a časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie. Výsledky této práce umožnily objasnit kinetický model vazby FOXO4 na DNA, charakterizovat konformační změnu FOXO4 při tvorbě komplexu s DNA a zároveň i vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků na stabilitu komplexu FOXO4 s DNA.

Funkce proteinu FOXO4 je regulována prostřednictvím fosforylace a vazby proteinu 14-3-3, který je svým charakterem regulátorem mnoha buněčných procesů. Detailní mechanismus této regulace je však stále nejasný. Protein 14-3-3 ovlivňuje transkripční faktory FOXO hned dvojím způsobem. Prostřednictvím přímé vazby na transkripční faktor FOXO dochází jednak k inhibici vazby FOXO na DNA a dále je touto interakcí překryta jaderná lokalizační sekvence (NLS), což brání transportu FOXO proteinů do jádra. Ke studiu interakce těchto dvou vazebných partnerů bylo použito rovněž metod fluorescenční spektroskopie. Pomocí časově rozlišené fluorescence přirozených či introdukovaných fluorescenčních sond bylo prokázáno, že při navázání proteinu 14-3-3 dochází k ovlivnění několika částí DNA vazebného rozhraní FOXO4. Získané výsledky poukazují na to, že změny ve studovaných oblastech se dějí na základě přímého kontaktu struktur těchto dvou vazebných partnerů. Pro efektivní popis sledovaných změn jsme navrhli realistický strukturní model komplexu FOXO4:14-3-3 na základě šesti intermolekulárních vzdáleností získaných pomocí Försterova rezonančního přenosu energie. Tento model jasně ukazuje, že FOXO4 je umístěn hluboko uvnitř centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3 a jeho DNA vazebné rozhraní je touto interakcí blokováno.



## **Abstract**

This doctoral thesis deals with the interaction of human forkhead transcription factor FOXO4 with DNA and regulating 14-3-3 protein respectively. The main aim of this work was detailed characterization of interaction between DNA binding domain of protein FOXO4 with two canonical DNA sequences and further clarifying the role of the 14-3-3 protein in the regulation of activity of protein FOXO4.

FOXO transcription factors are potent activators of the transcription of genes, which affect a variety of cellular processes. FOXO4 protein belongs to the family of forkhead transcription factor, which is a group of several tens of proteins, whose common feature is a highly conserved DNA-binding domain. Summary of the DNA binding specificity of these proteins, namely what precisely determines the small differences in the binding properties of individual forkhead proteins, despite the large amount of available structural data remains still unclear. Therefore, detailed characterization of interactions between DNA binding domain of the protein FOXO4 and DNA using surface plasmon resonance (SPR) and time-resolved fluorescence spectroscopy was performed. The results of this study allowed to clarify the kinetic model of FOXO4 binding to DNA as well as characterize both the conformational change of FOXO4 upon its binding to the target DNA and the importance of particular amino acid residues on the stability of the complex between FOXO4 and DNA.

The transcriptional function of FOXO4 is regulated by phosphorylation and binding of the 14-3-3 protein, which is by its nature regulator of many cellular processes. The mechanism of this regulation is still unclear. The 14-3-3 protein affects FOXO transcription factors in two ways. The complex formation inhibits FOXO4 binding to the target DNA and masks nuclear localization sequence (NLS), which consequently blocks the transport of FOXO proteins into the nucleus. Methods of fluorescence spectroscopy were used to study the interaction of these two binding partners. Time-resolved fluorescence of intrinsic as well as extrinsic fluorophores was used to show that the binding of the 14-3-3 protein affects multiple regions of the DNA binding interface of FOXO4. The results suggest that observed changes are induced by direct protein-protein interactions of these two binding partners. In addition, to better describe the interaction between these two proteins, a realistic structural model of the FOXO4:14-3-3 complex was constructed using six intermolecular distances obtained from Förster resonance energy transfer measurements. This model shows clearly that FOXO4 is located deep inside the central channel of the dimer of the 14-3-3 protein and its DNA binding interface is blocked by this interaction.

## Seznam použitých zkratek

A;C;T;G	báze DNA - adenin, cytosin, thymin a guanin
AA	zkratka pro aminokyselinu
ATP	adenosin trifosfát
AU	jednotky absorbance
CD	cirkulární dichroismus
dATP	deoxy adenosin trifosfát
DBD	DNA vazebná doména
dCTP	deoxy cytosin trifosfát
dGTP	deoxy guanosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNBE	sekvence DNA známá jako motiv vázající členy rodiny proteinů Daf-16
DTT	1,4-dithiothreitol
dTTP	deoxy thymidin trifosfát
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
et al.	latinská zkratka "et alii", odpovídající českému "a kolektiv"
FOX	transkripční faktor z rodiny "forkhead box"
FOXA	transkripční faktor z rodiny "forkhead box", třída A
FOXX	transkripční faktor z rodiny "forkhead box", třída K
FOXO	transkripční faktor z rodiny "forkhead box", třída O
FOXO	forkhead transkripční faktor
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
G1	přípravná fáze buněčného cyklu
GST	Glutathion-S-transferasa
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
IRE	sekvence DNA známá jako "insulin-responsive element"
Ka	asociační konstanta
Kd	disociační konstanta
LB	Luria Bertani médium
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s použitím ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) a detektorem doby letu (TOF)
MLL	mixed-lineage leukemia
mRNA	"messenger" ribonukleová kyselina
MWCO	parametr propustnosti dializační membrány z anglického "Molecular Weight Cut Off"
NES	jaderná exportní sekvence
NLS	jaderná lokalizační sekvence
Obr.	Obrázek

OD	optická denzita
PBS	fosfátový pufr se solí
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDB	datová banka proteinů
pET-15b	označení vektorů
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid (inhibitor serinových proteas)
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
RU	jednotky signálu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	vertikální akrylamidová elektroforéza v redukujícím prostředí dodecylsírane sodného
SPR	metoda rezonance povrchového plazmonu
SVD-MEM	metodou maximální entropie
TA	transaktivační doména
TBE	pufr obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSCP	metoda "Počítání fotonů"
WT	nativní forma rekombinantního proteinu (z angl. "Wilde-type")

# 1 Literární přehled

## 1.1 Úvod

Předmětem této doktorské práce, respektive výzkumu, který dal podnět a podklad k sepsání a uveřejnění vědeckých článků je trojice nitrobuněčných objektů eukaryotických buněk. Jsou jimi proteiny s názvy FOXO4 a 14-3-3 a molekula chromozomální DNA. Tyto tři objekty spolu vytváří soustavu navzájem se ovlivňujících elementů. Hlavním tématem tohoto výzkumu je objasnění molekulárních mechanismů interakce těchto objektů. Každý z těchto objektů představuje zástupce skupiny nitrobuněčných elementů s určitou funkcí.

Protein FOXO4 je zástupcem proteinů označovaných též jako transkripčních faktory. Tyto proteiny stojící na samém konci signálních drah, vytváří přímé kontakty s chromozomální DNA v jádře buňky a aktivují transkripci genů.

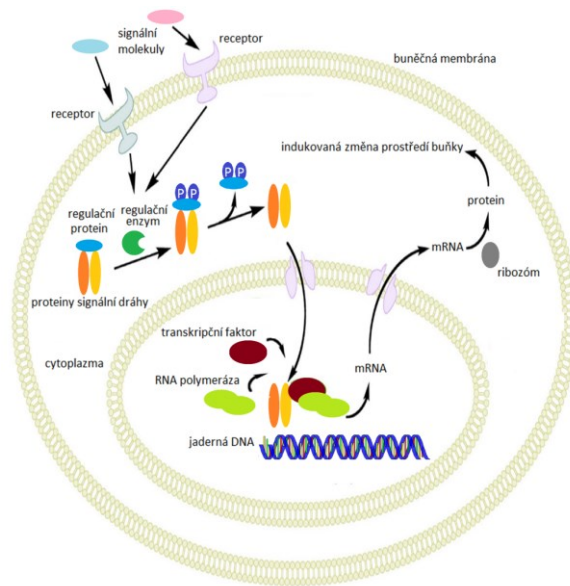
Protein 14-3-3 je proteinem, který se, do značné míry univerzálním způsobem, podílí na regulaci celé řady signálních drah, čímž ovlivňuje mnoho různých buněčných procesů.

Molekulou DNA v této studii je jaderná chromozomální DNA, nositel veškeré dědičné informace, potřebné k řízení všech buněčných procesů.

Řízení eukaryotické buňky by se dalo zjednodušeně popsat jako následující proces. Buňka pomocí receptorů na svém povrchu (proteinů na vnější straně cytoplazmatické membrány), které jsou v přímém kontaktu s okolím, zachytí signál v podobě chemické sloučeniny (od nejjednodušších anorganických sloučenin, přes složitější organické struktury až po hormony, protilátky, či jiné chemické sloučeniny), či v některých případech nechá proniknout signální molekulu k receptorům uvnitř buňky. Signál může přijít také zevnitř buňky, protože buňka monitoruje též své vnitřní prostředí a reaguje na jeho změny. Tyto změny mohou být způsobeny například činností různých enzymů, či transkripční aktivitou jádra. Ve všech případech dojde k ovlivnění signálních drah na různých úrovních a tím k regulaci transkripční aktivity jádra (tedy k produkci různých proteinů). Tento proces je schematicky zachycen na obrázku 1.

Signální dráhy jsou až na některé možné mezistupně tvořeny proteiny a proteiny jsou také regulovány. Přenos signálu a regulace může probíhat pomocí přímé interakce proteinů, nebo například přes produkty enzymových reakcí.

Studium signálních drah, identifikace jednotlivých mediátorů a modulátorů signálu a přesný popis molekulárních mechanismů jejich interakce je nezbytný pro porozumění činnosti buňky. Takové poznatky mohou odhalit příčiny závažných onemocnění a pomoci při hledání a přípravě terapeuticky účinných látek.



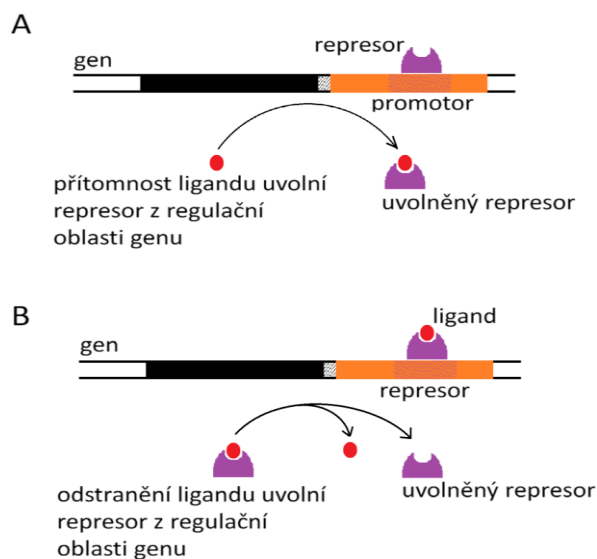
**Obr. 1 Přenos signálu v eukaryotické buňce a reakce na signály vnějšího prostředí buňky.** Signální molekuly z vnějšího prostředí buňky jsou rozpoznány receptory na povrchu buňky. Signál je přenesen do vnitřního prostředí buňky a regulovanou signální drahou přenesen do jádra. V jádře se utvoří odpověď na signál v podobě exprese genu a vzniku mRNA. Molekula mRNA je transportována vně jádra, kde se na ribozomu tvoří protein. Tím je celkově dosaženo indukované změny vnitřního prostředí buňky, jakožto reakce na signál (upraveno podle Clark C, 2011).

## 1.2 Transkripční faktory a regulace transkripce

Proteiny zvané transkripční faktory spolu s RNA polymerasami tvoří základní transkripční aparát. Iniciaci transkripce v eukaryotické buňce vyžaduje řadu transkripčních faktorů, které se zapojí do procesu iniciace transkripce v přesně definovaném sledu a zcela specifickými vazebnými interakcemi. Pouze při přesném vyladění systému může dojít k zahájení aktivity RNA polymerasy a přepisu genetické informace z kódu DNA do kódu RNA a k syntéze mRNA ("messenger RNA"). Tento moment je zároveň nejvhodnějším místem k regulaci celého řízení buňky, neboť zde se utváří odpověď na signály z vnitřního i z vnějšího prostředí buňky.

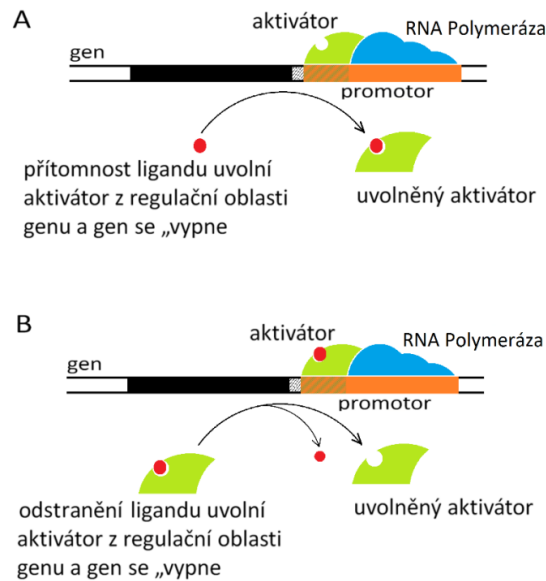
Regulace transkripce představuje jinými slovy regulaci vlastního vyjádření genů, neboli exprese genů, v podobě vzniku určitého proteinu. Způsobů regulace exprese genů přímo v jádře je celá řada, všechny však fungují na principu soutěže o konkrétní vazebné místo v sekvenci DNA, či vytváření vhodných podmínek k vazbě klíčového faktoru pomocí dalších vazebných prvků. Tyto sekvence, které jsou rozhodující pro iniciaci a regulaci transkripce se nachází ještě před samotnou sekvencí strukturního, či funkčního genu, tedy proti směru transkripce. Zjednodušeně řečeno se jedná o sekvence s pozitivním

účinkem ve prospěch transkripce, enhancer a promotor, a sekvence s negativním účinkem ve prospěch transkripce - represor (Obr 2. A). Druhý případ regulace bychom mohli nazvat regulací negativní, kdy v místě pro represor je navázán faktor, či element, který brání navázání transkripčně pozitivních elementů a snižuje pravděpodobnost exprese genu, nebo ji zcela blokuje (Obr 2. B). V tom případě je potřeba specifického faktoru, který tuto překážku odstraní a vytvoří podmínky vhodné pro iniciaci transkripce nebo pro další pozitivní regulaci.



**Obr. 2 Negativní regulace transkripce.** A) Negativní transkripční faktor - represor je navázán v regulační oblasti genu - promotoru a brání nasednutí aktivačních transkripčních faktorů a RNA polymerase, dokud nejsou jeho vazebné vlastnosti vzhledem k DNA negativně pozměněny navázáním ligandu a vazebné místo neuvolní. B) Negativní transkripční faktor - represor je navázán v regulační oblasti genu - promotoru a brání nasednutí aktivačních transkripčních faktorů a RNA polymerase, dokud nejsou jeho vazebné vlastnosti vzhledem k DNA negativně pozměněny odstraněním ligandu a vazebné místo se neuvolní (upraveno podle Reece JR et al., 2010).

V případě pozitivní regulace (Obr. 3), "čekají" vazebná místa promotoru, až budou obsazena patřičnými transkripčními faktory, které vytvoří vhodné prostředí pro nasednutí RNA polymerasy a spuštění transkripce. Tento proces může být zvýhodněn transkripčními faktory v oblasti enhanceru, které mohou vytvářet termodynamicky výhodnější okolí pro další transkripční faktory v oblasti promotoru a mohou tak zesílit transkripci genu. Celý komplex pak může být poměrně složitý, což jenom svědčí o důsledné kontrole regulace exprese.



**Obr. 3 Pozitivní regulace transkripce.** *A) Pozitivní transkripční faktor - aktivátor je navázán v regulační oblasti genu - promotoru a napomáhá nasednutí aktivačních transkripčních faktorů a RNA polymerase, dokud nejsou jeho vazebné vlastnosti vzhledem k DNA negativně pozměněny navázáním ligandu a nedojde k jeho uvolnění. B) Pozitivní transkripční faktor - aktivátor je navázán v regulační oblasti genu - promotoru a napomáhá nasednutí aktivačních transkripčních faktorů a RNA polymerase, dokud nejsou jeho vazebné vlastnosti vzhledem k DNA negativně pozměněny odstraněním ligandu a nedojde k jeho uvolnění (upraveno podle Reece JR et al., 2010).*

### 1.2.1 Forkhead transkripční faktory

Transkripční faktory s označením "forkhead-box" (FOX) jsou skupinou proteinů, které se strukturně i funkčně vymezují v rozsáhlém spektru eukaryotických transkripčních faktorů. Jejich název je odvozen z označení genu oblíbeného modelového organismu, mušky octomilky (*Drosophila melanogaster*), který je důležitý pro vývoj přední a zadní části střeva embrya drozofily, přesněji řečeno, za správné zformování tvaru střeva. (Weigel D et al., 1989). Všechny FOX proteiny vykazují vysoký stupeň identity aminokyselinové sekvence v jejich "forkhead" DNA vazebné doméně (DBD) a vytváří uzavřenou rodinu proteinů v nadskupině proteinů s "okřídlenými" helixy, které se vyskytují v prokaryotických i eukaryotických buňkách (Clark KL et al., 1993; Gajiwala KS et al., 2000). Jako první však byly tyto proteiny identifikovány u člověka a to v přeuspořádaných chromosomech určitých typů nádorů (Galili N et al., 1993; Davis RJ et al., 1994; Parry P et al., 1994; Borkhardt A et al., 1997; Hillion J et al., 1997; Anderson MJ et al., 1998).

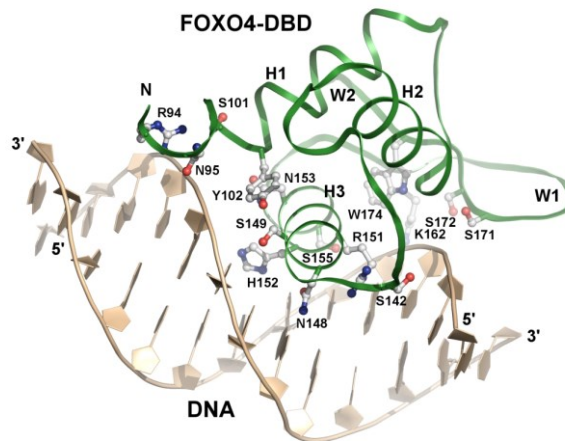
Impulzem pro bližší studium těchto transkripčních faktorů se stala skutečnost, že jsou velmi silnými aktivátory transkripce, které se podílí na celé řadě významných a pro řízení buňky zcela zásadních procesů. Mezi procesy, které jsou ovlivňovány "forkhead" transkripčními faktory patří například: energetický metabolismus, opravy poškozené DNA, reakce na stres, dělení buňky, diferenciaci, apoptóza, řízení buněčného cyklu a další.

Rodina FOX proteinů zahrnuje více než 100 známých transkripčních faktorů, které jsou dále děleny do 17 podtříd (podtřída A až podtřída Q). Všechny tyto proteiny obsahují vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménu (DNA binding domain = DBD), známou též jako tzv. "forkhead box", odtud zkratka FOX, nebo jako doménu okřídleného helixu (winged-helix domain). Tato doména, stejně jako její vazebné motivy vykazuje vysokou konzervovanost, což dává této interakci vysoký stupeň specifity a možnosti jemné regulace genů vázaných na interakci s FOX proteiny. DBD FOX proteinů obsahuje přibližně 110 aminokyselin dlouhou sekvenci tvořenou několika alfa-helixy, několika beta-skládanými listy a dvěma flexibilními raménky zvanými křídla (Weigel D et al., 1990; Kaestner KH et al., 2000; Mazet F et al., 2003). Nejdůležitější částí této domény je  $\alpha$ -helix H3, který se váže do velkého žlábků DNA zhruba kolmo na osu DNA a tím poskytuje hlavní plochu kontaktu s požadovaným motivem. Další kontakty s molekulou DNA jsou zajištěny prostřednictvím dalších aminokyselinových zbytků v jiných částech domény, kterými jsou: N-terminální část,  $\alpha$  helixy H1 a H2 a obě flexibilní smyčky, zvané křídla W1 a W2. Vyřešení struktury FOXO-DBD ukázalo, že tento N-terminální segment, smyčky W1 a W2 jsou v nepřítomnosti DNA vazebného motivu vysoce flexibilní (Weigelt J et al., 2001; Wang F et al., 2008). Speciálně smyčka W2 je velice důležitá pro afinitu FOXO-DBD a DNA, ačkoli i v přítomnosti DNA je velmi flexibilní a spíše neuspořádaná. Další studie ukázaly, že smyčka mezi helixy H1 a H2, která ve volném stavu zaujímá helikální konformaci, tak při vazbě FOXO-DBD na DNA je spíše nestrukturovaná (Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2007). To vše ukazuje na skutečnost, že FOXO-DBD prodělává strukturní proměny během vazby na DNA.

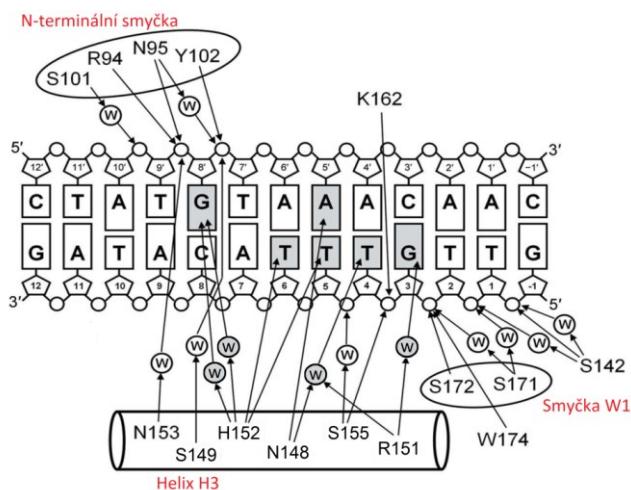
Celkový tvar DNA vazebné "forkhead" domény způsobuje těsnou vazbou do velkého žlábků DNA výrazné ohnutí molekuly DNA (Clark KL et al., 1993) (Obr. 4).

Specifičnost vazby na konkrétní místo v sekvenci DNA je zajištěna jednak rozpoznáváním tzv. klíčové sekvence ("core sequence") 5'-(A/C)AA(C/T)A-3', která je vysoce konzervovaná napříč všemi FOX proteiny a dále jemným doladěním vazby pomocí interakce okolních sekvencí DNA s dalšími segmenty DNA vazebné domény FOX proteinů. Tato sekvence je rozpoznávána pomocí kombinace přímých kontaktů s bázemi DNA a vodných můstků s postranními řetězci bází DNA (Weigel D et al., 1990; Clark KL et al., 1993) (Obr. 5).



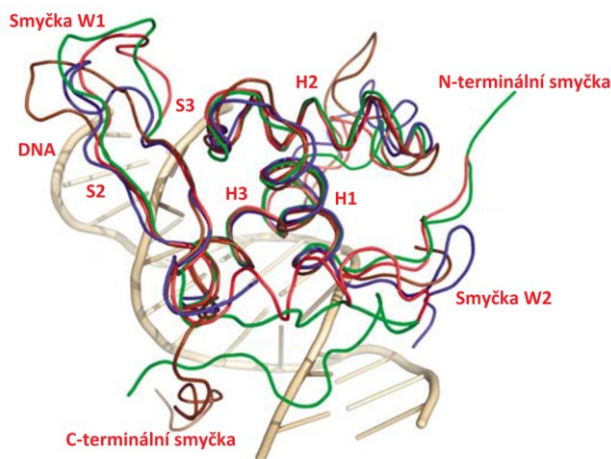


**Obr. 4 DNA Vazební doména transkripčního faktoru FOXO4 v komplexu s DNA (FOXO4-DBD:DNA).** Grafický model komplexu DNA vazební domény transkripčního faktoru FOXO4 s DNA (FOXO4-DBD:DNA) schematicky znázorňuje vzájemnou polohu jednotlivých částí této domény,  $\alpha$  helixů H1, H2, H3, smyček W1 a W2 zvaných křídla sekvencně umístěných blíže C-terminálnímu konci a dále vzájemnou polohu DNA vazební domény a molekuly DNA, kdy se  $\alpha$  helix H3 váže téměř kolmo do velkého žlábků DNA a flexibilní N-terminální část a smyčky W1 a W2 se přibližují dalším úsekům DNA mimo hlavní vazebnou oblast (Vacha et al., 2013).



**Obr. 5 Přehled interakcí DNA vazebného rozhraní FOXO s klíčovou vazebnou sekvencí ("core sequence") DNA.** Transkripční faktory FOXO rozpoznávají specifickou sekvenci DNA pomocí kombinace přímých kontaktů aminokyselinových zbytků s bázemi či sacharidovou kostrou DNA (například Arg94, Asp95 a 153, His152) a interakcí přes vodné můstky (například Ser101, Tyr102, Trp174 atd.) Na obrázku jsou interakce uspořádány do skupin dle jednotlivých domén FOXO proteinu. (upraveno dle Boura E et al., 2010).

Různé FOX proteiny rozpoznávají různé sekvence přiléhající ke klíčovému motivu. Tyto rozdíly mohou vznikat ze strukturní variability (viz Obr. 6) ve flexibilních oblastech "forkhead" DNA vazebné domény (FOX-DBD) napříč celou podtřídou FOX proteinů. Mechanismus tohoto rozpoznávání není zatím zcela objasněn (Gajiwala KS *et al.*, 2000; Obsil T *et al.*, 2008; Obsil T *et al.*, 2011).



**Obr. 6 Strukturní variabilita FOX proteinů v oblasti flexibilních smyček W1 a W2.** Znárodnění strukturní variability proteinů v oblasti flexibilních smyček W1 a W2 překrytím struktury FOXO4-DBD strukturami FOXO3a-DBD (Tsai *et al.*, 2007), FOXK1a DBD (Tsai *et al.*, 2006) a FOXA3-DBD (Clark KL *et al.*, 1993). Pozice DNA je použita ze struktury FOXO3a-DBD:DNA komplexu. FOXO4 je znázorněn modře, FOXO3a hnědě, FOXK1a červeně a FOXA3 zeleně (upraveno dle Obsil T *et al.*, 2008).

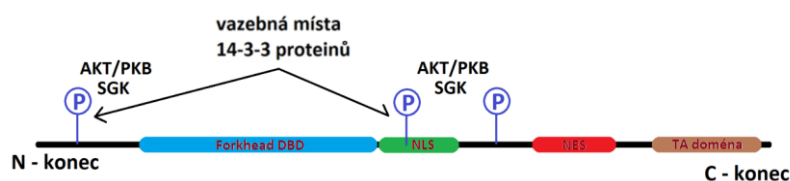
Jeden z možných mechanismů rozpoznání vazebné sekvence ve struktuře DNA FOX proteiny předpokládá, že aminokyselinové zbytky předcházející helixu H3 (aminokyselinové zbytky z oblasti mezi helixy H2 a H3), jež se neúčastní báze-specifické vazby přímo, ovlivňují DNA vazebnou specifitu "forkhead" domény pravděpodobně ovlivněním změny pozice rozpoznávacího helixu H3 (Obsil T *et al.*, 2011; Pierrou S *et al.*, 1994). Ohledně vlivu flexibilních smyček W1 a W2, bylo provedeno několik studií, které uvádějí, že tyto oblasti, jejichž pozice jsou upravovány vzhledem k pozici DNA rozpoznávacího helixu H3, také mají podstatný význam pro specifčnost a těsnost vazby mezi FOX proteiny a DNA (Pierrou S *et al.*, 1994; Shiyanova T *et al.*, 1999; van Dongen MJ *et al.*, 2000).

## 1.2.2 FOXO transkripční faktory

FOXO transkripční faktory jsou proteiny z podtřídy "O" tzv. FOX transkripčních faktorů. Jejich obecná specifikace v rámci buněčných proteinů splňuje vymezení, které jsem uvedl v předchozím oddíle, tedy, že se jedná o velmi účinné aktivátory transkripce s typickou "forkhead" DNA vazebnou doménou, které se podílejí na řízení mnoha klíčových biologických buněčných procesech. Proto je funkce těchto proteinů velmi úzce kontrolována řadou protein-proteinových interakcí a posttranslačních modifikací jako je fosforylace, acetylace či ubiquitinace. Přesné mechanismy této kontroly FOXO proteinů jsou však většinou zatím neobjasněné. Ovšem vzhledem k zásadní roli FOXO proteinů v regulaci mnoha buněčných procesů, by mohla artificiální modulace DNA vazebných vlastností představovat možné terapeutické využití a proto si studium interakcí a mechanismů interakcí zaslouží detailní pozornost.

Podtřída "O" FOX transkripčních faktorů zná do dnešního dne čtyři členy této skupiny a těmi jsou: FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. Tyto proteiny jsou ekvivalentem obratlovců pro transkripční faktor DAF-16 nižších forem živočichů a představují důležitý prvek vysoce konzervované signální dráhy, jež spojuje receptory signálů stresu a růstu s transkripční kontrolou v samotném jádře buňky (Lin K et al., 1997; Ogg S et al., 1997).

Molekuly FOXO proteinů se skládají ze čtyř domén. Jsou to za prvé vysoce konzervovaná "forkhead" DBD doména, dále jaderná lokalizační doména (NLS) umístěná od DBD dále směrem k C-konci a jaderná exportní sekvence (NES), umístěná ještě dále směrem k C-konci a C-terminální transaktivační doména. Schématické uspořádání primární struktury FOXO proteinů je znázorněno na následujícím obrázku (Obr. 7).

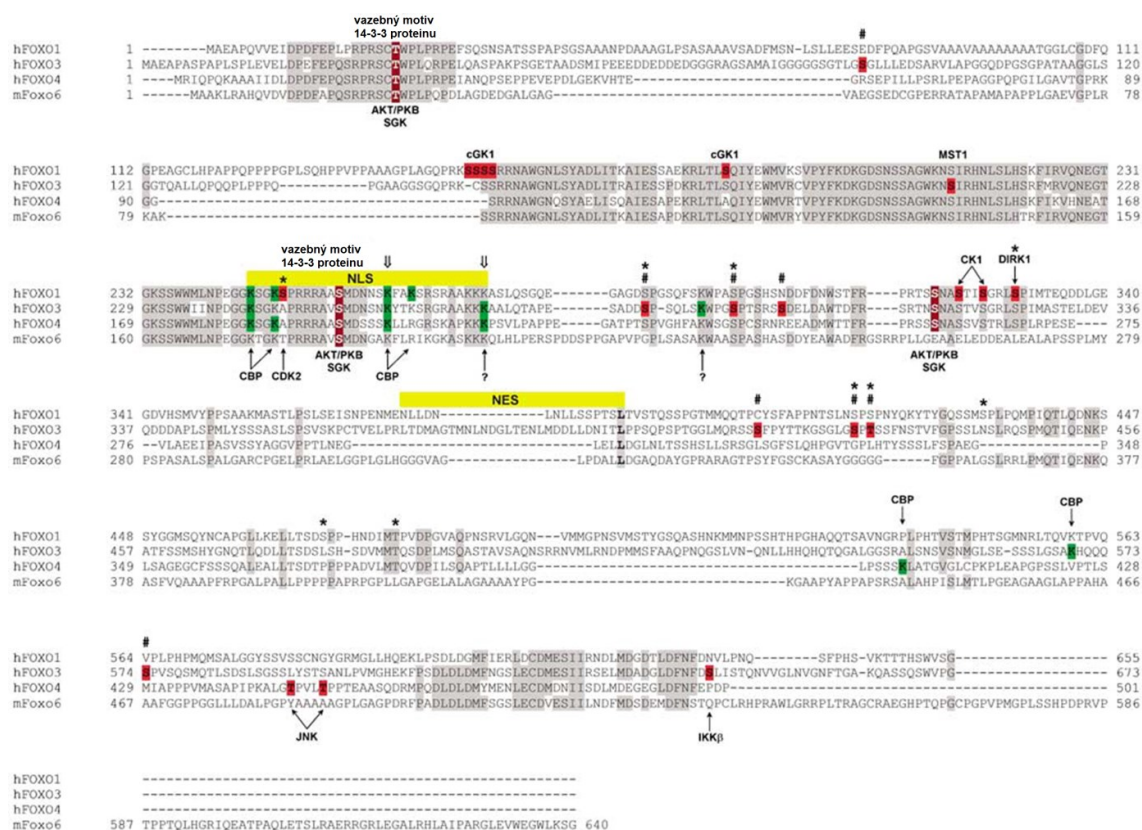


**Obr. 7 Schématické uspořádání primární struktury FOXO proteinu.** *Ve struktuře FOXO proteinu lze identifikovat několik funkčně zcela zásadních oblastí a míst. Jednak jsou to tři fosforylační místa pro AKT/PKB kinasu a SGK kinasu, dále vazebná místa pro proteiny 14-3-3, jadernou lokalizační sekvenci (NLS), jadernou exportní sekvenci (NES), DNA vazebnou doménu (DBD) a transaktivační doménu (TA). (upraveno dle Obsil T et al., 2008)*

Trojice proteinů FOXO1, FOXO3 a FOXO6 má podobnou délku, přibližně 650 aminokyselin, zatímco sekvence FOXO4 je kratší a obsahuje pouze okolo 500

aminokyselin. Avšak analýza několika násobného porovnání sekvencí těchto proteinů (Obr. 8) ukazuje, že několik oblastí FOXO proteinů je vysoce konzervovaných (Obsil T et al., 2008).

Oblast s nejvyšší sekvencí podobností zahrnuje N-terminální oblast okolo prvního AKT/PKB proteinkinasového (PKB) fosforylačního místa, "forkhead" DBD, oblast obsahující NLS a část C-terminální transaktivační domény.



**Obr. 8** Vzájemné porovnání sekvencí FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. Grafické porovnání sekvencí transkripčních faktorů FOXO1, FOXO2, FOXO3 a FOXO4 ukazuje, že velké množství funkčních úseků je konzervovaných. Aminokyseliny, které jsou konzervované alespoň ve třech sekvencích, jsou vyznačena šedě. Hnědě jsou vyznačena místa pro fosforylaci PKB (AKT/proteinkinasa B) a SGK (sérem a glukokortikoidy indukovaná kinasa). Červeně místa pro fosforylaci jinou než AKT/PKB a SGK a zeleně acetylační místa. Symbolem (↓) jsou označena místa pro monoubiquitinaci. Žlutě jsou vyznačeny oblasti jaderné lokalizační (NLS) a jaderné exportní (NES) sekvence. Otazník označuje cílová místa neznámých acetylačních enzymů, symbol (#) vyznačuje fosforylační místa aktivovaná při oxidativní stresu (Brunet et al., 2004) a symbol (\*) označuje místa fosforylovaná kinasami ERK (mitogenem aktivovaná kinasa) a p38 (Asada et al., 2007). Další fosforylační místa jsou označena zkratkou patřičného enzymu (upraveno dle Obsil T et al., 2008).

### 1.2.3 Struktura FOXO transkripčních faktorů

Strukturní studie FOX proteinů začaly vyřešením krystalové struktury komplexu DNA vazebné domény proteinu FOXA3(HNF-3gama):NA (Clark KL et al., 1993). FOXA3 je specifický protein nacházející se v játrech, kde hraje důležitou roli v buněčné diferenciaci a tkáňově specifické genové expresi (Clark KL et al., 1993). Jeho struktura ukázala, že motiv tzv. forkhead/okřídleného helixu je kompaktní strukturou obsahující okolo 110 aminokyselin, které se uspořádávají do struktury tří  $\alpha$  helixů (H1, H2 a H3), tří beta-skládaných listů (S1, S2 a S3) a dvou flexibilních smyček (W1 a W2 Clark KL *et al.*, 1993). Celá sekvence je pak společně s N-terminální a C-terminální smyčkou W1 a W2 uspořádána následovně: H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2. Struktura S1, která je vmezeřena mezi helixy H1 a H2, vytváří kontakty se strukturami S2 a S3 za vytvoření třívrstvého antiparalelního beta-skládaného listu. Hlavním DNA rozpoznávacím elementem je helix H3, který se váže do velkého žlábků DNA zhruba kolmo na osu DNA a vytváří většinu báze-specifických kontaktů s DNA (Clark KL *et al.*, 1993; Gajiwala KS et al., 2000). Pozdější studie ukázaly, že v sekundární struktuře DNA vazebné domény FOXO proteinů mohou být lehké rozdíly (Weigelt J et al., 2001).

Všechny FOXO proteiny obsahují sekvenci pěti aminokyselin (Lys-Gly-Asp-Ser-Asn) mezi  $\alpha$  helixy H2 a H3, která se u jiných FOX proteinů nevyskytuje. Funkce těchto aminokyselin je dosud neznámá a v této sekvenci nevznikají žádné kontakty s molekulou DNA (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008)

### 1.2.4 Regulace aktivity FOXO transkripčních faktorů

Aktivita FOXO proteinů je ovlivňována širokým spektrem podnětů, které způsobují změnu hladiny FOXO proteinu, jeho buněčnou lokalizaci, transaktivaci a schopnost vazby na cílovou DNA. Toto ovlivňování se děje zejména pomocí posttranslačních modifikací a protein-proteinových interakcí (Calnan DR et al., 2008; Silhan J et al., 2009). Studie struktur FOXO proteinů v oblasti DNA vazebného rozhraní poskytly porozumění mechanismu modulace DNA vazebných vlastností a zároveň odhalily, že několik oblastí postranslačně modifikovaných se nachází v DNA vazebném rozhraní a že jejich modifikace brání vazbě FOXO s DNA. Změna, která se zde odehraje, se projeví jak ve sterickém uspořádání molekuly, tak v účinku Coulombických interakcí (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2010). Nicméně není zatím zcela jasné, zda tyto modifikace ovlivňují pouze vazebnou afinitu, či také specifickou vazbu.

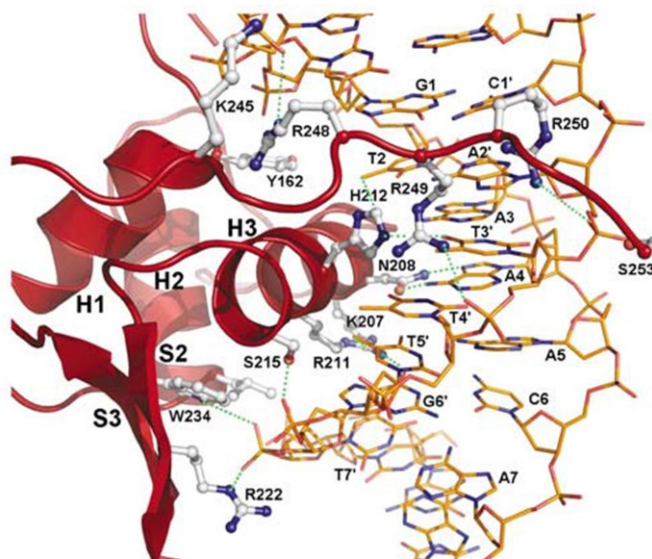
Transkripční aktivita FOXO proteinů je regulována pomocí signální dráhy inzulin/fosfatidilinositol-3-kinasa/proteinkinasa B. Místně specifická fosforylace AKT/PKB kinasou vytváří dvě vazebná místa pro proteiny 14-3-3 a indukuje fosforylaci

dalších fosforylačních míst kaseinkinasou 1 (CK1) a tyrozinkinasou 1A s duální specifitou (DYRK1a). Fosforylace, vyvolaná AKT/PKB kinasou vyvolá navázání proteinu 14-3-3, což vede k vytvoření komplexu FOXO:14-3-3, který je přenesen do cytozolu, kde navázaný protein 14-3-3 brání opětovnému přenesení FOXO proteinu do jádra, tím, že kryje jadernou lokalizační sekvenci (NLS) (Brunet A et al., 1999; Brownawell AM et al., 2001; Cahill CM et al., 2001; Zhao X et al., 2004; Obsilova V et al., 2005). Kromě fosforylací AKT/PKB řízené kontroly aktivity FOXO proteinů je jejich aktivita ovlivňována dalšími postranslačními úpravami jako jsou fosforylace jinými kinasami, acetylace nebo ubiquitinace. Všechna místa ve struktuře proteinu, která jsou cílem těchto postranslačních modifikací se nachází uvnitř vysoce konzervovaných regionů (Obsil T et al., 2008). A skutečně již bylo prokázáno, že modifikace těchto částí skutečně má negativní vliv na afinitu FOXO proteinů k DNA (Zhang X et al., 2007; van der Heide LP et al., 2005; Matsuzaki H et al., 2005; Boura E et al., 2007; Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008). Na druhou stranu, některé změny v oblasti flexibilní smyčky W2 mohou vést k opačnému efektu a zvýšit afinitu FOXO proteinů k DNA (Yuan Z et al., 2008). Přesné mechanismy toho jak jsou FOXO proteiny řízeny prostřednictvím postranslačních modifikací jsou většinou zatím skryté, ovšem v mnoha případech se zdá, že mají vliv na DNA vazebný potenciál FOXO proteinů, funkci jejich NLS a NES, nebo na jejich interakci s dalšími proteiny.

### 1.2.5 Vazba FOXO transkripčních faktorů na DNA

FOXO transkripční faktory rozpoznávají v sekvenci DNA dva shodné motivy. Je to motiv 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', známý jako "insulin-responsive element" (IRE) a motiv 5'-GTAAA(T/C)AA-3' známý jako motiv vázající členy rodiny proteinů Daf-16 (DBE) (Furuyama T *et al.*, 2000; Biggs WH *et al.*, 2001). Ačkoli obě tyto sekvence obsahují klíčovou sekvenci (5'-(A/C)AA(C/T)A-3'), váží se FOXO proteiny k motivu DBE s větší vazebnou afinitou než k motiuvu IRE. Strukturní studie komplexu FOXO-DBD:DNA ukázali očekávaný způsob rozpoznání DNA aminokyselinovými zbytky z helixu H3 (v sekvenci FOXO4 to jsou Asn148 a His152), které všechny tvoří přímou vazbu s klíčovou sekvencí DNA (Tsai KL *et al.*, 2007; Brent MM *et al.*, 2008; Boura E *et al.*, 2010) (Obr. 9). Další části FOXO-DNA vazebného rozhraní, N-terminální segment a obě smyčky W1 a W2, se účastní nesespecifických kontaktů s fosfátovými skupinami páteře DNA, čímž přispívají k jemné modulaci specifčnosti vazby a její síly.

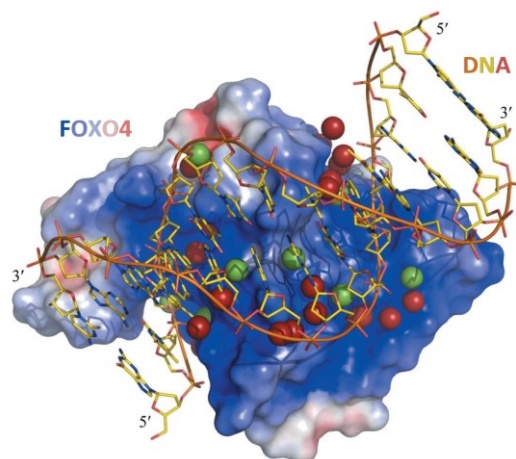
Další studie struktury komplexů FOXO-DBD:DNA ukázaly, že vazebné rozhraní obsahuje uspořádané molekuly vody, z nichž některé se podílejí na vazebných můstcích protein-voda-DNA, které se podílejí na báze-specifických interakcích. Z toho vyplývá, že alespoň v případě komplexů FOXO-DBD:DNA jsou uspořádané molekuly vody vnitřní součástí sekvencně specifických kontaktů s DNA (Boura E *et al.*, 2010).



**Obr. 9** Klíčové vazebné interakce FOXO proteinu s DNA v oblasti DNA vazebného rozhraní. Tento obrázek představuje rozpoznání klíčového vazebného motivu v sekvenci DNA vazebnou doménou proteinu FOXO3a (Tsai KL *et al.*, 2007). Kontakty důležité pro rozpoznání sekvence jsou označeny zelenou tečkovanou čarou. Molekuly vody účastnící se vazby jsou vyznačeny jako zelené koule (převzato z Obsil T *et al.*, 2008).

### 1.2.6 Transkripční faktor FOXO4

Transkripční faktor FOXO4 z rodiny FOX transkripčních faktorů podtřídy "O" je předmětem zkoumání již řadu let. Stejně jako ostatní členové skupiny FOX transkripčních faktorů hraje významnou roli při regulaci buněčného cyklu a odpovědi na buněčný stres. Studie struktury FOXO4-DBD navázané na 13 párů bází dlouhý DNA duplex ukázala, že klíčová rozpoznávací sekvence je stejná jako pro další dva členy podtřídy FOXO proteinů (FOXO1 a FOXO3), zatímco smyčky mezi helixy H2 a H3 mají jinou konformaci oproti jiným FOXO-DBD:DNA studovaným strukturám a účastní se vazby na DNA (Boura E *et al.*, 2010). Také díky velmi dobrému rozlišení struktury se ukázalo, že vazby na DNA tvoří nejen přímé vazby přes vodíkové můstky, ale také jedinečná síť "vodních" interakcí (Obr. 10) vede k vazbě FOXO4-DBD na DNA v závislosti na sekvenci DNA (Boura E *et al.*, 2010). Data získaná při studii komplexu FOXO4-DBD:DNA odhalila specificky strukturovanou síť 30 molekul vody v oblasti DNA vazebného rozhraní. Pět molekul vody participuje na vazbě "protein-voda-báze", zatímco dalších devět figuruje ve vazbě "protein-voda-fosfátová skupina báze" a ostatní tvoří kontakt buď s polárními aminokyselinami proteinu, nebo polárními atomy molekuly DNA (Boura E *et al.*, 2010).



**Obr. 10 Unikátní síť vodných molekul při vazbě FOXO4-DBD a molekuly DNA.** Schéma znázorňuje molekuly vody na FOXO4-DBD:DNA vazebném rozhraní. Zelené koule znázorňují molekuly vody, které se účastní vazby protein-voda-báze. Červené koule představují molekuly vody, které se účastní interakcí s polárními aminokyselinami proteinu nebo polárními atomy molekuly DNA. Znázorněny jsou pouze molekuly vody do vzdálenost 3.0 Å od FOXO4-DBD a molekuly DNA zároveň (upraveno dle Boura E et al., 2010).

Podobná " síť molekul vody" byla pozorována ve struktuře FOXO1-DBD:DNA, ale nikoliv ve struktuře FOXO3-DBD:DNA, což ovšem pramenilo patrně z nižšího rozlišení této studie (2.7 Å PDB, kód 2uzk) (Brent MM et al., 2008; Tsai KL et al., 2007). Z těchto pozorování je zřejmé, že na stabilizaci molekuly se kromě přímých protein-DNA interakcí bude značnou měrou podílet i hydratační entalpie (Bhat et al., 1994). Specificky uspořádaná síť molekul vody může též usnadnit FOXO proteinům "čtení" sekvence DNA a tím usnadnit rozpoznání klíčové vazebné sekvence.

Jiný zajímavý prvek ve struktuře FOXO4 odhalila studie struktury FOXO4-DBD:DNA, která identifikovala vazebné místo pro kov na C-terminální části helixu H3. Na základě dalších indicií lze usuzovat patrně na vazebné místo pro kationt  $Mg^{2+}$ . Funkcí tohoto vazebného místa je pravděpodobně stabilizace otky mezi helixem H3 a strukturou S2 (Boura E et al., 2010). Podobná vazebná místa pro hořčík byla nalezena ve strukturách komplexů DNA s FOXO1-DBD, FOXA3, FOXP2 a FOXK1a (Clark KL et al., 1993; Stroud JC et al., 2006; Tsai KL et al., 2007, Brent MM et al., 2008).

### 1.3 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 tvoří další vysoce konzervovanou rodinu proteinů, jejichž důležitost v buněčné biologii vzrostla s poznáním, že se účastní celé řady zcela zásadních buněčných dějů, jako jsou metabolismus, transport proteinů, přenos signálu, apoptóza a regulace



buněčného cyklu. Členové této rodiny proteinů byli poprvé identifikováni Moorem a Perezem v roce 1967 a získali jejich obvyklý název na základě označení používaném při systematické klasifikaci savčích proteinů vyskytujících se v mozkové tkáni (Moore BW et al., 1967). Jelikož mnoho interakcí proteinů 14-3-3 je závislých na fosforylaci, jsou proteiny 14-3-3 v úzké souvislosti se signálními dráhami regulovanými fosforylací, které jsou klíčové pro normální růst a vývoj buňky a jejichž dysfunkce, nebo nesprávná regulace je příčinou mnoha závažných onemocnění, včetně nekontrolovaného nádorového bujení, tedy rakoviny.

Proteiny 14-3-3 jsou polypeptidy o velikosti 28 - 33 kDa hojně se vyskytující ve všech eukaryotických organismech (Aitken A. et al., 2006). Jsou to proteiny, které se ke svým vazebným partnerům váží na základě fosfoserinových a fosfothreoninových vazebných míst. Systém regulace založený na fosforylaci peptidu coby ligandu a přítomnosti vazebného partnera coby aktivátora, či represora je v buňce velmi rozšířen, čímž dává proteinům 14-3-3 možnost širokého pole působnosti v roli regulátorů buněčných procesů.

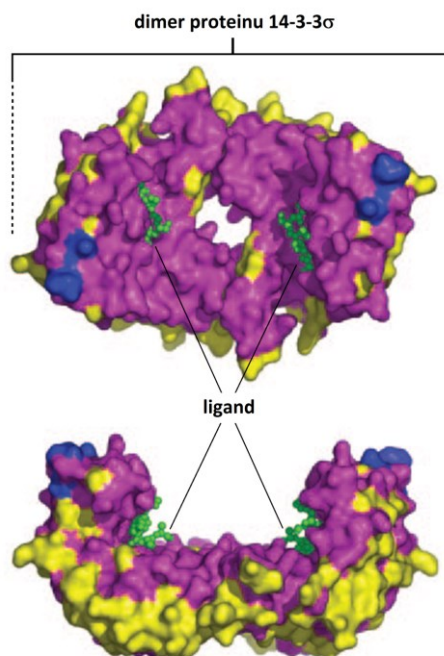
Svojí strukturou jsou proteiny 14-3-3 velice konzervované a dělí se do sedmi základních skupin:  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$  a  $\eta$ . Ve valné většině případů vytvářejí homo- či heterodimery, přičemž některé podskupiny jako například  $\gamma$  a  $\sigma$  preferují vytváření homodimerů, zatímco jiné skupiny, například  $\epsilon$  preferují tvorbu heterodimerů. Dimery proteinů 14-3-3 pak interagují s mnoha různými vnitrobuněčnými proteiny, včetně transkripčních faktorů, biosyntetických enzymů, cytoskeletálních proteinů, nebo také se signálními molekulami, apoptotickými faktory nebo nádorovými supresory. Toto široké zaměření je možné právě díky charakteru vazby na vazebné partnery, která je založena na jejich specifické fosfoserinové a fosfothreoninové vazbě.

Vzhledem k vazebné aktivitě proteinů 14-3-3 byly v minulosti popsány dva základní vazebné motivy s vysokou aktivitou jako cíle proteinů 14-3-3. Těmito vazebnými motivy jsou: RSXpSXP a RXXXpSXP, kde pS značí fosfo-serin a X variabilní aminokyselinu. Ovšem zároveň bylo popsáno, že, ne všechny fosforylačně závislé vazby závisí na těchto motivech a také, že ne všechny interakce proteinů 14-3-3 jsou závislé na fosforylaci vazebných partnerů (Morrison DK et al., 2009).

Strukturní analýza dimerů proteinů 14-3-3 odhalila, že každý monomer obsahuje nezávislé vazebné místo pro ligand (Obr. 11). Z této skutečnosti vyplývá, že každý dimer je schopen reagovat na dva různé vazebné motivy zároveň. Nezáleží přitom ani, zda jsou tyto motivy na jednom objektu, nebo na dvou navzájem nezávislých objektech (Gardino AK et al., 2006).

Velmi typickou a důležitou vlastností proteinů 14-3-3 je, že dimery proteinů 14-3-3 tvoří v porovnání s jinými proteiny velmi rigidní struktury a navázáním na vazebného partnera způsobuje konformační změny spíše u tohoto partnera než ve své vlastní struktuře. Tyto konformační změny mohou zásadním způsobem ovlivnit stabilitu nebo

katalytickou aktivitu vazebného partnera. Navíc, může robustní struktura proteinu 14-3-3 stericky bránit přístupu ligandů do aktivních center jejich vazebných partnerů, zakrývat jejich signální sekvence, blokovat vazebná místa či bránit přístupu enzymů jako jsou kinasy, fosfatasy, či proteasy.



**Obr. 11 Vazebný povrch dimeru proteinu 14-3-3 $\sigma$  a vazba ligandu do vazebného žlábků.** Tvar proteinu 14-3-3 $\sigma$  je zde reprezentován grafickým znázorněním vazebného povrchu dimeru proteinu. Fialově jsou vyznačeny vysoce konzervované oblasti proteinu a žlutě oblasti sekvencně variabilní. Modře jsou v tomto případě vyznačeny aminokyselinové zbytky Met202, Asp204, a His206, které jsou pro izoformu  $\sigma$  unikátní vzhledem ke všem dalším izoformám proteinů 14-3-3. Řetízem zelených kuliček je zde znázorněn fosfopeptidový ligand navázaný ve vazebném žlábků 14-3-3 $\sigma$  proteinu (upraveno dle Wilker EW et al., 2005).

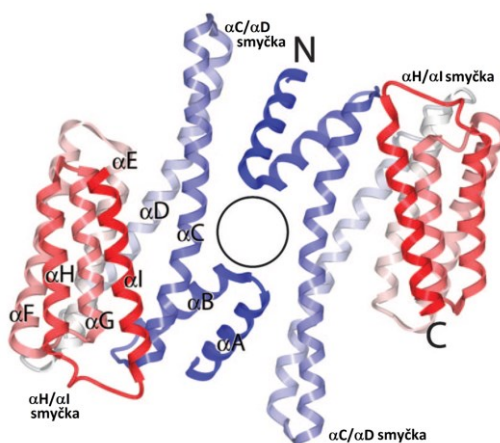
### 1.3.1 Struktura proteinů 14-3-3 a jejich protein-proteinové interakce

Zásadní způsob, kterým ovlivňují proteiny 14-3-3 dění v buňce jsou protein-proteinové interakce a vytvářením komplexů proteinů. Tato skutečnost platí pro zástupce všech sedmi izoform proteinů 14-3-3 ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$  a  $\eta$ ), které tvoří komplexy s více než 130 různými vazebnými partnery (Jin J et al., 2004)

Hlavní podmínkou této interakce, jak již bylo zmíněno, je fosforylované vazebné místo tvořené specifickým vazebným motivem. Všechny izoformy proteinů 14-3-3

rozpoznávají s vysokou afinitou dva základní motivy aminokyselinové sekvence: RSXpSXP a RXXXpSXP, kde pS značí fosforylovaný serin (Muslin AJ et al., 1996; Rittinger K et al., 1999; Yaffe MB et al., 1997). V některých případech jsou proteiny 14-3-3 schopny rozpoznat i nefosforylovaný nebo jinak modifikovaný vazebný motiv, jako například virulentní faktor *Pseudomonas aeruginosa* exoenzym S (ExoS), p190RhoGEF nebo řágový inhibitor peptidů R18 (Henriksson ML et al., 2002; Yhang L et al., 1999; Petosa C et al., 1998; Zhang L et al., 1999). Fosforylací podmíněná vazba i fosforylací nepodmíněná vazba se ukázala být zaměřená do stejného místa struktury proteinů 14-3-3, oblasti, která tvoří strukturu tzv. vazebného kanálku s rigidní strukturou a oblastmi kde se soustřeďuje parciální negativní, či pozitivní náboj molekuly proteinu 14-3-3 (Zhang L et al., 1999) (Obr. 12 a 13). Zajímavé a velmi podstatné je, což ukázalo srovnání krystalových struktur různých proteinů 14-3-3 vázaných na různé peptidy se strukturami volných proteinů 14-3-3, že struktura 14-3-3 se při vazbě konformačně příliš nemění a, že tedy proteiny 14-3-3 působí jako tzv. molekulární kovadlina (Yaffe MB et al., 2002).

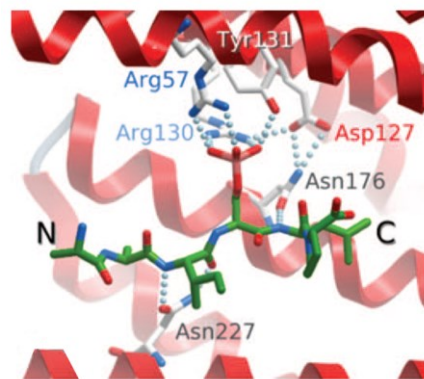
Každý monomer 14-3-3 sestává z uspořádání 9  $\alpha$  helixů ( $\alpha$ A až  $\alpha$ I) organizovaných do tří skupin po dvou helixech a jedné skupiny po třech (Xiao B et al., 1995; Liu MY et al., 2002).



**Obr. 12** Struktura dimeru proteinu 14-3-3. Grafické znázornění uspořádání a vzájemné polohy sekundárních struktur v rámci molekuly dimeru proteinu 14-3-3 (upraveno dle Yang X et al., 2006).

První čtyři helixy (helixy  $\alpha$ A až  $\alpha$ D) jsou zásadní pro zformování dimeru. Helixy  $\alpha$ C,  $\alpha$ E,  $\alpha$ G a  $\alpha$ I formují konzervovaný vazebný kanálek, který má pozitivně nabitou oblast v jedné části a negativně nabitou oblast v druhé části (Xiao B et al., 1995; Liu MY et al., 2002).

Pozitivně nabitá oblast je tvořena konzervovanou triádou dvou argininových a jednoho tyrozinového zbytku (například v případě izoformy  $\epsilon$  Arg57, Arg130 a Tyr131) a váže negativně nabitou fosfátovou skupinu fosforylovaného vazebného partnera.



**Obr. 13 Vazba ligandu do pozitivně nabitě oblasti vazebného kanálku 14-3-3 $\epsilon$  proteinu.** Pozitivně nabitá oblast vazebného kanálku 14-3-3 $\epsilon$  proteinu je tvořena konzervovanou triádou dvou argininových a jednoho tyrozinového zbytku (Arg57, Arg130 a Tyr131) a váže negativně nabitou fosfátovou skupinu fosforylovaného ligandu (převzato z Yang X et al., 2006).

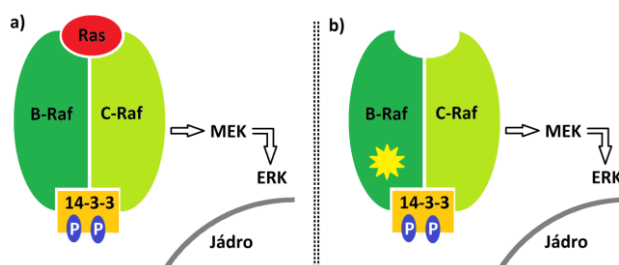
Ačkoliv proteiny 14-3-3 tvoří obvykle homo-, či heterodimery, jsou popsány i monomery proteinů 14-3-3 a i ty jsou někdy samostatně funkční, v závislosti na cílových vazebných proteinech. Například monomerní forma proteinu 14-3-3 $\zeta$  je schopná modulovat aktivitu draslíkových kanálů (Zhou Y et al., 2003), zatímco aktivitu Rafkinasy je schopna ovlivňovat pouze ve formě dimeru (Tzivion G et al., 1998). Lze tedy předpokládat, že dimerizace proteinů 14-3-3 je jedním ze způsobů regulace jejich buněčné aktivity. Oblast proteinů 14-3-3, odpovědná za jejich dimerizaci utváří vysoce konzervovaná solný můstek mezi Arg19 a Glu92 (Yang X et al., 2006).

### 1.3.2 Funkce proteinů 14-3-3 v regulaci buněčného cyklu a při apoptotické signalizaci

O životě a smrti buňky rozhoduje genetická vybavenost buňky, její schopnost obrany vůči vnějším vlivům a její schopnost opravy při poškození. Z vnějšího prostředí přicházejí často signály, které spouští signální dráhy s příkazem programované buněčné smrti nebo naopak s příkazem k dělení buňky. Tato rozhodnutí o osudu buňky však nemusí být definitivní. Buňka je na ně schopna reagovat. Regulace rovnováhy mezi přežitím buňky a apoptotickou signalizací je klíčový aspekt v rozhodování o osudu buňky a právě

proteiny 14-3-3 zasahují mnohonásobně do této rovnováhy. Vazba proteinu 14-3-3 na různé vazebné partnery byla často pozorována například při zvýšení aktivity proteinů při proliferaci nebo spouštění funkcí na podporu přežití buňky. Názorným příkladem této aktivity je chování serinových a threoninových kinas rodiny Raf (Tzivion G et al., 2006).

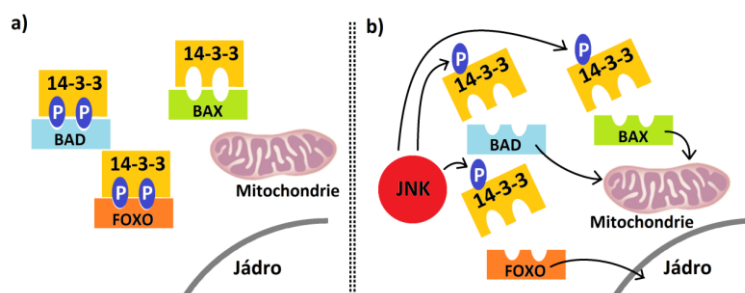
Členové rodiny serinových a threoninových kinas jsou klíčovými elementy v ovlivnění Ras GTPasy, která iniciuje aktivaci signální kaskády extracelulárním signálem řízené kinasy (ERK), která dále povzbuzuje signály k proliferaci a přežití buňky. Navázání proteinu 14-3-3 do vazebného místa v C-terminální oblasti Raf proteinu (pS621 a pS729 na C-Raf respektive na B-Raf) je nutná pro plnou katalytickou aktivitu těchto kinas a pro jejich plnohodnotnou heterodimerizaci (Rushworth LK et al., 2006; Garnett MJ et al., 2005). Schéma této komplexní interakce zachycuje obrázek 14. Za normálních signálních podmínek požadovaných k heterodimerizaci C-Raf a B-Raf kinas k této reakci dochází jako odpověď na aktivaci Ras signální dráhy, což vyvolá maximální aktivaci C-Raf kinasy. Při poruše tohoto mechanismu k aktivaci C-Raf kinasy nedochází, což může mít zcela fatální důsledky. Mutovaná, a tedy nefunkční, B-Rafkinasa byla nalezena v mnoha lidských rakovinných buňkách, kde onkogenní B-Raf proteiny tvořili částečně heterodimery s C-Raf proteiny. Tato heterodimerizace je závislá na vazbě proteinu 14-3-3 a je nutná pro transformaci funkce B-Raf proteinů s nepárovou kinasovou aktivitou. Popis tohoto mechanismu je zde uveden jako příklad spojení funkce proteinů 14-3-3 s onkogenním potenciálem B-Raf proteinu (Morrison DK, 2009).



**Obr. 14 Role proteinu 14-3-3 při dimerizaci B-Raf a C-Raf.** *Protein 14-3-3 je nutný k dimerizaci B-Raf a C-Raf proteinů, čímž se spustí jejich plná kinasová aktivita. a) Za normálních podmínek je tento krok odpovědí na signály Ras-dependentní signální dráhy. b) Při výskytu mutantní formy B-Raf proteinu (★), zajišťuje protein 14-3-3 vznik částečných heterodimerů a šíření falešného signálu k proliferaci, což má za následek onkogenní aktivitu buňky (upraveno dle Morrison DK, 2009).*

Další způsob jakým proteiny 14-3-3 ovlivňují rovnováhu mezi přežitím buňky a apoptózou je protichůdné působení na proteiny, které podporují apoptotické procesy a stárnutí buňky (Porter GW et al., 2006), jakými jsou například FOX proteiny. Proteiny 14-3-3 mohou potlačovat apoptózu mimo jiné díky interakci s jadernými komponentami

mitochondriálního apoptotického mechanismu, jakým je například BAD (antagonista proteinu BCL-2 protein), protein BAX (protein X asociovaný s BCL-2), nebo s proteiny, které přenášejí apoptotický signál, jako jsou ASK1 (MEKK5) kinasa (apoptózu signalizující kinasa 1) nebo transkripční faktory z rodiny FOX proteinů (forkhead box). K zapojení proteinů 14-3-3 vede i další způsob regulace, kdy kinasy s funkcemi podporujícími přežití buňky jako je například kinasa AKT (proteinkinasa B, PKB), Rsk kinasa, nebo PIM, které jsou často odpovědné za aktivaci vazebných míst proteinů 14-3-3 na jiných pro-apoptotických proteinech, připraví podmínky pro navázání 14-3-3 na těchto pro-apoptotických faktorech. Navázání 14-3-3 na tyto proteiny může iniciovat přemístění těchto pro-apoptotických proteinů pryč z místa jejich předchozí aktivity. Tento mechanismus se uplatňuje i při regulaci zmíněného proteinu BAD, kdy způsobuje jeho setrvání v cytoplazmě, čímž je zabráněno jeho dimerizaci s proteinem BCL<sub>2/xL</sub> v mitochondrii a zprostředkování odpojení BAX proteinu z BCL<sub>2/xL</sub>. Celý tento proces vede k inhibici apoptózy (Morrison DK, 2009). Příklad výše zmíněné regulace zachycuje následující obrázek (Obr. 15).



**Obr. 15 Role proteinu 14-3-3 při přenosu signálů pro přežití buňky a při signálech buněčného stresu.** a) Při signálech podporujících přežití buňky se proteiny 14-3-3 váží na celou řadu pro-apoptotických faktorů jako jsou BAD (antagonista proteinu BCL-2 protein), BAX (protein X asociovaný s BCL-2) nebo FOXO transkripční faktory. b) Při signálech buněčného stresu fosforyluje JNK kinasa přímo proteiny 14-3-3 čímž zruší vazbu s pro-apoptotickými faktory, které pak mohou zastat svou úlohu v pro-apoptotické signalizaci (upraveno dle Morrison DK, 2009).

V případě FOXO proteinů způsobí navázání proteinu 14-3-3 transport FOXO proteinu z jádra vystavením jeho jinak ukryté jaderné exportní sekvence (NES) a zabrání opětovnému přemístění do jádra zakrytím jeho jaderné lokalizační sekvence (NLS) což způsobí jeho setrvání v cytoplazmě, kde je protein FOXO vystaven indukované degradaci.

Pokud senzory v buňce vyhodnotí, že současná vnitrobuněčná situace oprávněně vyklání raménka vah směrem k buněčné smrti, mnoho interakcí proteinů 14-3-3 je přerušeno. Vazebná afinita 14-3-3 může být narušena aktivací fosfatů, které atakují 14-3-3 vazebná místa a defosforylují vazebné partnery, nebo fosforylací vazebných partnerů proteinů 14-3-3 na jiných místech a zároveň fosforylací samotných proteinů 14-3-3. Všechny tyto kroky vedou k celkové eliminaci vzájemné afinity proteinů 14-3-3 a jejich vazebných partnerů.

Již dříve bylo například pozorováno, že smrt postmitotických neuronů může být indukována, když cyklin-dependentní kinasa 1 (Cdk1) fosforyluje FOXO1 protein, čímž naruší vazbu s proteinem 14-3-3 a FOXO1 se tak může vrátit zpět do jádra a aktivovat transkripci proteinů podporujících buněčnou smrt (Yuan Z et al., 2008).

Další takovou kinasou, která negativně působí na vazebné vlastnosti proteinů 14-3-3 je Jun-N-terminalní kinasa (JNK), která fosforyluje proteiny 14-3-3 (platí pro 14-3-3- $\beta$ , - $\epsilon$ , - $\sigma$  a - $\zeta$ ), nebo jejich vazebné partnery (Sunayama J et al., 2005; Tsuruta F et al., 2004; Yoshida K et al., 2005).

Podle mnohých pozorování se zdá, že fosforylace proteinu 14-3-3 a uvolnění ligandu je primárním mechanismem, jakým aktivovaná JNK kinasa kontroluje pro-apoptotické funkce proteinů BAD, BAX, FOXO a Abl (Sunayama J et al., 2005; Tsuruta F et al., 2004; Yoshida K et al., 2005).

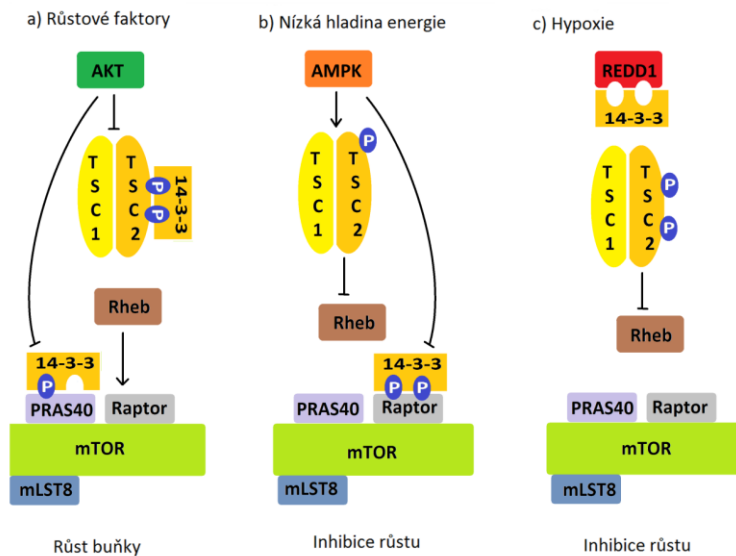
### 1.3.3 Funkce proteinů 14-3-3 v signalizaci růstu

Savčí protein s komplikovaným názvem, cílový protein rapamycinu (mTOR, mammalian target of rapamycin) je klíčovým proaktivním faktorem v důležité signální dráze směřující k podpoře růstu a dělení buňky, která je často nesprávně regulovaná při onemocnění rakovinou (Reiling JH, 2006; Guertin DA et al., 2007). Za normálních podmínek je tato signální dráha regulována s ohledem na energetický stav buňky, množství stavebního materiálu (živin) a hladinu kyslíku. Signál přenášený touto dráhou se sbíhá k mTOR komplexu 1 (TORC1), který je klíčovým regulačním prvkem této dráhy. V tomto místě se regulace aktivně účastní proteiny 14-3-3, které se váží se čtyřmi různými regulátory a elementy TORC1 (Reiling JH et al., 2006; Bhaskar PT et al., 2007).

Zajímavou skutečností je, že 14-3-3 působí skrze TORC1 na růst buňky za vhodných podmínek pozitivně a naopak při signalizaci buněčného stresu negativně. Předtím, než se buňka vydá metabolickou cestou buněčného růstu, musí zhodnotit, zda disponuje dostatečnou energií k tomuto kroku. Tento aspekt dokáže vyhodnotit enzym 5'-AMP aktivovaná proteinkinasa (AMPK), která je citlivá na hladinu energie a je aktivována při nedostatku energie v buňce. Aktivita AMPK vede k fosforylaci jednoho z elementů mTOR komplexu 1, což vyvolá vazbu proteinu 14-3-3 na tento element a celkovou

inhibici mTOR komplexu 1 (Li Y et al., 2003; Gwinn DM et al., 2008).

Při kyslíkové deprivaci buňky se protein 14-3-3 váže na jiný z elementů signální dráhy scházející se na mTOR komplexu 1, a sice na protein REDD1, čímž zabrání předání signálu na mTOR komplex a tím inhibuje proces růstu a dělení buňky (DeYoung MP et al., 2008). Tato duální, na podmínkách závislá regulace proteinem 14-3-3, je znázorněna na obrázku 16.



**Obr. 16 Duální funkce proteinů 14-3-3 při TORC1 signalizaci.** Protein 14-3-3 se váže na komplex TORC1 za různých podmínek na různé elementy, čímž moduluje další aktivitu buňky. a) Při podmínkách a signálech pro růst buňky je aktivována kinasa AKT, která fosforyluje elementy TSC2 a PRAS40 komplexu TORC1 na místech, které vyvolají vazbu proteinu 14-3-3, čímž utlumí inhibiční efekt těchto dvou proteinů na TORC1 komplex. b) Při signálech nízké energie je aktivována AMP kinasa, která fosforyluje elementy TSC2 a Raptor komplexu TORC1, čímž aktivuje funkci TSC2 elementu a vyvolá vazbu 14-3-3 na protein Raptor, což dále inhibuje funkci tohoto proteinu, jehož aktivita je nutná k vytvoření kontrolního bodu energie. c) Při stavu hypoxie jsou exprimovány proteiny REDD1. Tento protein je schopen přebít proteinu TSC2 navázaný protein 14-3-3 a vrátit tak proteinu TSC2 jeho inhibiční aktivitu (upraveno dle Morrison DK, 2009).

Těchto několik příkladů regulace buněčných dějů proteiny 14-3-3 nastiňuje potenciál regulačních možností proteinů 14-3-3 a zároveň popisuje charakter základního mechanismu jejich působení. Příkladů by samozřejmě mohla být celá další řada a jeden případ by vedl k druhému, tak jak je přenos a regulace signálu v buňce navzájem propojena ve své komplexnosti.



### 1.3.4 Funkce proteinů 14-3-3 při potlačování nádorového bujení

Další důležitou funkcí proteinů 14-3-3, kromě výše zmiňované dobře známé regulace proliferace a apoptózy v závislosti na základě zpracování signálů okolí, je potlačování buněčného růstu a progresu buněčného cyklu ve chvílích, kdy je v buňce odhalena poškozená DNA a hrozí nebezpečí nekontrolovaného dělení a růstu buňky, tedy vzniku nádoru. Tato funkce byla identifikována a popsána v nejvyšší míře u podskupiny  $\sigma$  proteinů 14-3-3. Tato skupina je totiž v rodině proteinů 14-3-3 unikátní tím, že je primárně exprimovaná v buňkách epitelu a tvoří téměř výlučně homodimery (Wilker EW et al., 2005). Exprese 14-3-3 $\sigma$  proteinů je pozitivně regulována v souvislosti s expresí nádorového antigenu p53 a dalšími nádorovými antigeny, které se vyskytují jako reakce na signály, které se objeví po poškození molekuly DNA (Hermeking H et al., 1997; Aprelikova O et al., 2001). Pokud dojde k takovéto situaci, nově vytvořené 14-3-3 $\sigma$  se naváží na komplexy proteinů zajišťující progres buněčného cyklu a tím je buněčný cyklus pozastaven do chvíle, kdy je molekula DNA opravena a vazba proteinů 14-3-3 negativně regulována (Chan TA et al., 1999; Laronga C et al., 2000). Signálem, že proteiny 14-3-3 $\sigma$  mohou hrát významnou roli při potlačování vzniku nádorů, bylo pozorování výrazného snížení jejich koncentrace v nádorech vzniklých v epiteliální tkáni (například při rakovině prsu) (Lodygin D et al., 2006). Toto výrazné snížení koncentrace 14-3-3 $\sigma$  proteinů v buňce může být způsobeno například nadměrnou metylací promotorů genu kódujícího 14-3-3 $\sigma$  protein, nebo cílenou ubiquitinem způsobenou degradací 14-3-3 $\sigma$  proteinů. Úskalím takto negativně regulované exprese 14-3-3 $\sigma$  proteinů je, že její působení se může rozšířit do okolní tkáně a tím se stát prvním krokem pro šíření nádorového bujení (Umbricht CB et al., 2001).

Dalším zajímavým případem, kdy jsou proteiny 14-3-3 $\sigma$  důležité a kdy jejich nedostatek způsobuje poruchu buněčného cyklu, je mitotické dělení. Při tomto složitém buněčném procesu se proteiny 14-3-3 podílí velmi významně na regulaci translace potřebných proteinů (Wilker EW et al., 2007). V eukaryotických buňkách totiž většina translace mRNA závisí na cap-závislém mechanismu regulace. Ovšem některé molekuly mRNA obsahují sekvenci, která umožňuje cap-nezávislou translaci. To je problém jelikož, při mitóze má být cap-závislá regulace potlačena a cap-nezávislá regulace upřednostněna a právě proteiny 14-3-3 jsou úzce spjaty s přepnutím translace z cap-závislé na translaci cap-nezávislou (Wilker EW et al., 2007).

### 1.3.5 Proteiny 14-3-3 v nižších organismech

Jako příklad vlivu proteinů 14-3-3 na metabolické dráhy v nižších organismech uvádím spojitost mezi kvasničnou formou proteinů 14-3-3 a aktivitou enzymu štěpícího disacharid trehalosu.

Trehalosa je přirozeně se vyskytující disacharid, který slouží jako zdroj uhlíku pro organismus a jako ochranný element v různých stresových situacích jako jsou dehydratace, teplotní extrém, či vystavení oxidativnímu stresu (Crowe JH et al., 1994; Gibson RP et al., 2007). Při metabolismu tohoto disacharidu hraje významnou roli enzym obecně zvaný Trehalosa. Izofomy tohoto enzymu se nachází v celé řadě organismů a jejich sekvence je vysoce konzervovaná (Kopp M et al., 1993; Kopp M et al., 1994; Nwaka S et al., 1998). V kvasinkách, či v rostlinách slouží tyto enzymy též jako regulační a signalizační molekula v některých metabolických drahách. Studie zaměřené na funkci trehalosy v *Saccharomyces cerevisiae* zjistily, že zde je hydrolyza trehalosy způsobena třemi enzymy, a sice neutrální trehalasou 1 (Nth1), neutrální trehalasou 2 (Nth2) a kyselou trehalasou 1 (Ath1) (Wera S et al., 1999).

Kvasničné neutrální trehalasy 1 a 2 disponují výrazně delší N-terminální oblastí, ve srovnání s formami těchto enzymů nacházejících se v jiných organismech. Tato prodloužená N-terminální oblast se zdá být důležitým prvkem při regulaci aktivity Nth1 a 2 skrze cAMP dependentní fosforylaci na několika místech vhodných k fosforlaci protein kinasou A (PKA) (Uno I et al., 1993; Ortiz CH et al., 1983; van der Plaats J B et al., 1974). Na základě těchto zjištění ukázal Panni ve své studii (Panni S et al., 2008), že fosforylovaný enzym Nth1 je regulován přes interakci s proteiny 14-3-3. Tato studie ukázala, že interakce se proteiny 14-3-3 umocňují aktivitu Nth1. Detailní mechanismus těchto interakcí je však stále nejasný a zaměřují se na něj další studie. Předpokládá se, že interakce se bude odehrávat na základě strukturních změn při přímé vazbě enzymu a jeho regulačního partnera.

### 1.3.6 Způsob vazby proteinů 14-3-3 k jejich vazebným partnerům

Vazební partneři proteinů 14-3-3 mají ve své struktuře obvykle určitý typ globulární domény s nestrukturovanou oblastí, která ve své sekvenci obsahuje serin nebo threonin v rámci jednoho, či druhého základního vazebného motivu. Při samotném vzniku vazby dochází současně ke dvěma událostem. Za prvé dochází k vazbě fosforylovaného proteinu do konzervovaného kanálku proteinu 14-3-3 ( $\alpha$ C,  $\alpha$ E,  $\alpha$ G a  $\alpha$ I), což označujeme jako primární interakci a za druhé k interakci globulární domény vazebného partnera s dalšími částmi struktury 14-3-3, což nazýváme sekundární interakcí.

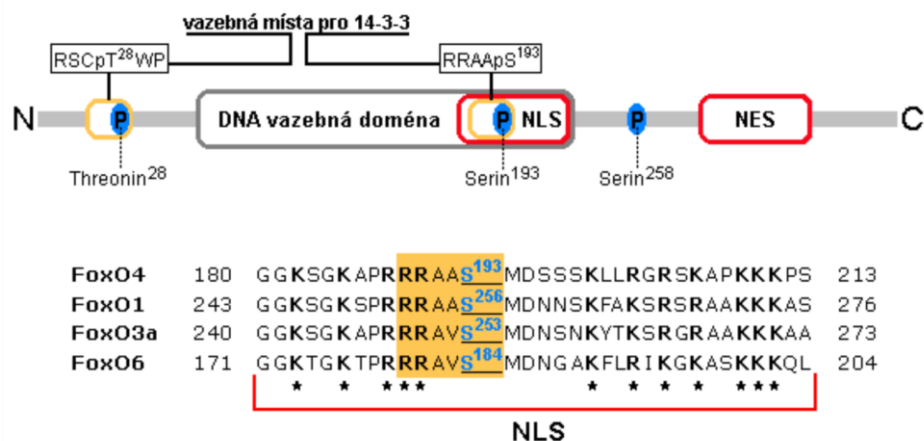
Proteiny 14-3-3 mají potenciál interagovat s velkým množstvím rozličných fosforylovaných proteinů. Při interakci proteinu 14-3-3 s fosforylovaným peptidem je fosfátová skupina fixována vazbou na triádu aminokyselinových zbytků Arg-Tyr-Arg, přičemž fosfoserinová vazba C $\alpha$ -C $\beta$  může volně rotovat. Proto jsou pro peptid vázající se do vazebného žlábků proteinu 14-3-3 možné dvě různé orientace, vyplývající z dvou

možných rotací C $\alpha$ -C $\beta$  vazby. Všechny peptidy vázající se do vazebného žlábků proteinu 14-3-3 se váží orientované svým N-koncem k C-konci proteinu 14-3-3 a obráceně a s vazbou na konzervovaná vazebná místa. Vázající se fosfopeptid má většinu postranních řetězců aminokyselinových zbytků orientovaných směrem ven z vazebného žlábků a směrem z molekuly proteinu 14-3-3. Pokud to shrneme, tak obecně charakter fosfopeptidových interakcí proteinu 14-3-3 závisí na pevných pozicích vazebných postranních řetězců ve vazebném žlábků proteinu 14-3-3 a orientaci peptidu. V tomto případě se vazby tvoří pouze s hlavním řetězcem peptidu a fosfátovými skupinami peptidu. Naproti tomu vazba s nefosforylovanými peptidy jako jsou R18 a ExoS, které mají opačnou orientaci, jsou závislé na sekvenčně specifické interakci s postranními řetězci (Yang X et al., 2006).

## 1.4 14-3-3 $\zeta$ a FOXO4

Regulační protein 14-3-3 $\zeta$  je jedním z nejrozšířenějších typů izoform savčích proteinů 14-3-3. Transkripční faktor FOXO4 (zvaný též AFX), protein z rodiny savčích FOXO proteinů je jeden z jeho nejvýznamnějších vazebných partnerů. Chromozomální translokace, která vede k fúzi části genu pro transkripční doménu FOXO4 proteinu s genem pro transkripční faktor MLL (mixed-lineage leukemia), hraje pravděpodobně roli při vzniku akutní leukémie (So CW et al., 2003; So CW et al., 2002). Dále se FOXO4 podílí na regulaci buněčného cyklu, přesněji řečeno na pozdržení buňky v G1 fázi buněčného cyklu.

V roce 2001 byla uveřejněna NMR struktura DNA vazebné domény FOXO4 (Weigelt J et al., 2001), která ukazuje, že FOXO4 obsahuje ve své struktuře tři fosforylační motivy pro proteinkinasu B (PKB): Thr28, Ser193 a Ser258 (Tran H et al., 2003; Woods YL et al., 2002; Obsil T et al., 2003) (též Obr. 17).



**Obr. 17 Schématické znázornění nejdůležitějších oblastí v primární struktuře FOXO4.** Ve struktuře FOXO4 proteinu se vyskytují tři fosforylační místa pro PKBkinasu. Dvě z nich jsou součástí vazebného motivu proteinů 14-3-3 (Thr28 a Ser193), což umožňuje regulaci FOXO4 proteiny 14-3-3. Ser193 je navíc součástí signální oblasti NLS (jaderná lokalizační sekvence) a jeho fosforylace, která umožní navázání proteinu 14-3-3 způsobí zakrytí NLS (upraveno dle Obsilova V et al., 2005).

Již předchozí studie ukázaly, že fosforylace FOXO4 na těchto místech vede k inhibici transkripční aktivity FOXO4 proteinu a k jeho exportu z jádra do cytoplazmy. Samotná fosforylace FOXO4 však sama o sobě k inhibici transkripční aktivity nestačí. Již dříve bylo prokázáno, že pro rychlý export jiného transkripčního faktoru, FOXO3a, z jádra do cytoplazmy je nezbytná nejen jeho fosforylace a interakce s proteinem 14-3-3, ale též přítomnost jaderné exportní sekvence (NES) v jeho struktuře (Brownawell AM et al., 2001; Brunet A et al., 2002). Obdobný závěr platí i pro transkripční faktor FOXO4. Ten obsahuje ve své struktuře jak jadernou lokalizační sekvenci (NLS), tak i jadernou exportní sekvenci (NES). Pro lokalizaci FOXO4 v jádře se ukázaly být nezbytné aminokyselinové zbytky 180 až 221. FOXO4 obsahuje též neklasickou NLS skládající se ze dvou částí, které obklopují fosforylační místo pro PKB na C-konci DNA vazebné domény (Ser193). Jak již bylo zmíněno dříve, fosforylace serinového zbytku mezi dvěma částmi této neklasické NLS FOXO transkripčních faktorů obecně, vede k částečnému narušení její funkce a navíc vazba proteinu 14-3-3 na FOXO transkripční faktor může mít za následek sterickou blokadu této NLS. Podle současných výzkumů to vypadá, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje obě části NLS (Obsilova V et al., 2005). Jaderná lokalizační sekvence (NES) proteinu FOXO4 se nachází v úseku mezi 300. až 308. aminokyselinou, který je velmi bohatý na lyzinové zbytky, což odpovídá rozpoznávacímu motivu pro jaderný exportní systém (Brownawell AM et al., 2001).

Biofyzikální studie charakterizující interakce mezi FOXO4, 14-3-3 $\zeta$  a fragmentem

DNA, jehož sekvence odpovídá sekvenci, na kterou se specificky váží FOXO proteiny *in vivo*, potvrdila, že fosforylace sama o sobě nestačí pro inhibici FOXO4 vazby na DNA. Dále bylo zjištěno, že dva vazebné motivy pro protein 14-3-3 fosforylované proteinkinasou B (PKB) jsou nezbytné pro efektivní interakci mezi transkripčním faktorem FOXO4 a dimerem 14-3-3 $\zeta$  proteinu. Bylo také prokázáno, že tvorba komplexu dvojnásobně fosforylovaného transkripčního faktoru FOXO4 (dpFOXO4) se 14-3-3 $\zeta$  proteinem má za následek téměř úplnou inhibici DNA vazebných vlastností FOXO4.

Dle těchto výsledků lze usuzovat, že interakce FOXO transkripčních faktorů se proteiny 14-3-3 je nejen nezbytná pro jejich rychlý export z jádra do cytoplazmy, ale i pro samotnou inhibici jejich DNA vazebných vlastností. Přesný molekulární mechanismus této inhibice DNA vazebných vlastností FOXO4 je však stále nejasný (Obsil T et al., 2003).

## 2 Cíle práce

- 1) Charakterizovat interakce mezi proteiny FOXO4 a 14-3-3 pomocí metod fluorescenční spektroskopie. Zjistit, zda při tvorbě komplexu dochází ke konformační změně FOXO4 a pokud ano, tak v jakých oblastech.
- 2) Navrhnout strukturní model komplexu FOXO4:14-3-3 na základě vzdáleností získaných pomocí měření FRET.
- 3) Provést detailní analýzu interakce DNA-vazebné domény FOXO4 s DNA pomocí cílené mutagenese a metody rezonance povrchového plazmonu.
- 4) Charakterizovat strukturní změny DNA-vazebné domény FOXO4 doprovázející vazbu DNA pomocí metod časově-rozlišené tryptofanové fluorescence.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Seznam laboratorního materiálu, chemikálií a přístrojů

#### Spotřební a laboratorní materiál

Laboratorním materiálem při přípravě proteinových mutantů a při provádění experimentů byl běžný laboratorní plast, sklo a jiné zcela běžné pomůcky (kádinky, odměrné válce, erlenmayerovy baňky, pipety, filtrační papír, zkumavky a mikrozukavky, lžičky a špachtle a další) a základní laboratorní přístroje (termobloček, vortex, předvážky, vodní lázeň, pH metr a další). Pokud byl použit materiál nástroj nebo přístroj specifický pro danou přípravu, či experiment, jeho detailní popis je uveden v popisu patřičné metody.

#### 3.1.1 Laboratorní materiál

Dialyzační membrána	Visking (USA)
dialyzační membrána (Molecular weight cut off) 14000	Carl Roth GmbH (Německo)
Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit	Invitrogen (USA)
filtry 45 µm Rotilabo-Spritzfilter (PVDF)	Carl Roth GmbH (Německo)
Gel Extraction Spin Kit	Genomed (SRN)
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences (Švédsko)
Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit/250	Genomed (SRN)
Jetquick Plasmid Miniprep spin kit	Genomed (USA)
kolony pro HPLC	Amersham Biosciences (Švédsko)
koncentrátor Centrikon	Millipore (USA)
křemenné kyvety	Agilent (USA)
Plasmid Miniprep Isolation kit	Genomed (SRN)
Purification Spin Kit	Genomed (SRN)
Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit	Stratagene (USA)
QuikChange kit	Stratagene (UK)

#### 3.1.2 Chemikálie

1,4-dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH (SRN)
1,5-IAEDANS	Thermoscientific (USA)
1Kb DNA Ladder	Invitrogen (USA)
5-IAF	Invitrogen (USA)
Agarosa	Carl Roth GmbH (SRN)
Agaróza type II	Sigma (USA)
Akrylamid	Carl Roth GmbH (SRN)

Ampicilin	Biotika (Slovenská republika)
Atp	Sigma (USA)
Atp	Thermoscientific (USA)
Bamhi	Thermoscientific (USA)
Biotin (vitamin B7)	LifeTechnologies (USA)
Boritá kyselina	Lachema (Česká republika)
Bromfenolová modř	Sigma (USA)
Bsa	Carl Roth GmbH (SRN)
Coomassie brilliant blue r-250	Carl Roth GmbH (SRN)
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema (Česká republika)
DNA primery	VBC-Genomics (Rakousko)
Dntp	Thermoscientific (USA)
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Carl Roth GmbH (SRN)
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného	Lachema (Česká republika)
Dpn I	New England Biolabs (USA)
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	Carl Roth GmbH (SRN)
Ethanol	Lachema (Česká republika)
Ethidium bromid	Sigma (USA)
FITC (fluorescein iso-thio-kyanát)	LifeTechnologies (USA)
Glycerol	Penta (Česká republika)
Glycin	Duchefa Biochemie (Nizozemsko)
Heptahydrát síranu nikelnatého	Penta (Česká republika)
Hydroxid sodný	Lachema (Česká republika)
Chloramfenikol	Sigma (USA)
Chlorid draselný	Lachema (Česká republika)
Chlorid sodný	Penta (Česká republika)
Chlorovodíková kyselina	Lachema (Česká republika)
Imidazol	Carl Roth GmbH (SRN)
IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid)	Carl Roth GmbH (SRN)
Isopropanol	Lachema (Česká republika)
Kyselina octová	Penta (Česká republika)
Lb agar (luria/miller)	Carl Roth GmbH (SRN)
Lb medium (luria/miller)	Carl Roth GmbH (SRN)
Lysozym	New England BioLabs (USA)
Lysozym	Serva (SRN)
Methanol	Lachema (Česká republika)
Methanol	Penta (Česká republika)
N, N,-metylen-bis-akrylamid	Carl Roth GmbH (SRN)
Náplně do kolon	Amersham Biosciences (Švédsko)
Ndei	Thermoscientific (USA)
Peroxodisíran amonný	Carl Roth GmbH (SRN)
Pfu turb polymerase	Stratagene (UK)



Pfu turbo buffer	Stratagene (UK)
Pgex-4T-1	Amersham (Švédsko)
Pka	Promega (USA)
Pkba	Upstate Biotechnology (USA)
Precision plus protein dual color standard	Bio-rad (USA)
Protease inhibitor cocktail	Sigma (USA)
Reakční pufr Tango	Thermoscientific (USA)
Sds	Sigma (USA)
Síran amonný	Penta (Česká republika)
Síran hořečnatý	Penta (Česká republika)
Síran nikelnatý	Penta (Česká republika)
$\beta$ -merkaptoethanol	Carl Roth GmbH (SRN)
T4 DNA ligasy	Thermoscientific (USA)
TEMED (N,N,N,,,N,-tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH (SRN)
TEV proteasa	Sigma (USA)
Thrombin	Sigma (USA)
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Carl Roth GmbH (SRN)
Triton X-100	Carl Roth GmbH (SRN)
Vektor pet-15b	Invitrogen (USA)
Xho	Thermoscientific (USA)
Xylen cyanol	Carl Roth GmbH (SRN)

### Oligonukleotidy pro vazebné experimenty

#### dsDNA - s motivem DBE

5'-Biotin-GACTATGTAAACAACGC-3'

5'-GCGTTGTTTACATAGTC-3'

- syntetické oligonukleotidy pro vytvoření

Biotinem značené dsDNA s motivem DBE

#### dsDNA - s motivem IRE

5'-Biotin-GACTATCAAAACAACGC-3'

5'-GCGTTGTTTTGATAGTC-3'

- syntetické oligonukleotidy pro vytvoření

Biotinem značené dsDNA s motivem IRE

#### dsDNA - nevazebný (náhodný) motiv

5'-Biotin-AACGTATGCTCTAGCCA-3'

5'-TGGCTAGAGCATACGTT-3'

- syntetické oligonukleotidy pro vytvoření

Biotinem značené dsDNA s nevazebným (náhodný) motivem

### 3.1.3 Přístroje

Analytické váhy R160V	Sartorius (Německo)
Centrifuga 5415D, rotor F45-24-11	Eppendorf(SRN)
Centrifuga 5804R, rotor A-4-44	Eppendorf (SRN)
Centrifuga K80, rotor S6/6,6	MLW (SRN)
Horizontální agarózová elektroforéza	Omni-bio (Česká republika)

Hplc-akta	Amersham Biosc. (Švédsko)
Iluminátor UVT 14-M	Herolab (SRN)
Inkubátor	Melag (SRN)
Mastercycler Personal	Eppendorf (SRN)
Peristaltická pumpa	Ismatec (Švýcarsko)
Ph metr jenway 3505	Feldsted (Velká Británie)
Sonikátor 3000 Misonix	Cole Parmer (USA)
Třepačka Orbital incubator	Gallenkamp (Velká Británie)
UV-VIS absorpční spektrofotometr Agilent 8453	Agilent (USA)
Vertikální polyakrylamidová elektroforéza	Bio-Rad (USA)
Vodní lázeň	Memmert (Německo)
Vortex Zx3	Velp Scientifica (Itálie)
Zdroj pro horizontální elektroforézu	Omni-bio (Česká republika)
Zdroj pro vertikální elektroforézu Consort EV243	Sigma-Aldrich (USA)
Nanodrop	Thermoscientific (USA)
Biflex	Bruker-Franzen (SRN)
Econo column	Bio-Rad (USA)
Proteon XPR36	Bio-Rad (USA)
Fluorimetr LS50B	Perkin Elmer (USA)
Spectra physics 375	Spectra Physics (USA)
Hamamatsu R3809U-50	Hamamatsu (Japonsko)
Spektrofotometr J-810	Jasco (USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava experimentálního materiálu

#### 3.2.1.1 Navržení pracovních konstruktů

Pracovní konstrukty proteinů byly připraveny tak, aby byly relevantní vzhledem k pokusům, aby odpovídaly sekvenci v níž se nacházejí domény a další místa významná pro experimenty a zároveň tak, aby je bylo možno připravit v rozpustné formě v buňkách *E.coli*. Začátek a konec sekvence byl zvolen tak, aby nezasahovaly do segmentů sekundární struktury.

Konstrukty proteinů určené pro specifické zavěšení fluorescenčních sond byly navrženy tak, aby jejich sekvence obsahovala pouze jeden cysteinový zbytek. Konstrukty proteinů 14-3-3 určené pro tryptofanová fluorescenční měření byly navrženy tak, aby neobsahovaly žádné tryptofanové zbytky, zatímco konstrukty proteinů FOXO4 tak, aby obsahovaly tryptofanové zbytky pouze na pozicích 173 a 174.

Konstrukty FOXO4 proteinů určených pro měření vazebné kinetiky při interakci s DNA pomocí metody SPR byly navrženy tak, aby v každém jednom konstruktu bylo pozměněno vždy pouze jeden aminokyselinový zbytek zodpovědný za kontakt s molekulou DNA a sice tak, aby se tento kontakt netvořil.

#### 3.2.1.2 Příprava pracovních konstruktů

Při přípravě komplementární cDNA požadovaného proteinu z genomové knihovny, jsou nejprve navrženy oligonukleotidy pro začátek polymerasové reakce (tzv. primery). Sekvence primeru je navržena tak, aby obsahovala sekvenci komplementární k námi požadovanému začátku (respektive konci) polymerasové reakce (cca 20 bází), dále sekvenci specifického štěpícího místa a tři až šest bází přesahu pro nasednutí polymerasy.

5' - xxx xxx/**specifické štěpící místo**/xxx xxx xxx xxx xxx xx - 3'

Při polymerasové řetězové reakci je tímto způsobem utvořen a namnožen úsek dsDNA odpovídající námi zvolené sekvenci se specifickými štěpícími místy na jeho koncích.

štěpící místo A/sekvence konstruktů/štěpící místo B

Vzorek produktu PCR reakce je dále identifikován podle své specifické velikosti při horizontální agarózové elektroforéze (popis metody viz kapitola 3.2.1.9 oddíl 13). Celý produkt PCR reakce je pak přečištěn pomocí PCR purifikační sady k výslednému

produktu přidány specifické štěpící enzymy A a B a patřičné reakční pufrы. Stejně specifické enzymy a pufrы jsou přidány k roztoku cílového vektoru a obě reakce jsou umístěny na určenou dobu do určené teploty. Po uplynutí reakce jsou produkty separovány na horizontální agarózové elektroforéze, izolovány z gelu pomocí izolační sady a přečištěny pomocí PCR purifikační sady. V purifikovaných roztocích by se v tu chvíli měl nacházet insert s tzv. lepivými konci vzniklými rozštěpením palindromické sekvence specifického štěpícího místa a ve druhém roztoku obdobně upravený cílový vektor.

Z výše zmíněných roztoků a dalších komponent je vytvořena ligační směs, kde dojde po inkubaci za určených podmínek ke spojení lepivých konců insertu s lepivými konci vektoru.

Po uplynutí inkubační doby jsou vzorkem transformovány kompetentní buňky, které se dále inkubují na pevném živném médiu (LB Agar). Z narostlých kolonií je odebrána kolonie, která je kultivována v tekutém živném médiu (LB médium = medium dle Luria-Bertani). Z tohoto živného média je izolována plazmidová DNA pomocí plazmidového izolační sady. Dále je pomocí vhodného enzymu provedeno specifické kontrolní štěpení, jehož výsledek je vizualizován pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Vybrané vzorky jsou zkontrolovány sekvenací. PCR byla prováděna na přístroji FT GENE 2D (Techne). Sekvence byla prováděna servisním celo-ústavním pracovištěm Středisko sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

#### **Navržená specifická štěpící místa:**

FOXO4<sub>82-207</sub>

NdeI specifické štěpící místo: CAT ATG

FOXO4<sub>11-213</sub>

XhoI specifické štěpící místo: CTC GAG

BamHI specifické štěpící místo: GGA TCC

14-3-3ζ

NdeI specifické štěpící místo: CAT ATG

BamHI specifické štěpící místo: GGA TCC

#### **Cílový vektor:**

pET15b (Novagen) (Příloha 5) pro 14-3-3ζ; FOXO4<sub>82-207</sub>

pGEX-4T-1 (Amersham) (Příloha 5) pro FOXO4<sub>11-213</sub>

## **PCR reakce:**

### Složení PCR reakce

- 1 µl Polymerasa Pfu turbo (Stratagene) ( $2,5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )
- 1 µl Templátová DNA (cca 40 nM)
- 5 µl Primer I (10 µM)
- 5 µl Primer II (10 µM)
- 1 µl dNTP (4 µM)
- 5 µl Pfu turbo buffer (Stratagene) (10x konc.)
- 33 µl dH<sub>2</sub>O
- výsledný objem 50 µl
- složení reakčního pufru Pfu turbo buffer: 0,1 M KCl; 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 M Tris-HCl (pH 8,8);  $2 \cdot 10^{-2}$  M MgSO<sub>4</sub>; 1% Triton X-100;  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  BSA

### Program PCR reakce

- 95 °C.....2 min (iniciační denaturace ds DNA)
- 95 °C.....30 s (denaturace dsDNA)
- 60 °C.....30 s (nasedání primerů)
- 68 °C.....30 s (elongace řetězce)
- 68 °C.....10 min (finální extenze)
- 4 °C.....+ ∞
- 25x cyklus denaturace dsDNA->nasedání primerů-> elongace řetězce

## **Restrikční štěpení:**

### Složení restrikční směsi

- 10 µl štěpené DNA
- 0,5 µl Enzym pro specifické štěpící místo A
- 0,5 µl Enzym pro specifické štěpící místo B
- 4 µl reakční pufr Tango (Thermoscientific)
- výsledný objem 20 µl; inkubace 12 h/37 °C
- složení reakčního pufru Tango: 33 mM Tris-kys. octová (pH 7.9 při 37 °C); 10 mM octan hořečnatý; 66 mM octan draselný; 0.1 mg/mL BSA

## **Ligace:**

### Složení ligační směsi

- 10 µl DNA insertu
- 2 µl DNA vektoru
- 1 µl T4 DNA ligasy (Thermoscientific)
- 2 µl T4 DNA ligasa reakční pufr (Thermoscientific)
- 5 µl dH<sub>2</sub>O
- výsledný objem 20 µl; inkubace 20 h/RT
- složení reakčního pufru T4 DNA ligasy: 400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT; 5 mM ATP (pH 7.8 při 25 °C)

### **Další použitý materiál**

Purifikace PCR produktu: Purification Spin Kit (Genomed)

Extrakce z agarózového gelu: Gel Extraction Spin Kit (Genomed)

Izolace plazmidové DNA: Plasmid Miniprep Isolation kit (Genomed)

### **3.2.1.3 Metoda PCR**

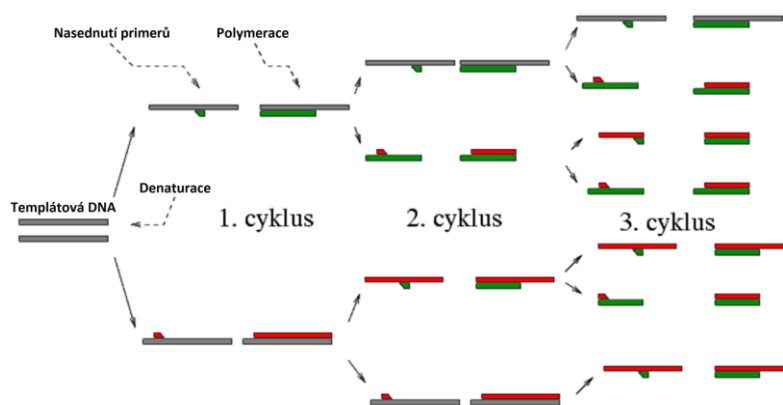
PCR, neboli polymerasová řetězová reakce, je postup využívající schopnosti enzymu polymerasy replikovat templátovou molekulu DNA za laboratorních podmínek *in vitro* s minimálními požadavky na průběh reakce. Pro správný průběh reakce je třeba do reakční směsi přidat několik základních složek ve vhodných koncentracích. Příliš nízké i příliš vysoké koncentrace mohou reakci inhibovat. Složky nutné pro průběh reakce jsou následující:

- templátová DNA, jako předloha pro replikaci
- směs deoxyribonukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), jako stavební materiál
- enzym DNA polymerasa
- primer I = oligonukleotid s komplementární sekvencí k požadovanému počátku replikace
- primer II = oligonukleotid s komplementární sekvencí k požadovanému konci replikace
- reakční pufr, který vytvoří prostředí o vhodném pH a iontové síle

Dále je třeba vhodně nastavit teplotní program, který musí obsahovat kroky za určité teploty a v určité době trvání pro:

- denaturaci dvouvláknové molekuly DNA
- nasednutí primerů na templátovou DNA
- polymerasovu replikaci

Tyto tři kroky se cyklicky opakují, a tím se geometrickou řadou s kvocientem 2 množí replikované molekuly DNA. Mimo to jsou ještě přidávány další kroky pro optimalizaci reakce (schéma na Obr. 18).



**Obr. 18 Průběh prvních tří cyklů reakce PCR.** Při polymerasové cyklické reakci PCR se cyklicky opakují kroky denaturace DNA, nasednutí primerů a replikace pomocí DNA polymerasy.

Reakce PCR je dnes prováděna plně automatizovanými přístroji, které přesně provádějí nastavený teplotní program s vysokou přesností držení teploty až  $\pm 0,4$  °C a rychlostí změny až 5 °C za 1 s.

#### 3.2.1.4 Cílená bodová mutagenese pomocí PCR

Cílená bodová mutagenese je metoda, při níž je pomocí PCR a vhodně navržených primerů možné nahradit bázi v sekvenci DNA jinou bází. Tato metoda je velmi delikátní a často nevyzpytatelná, jelikož pro zvýšení šance na záměnu báze je třeba pracovat s velmi dlouhými primery (pře 30 komplementárních bází), u kterých je velmi nesnadné určit teplotu nasedání primeru. V případě, že provádíme několik mutací v jednom úseku DNA, nedoporučuje se je zavádět najednou a je třeba tyto mutace generovat postupně. Znamená to, že jako templát pro následnou mutagenesi používáme sekvenaci ověřenou DNA z předchozí mutagenese. Postup přípravy mutantních konstruktů byl převzat z komerčně dodávaného setu pro mutagenesi QuikChange kit (Stratagene).

#### Mutagenesní PCR

##### Složení PCR reakce

1  $\mu$ l Polymerasa Pfu turbo (Stratagene) ( $2,5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )

5  $\mu$ l Templátová DNA (cca 10 nM)

1  $\mu$ l Primer I ( $2,5 \mu\text{M}$ )

1  $\mu$ l Primer II ( $2,5 \mu\text{M}$ )

2,5  $\mu$ l dNTP ( $1,6 \text{ mM}$ )

5  $\mu$ l Pfu turbo buffer (Stratagene) (10x konc.)

34,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

- výsledný objem 50  $\mu$ l

- složení reakčního pufru Pfu turbo buffer: 0,1 M KCl; 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 M Tris-HCl (pH 8,8);  $2 \cdot 10^{-2}$  M MgSO<sub>4</sub>; 1% Triton X-100;  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  BSA

### Program PCR reakce

95 °C.....1 min (iniciační denaturace dsDNA)

95 °C.....30 s (denaturace dsDNA)

70 °C.....30 s (nasedání primerů)

68 °C.....12 s (elongace řetězce)

68 °C.....12 min (finální extenze)

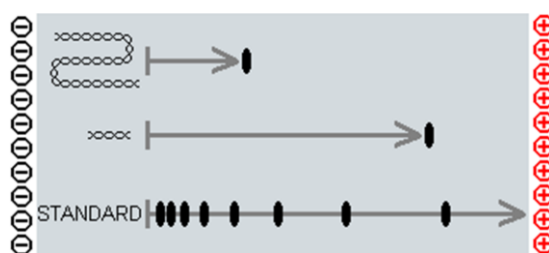
4 °C.....+ ∞

25x cyklus denaturace dsDNA->nasedání primerů-> elongace řetězce

Cílená bodová mutagenese byla prováděna na PCR přístroji FT GENE 2D (Techne). Po ukončení PCR byl k reakci přidán 1  $\mu\text{l}$  enzymu DpnI (New England Biolabs) ( $2,5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) specificky štěpící methylovanou DNA a směs byla inkubována 2 h při 37 °C. Po inkubaci byly DNA transformovány kompetentní buňky *E.coli* kmene TOP10 pro amplifikaci, izolaci a následné ověření inkorporace mutace sekvenací. Sekvence byla prováděna servisním celo-ústavním pracovištěm Středisko sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

### 3.2.1.5 Elektroforéza na TBE-agarózovém gelu

Pro ověření průběhu PCR reakce lze použít metody horizontální agarózové elektroforézy. Díky celkovému negativnímu náboji se DNA pohybuje v elektrickém poli v nedenaturujícím prostředí směrem k anodě a díky charakteru agarózového gelu dochází k rozdělení fragmentů DNA dle velikosti, delší fragmenty DNA migrují gelem pomaleji než kratší (Obr. 19).



**Obr. 19 Schematické uspořádání a princip agarózové elektroforézy DNA.** *Vzhledem k celkovému negativnímu náboji molekuly DNA putují fragmenty ke kladně nabitě elektrodě. Vzhledem k polymerní struktuře gelu putují kratší fragmenty gelem rychleji než delší. Pro identifikaci velikostí fragmentů DNA se používá standard se směsí fragmentů DNA o známých velikostech.*



Tato metoda byla používána, kdykoliv bylo třeba ověřit průběh PCR reakce před dalším postupem, nebo zhodnotit DNA fragmenty z hlediska velikosti. Pro identifikaci velikostí fragmentů DNA se používá standard se směsí fragmentů DNA o známých velikostech. Pro lepší migrační vlastnosti a manipulaci se vzorkem je ke vzorku přidáván 1x koncentrovaný pufr pro přípravu vzorků.

#### **Složení 1% agarózového gelu**

0,45 g Agaróza Type II (Sigma-Aldrich)

45 ml TBE pufr

#### **20× koncentrovaný TBE pufr:**

121 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

61,7 g Kyselina boritá

7,44 g EDTA

- doplněno vodou do 1 litru

#### **6x koncentrovaný Pufr pro přípravu vzorků:**

50% Glycerol

0,5% Bromfenolová modř

0,5% Xylen cyanol

Vzorky byly připraveny smícháním 8  $\mu$ l roztoku amplifikované DNA se 4  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku. Jako standard molekulových hmotností byl použit 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) vhodný pro identifikaci fragmentů DNA s velikostí od 500 párů bází do 12 000 párů bází.

Elektroforéza byla provedena v horizontální poloze v prostředí 1× koncentrovaného TBE pufru po dobu 1 hodiny při napětí 75 V. Po ukončení elektroforézy, byl gel inkubován 1 hodinu s roztokem ethidium bromidu o koncentraci 10  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V molekule DNA dochází k interkalaci molekul ethidium bromidu, které po ozáření ultrafialovým světlem fluoreskují.

### **3.2.1.6 Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA**

Transformace bakteriálních buněk je proces, při kterém buňky přijímají cizí plazmidovou DNA do svého vnitřního prostředí. V zásadě vychází z přirozené vlastnosti bakterií přijímat mikročástice ze svého okolí a replikovat cizorodou DNA společně se svou vlastní. Aby byl tento proces urychlen a usnadněn, používá se pro transformaci například metoda teplotního šoku.

Pro transformaci byly používány dva kmeny buněk. Pro biologickou amplifikaci DNA byl používán kmen *E. coli* TOP10 (Stratagene), zatímco pro exprese proteinů kmen *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene).

### **Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA - postup**

45  $\mu$ l roztoku suspenze kompetentních buněk bylo smícháno s 1-5  $\mu$ l amplifikované mutantní plazmidové DNA. Následovala 30 minut inkubace při teplotě 0 °C (na ledu). Poté následoval teplotní šok: vzorek byl inkubován 45 sekund ve vodní lázni o teplotě 42 °C a následně inkubován 2 minuty na ledu. Dále bylo ke vzorku přidáno 450  $\mu$ l LB media předehřátého na 42 °C a vzorek byl inkubován 1 hodinu při 37 °C a konstantních otáčkách 190 rpm (z anglického "revolutions per minute"). Následně byla celá reakční směs (cca 1ml) nanesena na Petriho misku s LB Agarem (LB Agar s obsahem ampicilinu o koncentraci 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) a 12 hodin inkubovaná při 37 °C. Agarová miska s narostlými koloniemi byla uskladněna při 4 °C. Námi používané plazmidy obsahují oblast kódující rezistenci na antibiotikum ampicilin. Za přítomnosti ampicilinu v živném mediu dojde k vytvoření kolonií pouze těch bakterií, jež byly transformovány takovým plazmidem.

**LB médium:** 10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto-yeast extrakt, 10 g NaCl, pH upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,4, doplněno destilovanou vodou na objem 1 litr

**LB agar:** LB médium s obsahem 1,5 % agaru

### **3.2.1.7 Izolace plazmidové DNA**

Před samotnou izolací je potřeba namnožit transformované buňky v dostatečném množství. Pro izolaci pomocí sady Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit/250<sup>®</sup> (Genomed) postačí pro dostatečné množství izolované DNA napěstovat 5 ml bakteriální kultury. Za tímto účelem bylo připraveno 5 ml sterilního LB média s Ampicilinem (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) ve zkumavce. Toto médium bylo sterilně naočkováno bakteriemi z jedné kolonie a kultura byla inkubována 12 h při teplotě 37 °C a otáčkách 200 rpm. Princip izolace spočívá v centrifugaci buněk při 10 000 G (oddělení buněk od LB média), jejich resuspendaci, lyzi a odstranění nečistot srážením. Roztok DNA se poté přenesse na kolonku s matricí, na níž se molekuly DNA zachytí. Následuje promývání aplikací promývacích roztoků v daném pořadí a opakované centrifugace. Na závěr se plazmidová DNA eluuje dH<sub>2</sub>O o teplotě 65 °C. Získaná plazmidová DNA je skladována při teplotě -20 °C. Sada Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit/250<sup>®</sup> (Genomed) obsahuje podrobný návod k provedení izolace, včetně složení roztoků a veškerý potřebný materiál.

### 3.2.1.8 Exprese pracovních konstruktů

Expresa rekombinantních proteinů v buňkách *E. coli* je možná díky designu expresních vektorů, které disponují sekvencemi potřebnými k zahájení exprese v prokaryotickém expresním systému. V případě používaného pET-15b je takovou sekvencí T7 promotor. Optimální průběh exprese je možné ovlivnit řadou parametrů, jako jsou teplota, délka exprese, či složení média. Tyto parametry mohou ovlivnit výtěžek, vnitrobuněčnou lokalizaci proteinu i kvalitu exprimovaného proteinu.

Pro expresi konstruktů, které jsou předmětem této práce byl používán kmen buněk *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen).

#### **Expresa pracovních konstruktů - postup**

Před samotnou expresí bylo potřeba připravit očkovací inokulum, tedy 5 ml plně narostlé bakteriální kultury s DNA exprimovaného konstruktů. Za tímto účelem byla provedena transformace buněk *E. coli* BL21(DE3), v LB médiu s obsahem antibiotika Ampicilinu o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , plazmidem se sekvencí požadovaného konstruktů. Stěrem z Petriho misky s narostlými transformovanými buňkami byly sterilně zaočkovány dvě 5 ml kultury (též s obsahem Ampicilinu o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Tyto kultury (tzv. inokula) byly inkubovány při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a otáčkách 200 rpm po dobu 12 h. Po uplynutí této doby byla kultura stočena na centrifuze 10 minut při otáčkách 4000 rpm. Následně byla kultura resuspendována v 5 ml čerstvého LB média. Každým tímto inokulem byl zaočkován 1 L LB média (s obsahem Ampicilinu o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Takto zaočkovaná kultura byla inkubována při  $37^\circ\text{C}$  a otáčkách 200 rpm do dosažení optické denzity (OD) o absorbanci (při vlnové délce 600 nm) rovné 0,6 - 0,8 (obvykle po 4 - 5 h). Absorbance byla měřena na přístroji HP8542 (Agilent Technologies). V tento moment byla indukována exprese proteinu přidáním roztoku IPTG do finální koncentrace 0,2 - 1 mM. Po indukci byla teplota inkubace snížena na  $20^\circ\text{C}$  a kultura dále inkubována 20 h. Po uplynutí této doby byla kultura stočena na centrifuze Refrigerated centrifuge K80 (MLW) při  $4^\circ\text{C}$ , otáčkách 3600 rpm po dobu 20 minut. Pelety bakteriální kultury byly resuspendovány 35 ml lyzačního pufru (pro složení viz kapitolu 3.2.1.9 oddíl 1) a uchovány při teplotě  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.2.1.9 Purifikace pracovních konstruktů

Purifikace proteinů, je série metod pro získání roztoku pokud možno co nejčistšího proteinu, tedy roztoku maximálně zbaveného všech neproteinových nečistot i dalších buněčných proteinů. K čištění proteinu se využívá různých chemických a fyzikálních vlastností proteinů (afinita k různým matricím, termo-stabilita, velikost, isoelektrický

bod, rozpustnost proteinu a další), jakož i jeho speciální modifikace například afinitní kotvou. Při provádění purifikačních metod se pak nastavují vlastnosti prostředí tak, aby se námi purifikovaný protein svými aktuálními fyzikálně chemickými vlastnostmi odlišoval o dalších komponent roztoku, zároveň však také tak, aby protein nebyl poškozen a zachoval si co nejpřirozenější formu. Využití metod a podmínky purifikace se u jednotlivých proteinů liší, proto v této části nejprve obecně popíši princip jednotlivých použitých purifikačních metod a teprve v další části uvedu konkrétní purifikační postup a podmínky purifikace pro jednotlivé proteinové konstrukty.

## **1. Sonikace buněk**

Sonikace je obvykle prvním krokem purifikace proteinu. Dochází při ní k rozbití buněčných stěn bakterií ultrazvukem. Aby nedošlo k poškození proteinu, je nutné používat pouze omezenou intenzitu ultrazvuku. Stěna bakterií se proto nejprve narušuje mechanicky zamražením buněk na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následným rozmražením a biochemicky působením enzymu lysozemu v přídávku 0,1 mg na 1 ml buněčné kultury. Kultura se při sonikaci zahřívá a proto je nutné sonikaci provádět v ledové lázni. Dále je možné protein chránit přídatkem inhibitorů proteas, jakým je například PMSF (phenylmethylsulfonyl fluorid), protože proteasy v této fázi ještě nebyly z roztoku odstraněny a protein je značně vystaven jejich působení. Složení sonikačního (lyzačního) pufru musí být nastaveno také vzhledem k dalším purifikačním metodám. Rovněž délka jednoho ultrazvukového pulzu, pauzy mezi pulzy a celková délka sonikace musí být nastavena vzhledem k odolnosti proteinu a být k němu šetrná. Bezprostředně po samotné sonikaci následuje obvykle ultracentrifugace za vysokých otáček. Sonikace byla prováděna na přístroji Misonix sonicator (Cole Parmer).

## **2. Ultracentrifugace**

Ultracentrifugace je centrifugace za velmi vysokých otáček, kdy veškeré v cytosolu nerozpuštěné buněčné komponenty jsou odstředivou silou usazeny na dno centrifugační kyvety, zatímco v supernatantu nad takto vzniklou peletou zůstávají veškeré rozpuštěné složky. Pokud tedy exprimujeme cytosolický protein, zajímá nás dále právě tento supernatant. Pokud exprimujeme proteiny plazmatické membrány, nebo proteiny exprimující se do inkluzních tělísek, je předmětem další purifikace peleta nacházející se na dně zkumavky. Centrifugace byla provedena u všech konstruktů obdobně, a sice rychlostí 13 000 rpm po dobu 45 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V našem případě byly purifikovány cytosolické proteiny, tedy proteiny nacházející se v supernatantu. Ten byl také okamžitě dále zpracován afinitní chromatografií.

### 3. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie v jakémkoliv uspořádání využívá odlišných afinitních vlastností proteinů za různých podmínek. Podmínky prostředí jsou nastaveny tak, aby námi požadovaný protein měl za daných podmínek nejvyšší afinitu k vazebné matici a obsadil maximum vazebných míst na této matici. Jedním z parametrů prostředí je tedy vazebná matrice. Dalším parametrem je iontová síla prostředí nebo pH prostředí. Důležitým parametrem pro čistotu roztoku proteinu získaného touto metodou je poměr vazebné matrice k odhadovanému množství proteinu. Pokud použijeme příliš mnoho matrice, nabízíme vazebná místa proteinům s nižší afinitou a výsledný roztok jimi bude kontaminován. Pokud použijeme příliš málo matrice, neúmyslně si tím snižujeme výtěžek metody. Dalším parametrem k ovlivnění výsledku metody je množství a složení promývacích roztoků, zejména přidavek elučního pufru do promývacího roztoku v druhé fázi promývání. Afinitní chromatografii můžeme provádět gravitačně, pomocí peristaltické pumpy nebo s použitím FPLC nebo HPLC přístroje. Výhodou provádění afinitní chromatografie na FPLC nebo HPLC přístroji, je možnost lepšího sledování průběhu chromatografie a možnost využití gradientové eluce. Ovšem v případě, kdy afinitní chromatografie navazuje přímo na sonikaci a ultracentrifugaci, je roztok příliš viskózní a nelze těchto přístrojů přímo použít.

Při provádění afinitní chromatografie, je nejprve za vazebných podmínek na kolonu s aktivovanou a ekvilibrovanou maticí nanesen roztok s purifikovaným proteinem, po té je kolona promyta ekvilibračním pufrem, dále ekvilibračním pufrem s malým přídavkem elučního pufru a následně je protein eluován elučním pufrem, což je roztok, který navodí takové podmínky, že purifikovaný protein ztratí vazebnou afinitu k matici. Eluce se obvykle provádí do jednotlivých mikrozkušavek po malém množství a výsledek je po té analyzován například pomocí měření proteinové koncentrace roztoku nebo vertikální elektroforézy na akrylamidovém gelu SDS-PAGE.

### 4. Afinitní chromatografie na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze

Tento typ afinitní chromatografie využívá chelatačních účinků Ni<sup>2+</sup> iontů na polypeptidový řetězec tvořený šesti, někdy osmi histidiny (aminokyselina s imidazolovým postranním řetězcem). Sekvence kódující takovýto polypeptid je součástí expresních vektorů a sekvence proteinů jsou do vektoru zaneseny tak, aby tento řetězec, zvaný též afinitní kotva byl součástí exprimovaného proteinu na N-, nebo C- konci. Mezi sekvencí samotného proteinu a afinitní kotvy (obecně) se může vyskytovat ještě sekvence pro specifické odštěpení afinitní kotvy (například pro štěpení enzymem thrombin). Při přípravě matrice na novou chromatografii musí být matrice nabita Ni<sup>2+</sup> ionty a ekvilibrována roztokem, který vytvoří vhodné prostředí pro navázání proteinu. Pro eluci

proteinů z matrice se používá roztok s vyšší koncentrací imidazolu. Volný imidazol má větší afinitu k  $\text{Ni}^{2+}$  iontům navázaným na matici a protein s histidinovou kotvou vytěsňuje.

## **5. GST afinitní chromatografie**

Glutathion-S-transferasa (GST) je dalším používaným typem afinitní kotvy, kterou je možno exprimovat ve fúzi s proteinem. Při purifikaci se využívá její afinita k matici nabitá navázáním Glutathionu (např. GLU-SEPHAROSE™ Fast Flow, Amersham Biosciences). Protein s fúzí GST se naváže na matici nabitou Glutathionem a po promytí se eluuje redukovaným Glutathionem, který má ke GST vyšší afinitu než navázaný Glutathion. Komerčně dodávaná TEV proteasa (Sigma Aldrich) rovněž fúzována s GST i His-tag afinitní kotvou díky čemuž ji lze velmi snadno po štěpení z roztoku odstranit.

## **6. Specifické štěpení thrombinem**

Thrombin je přirozený enzym z rodiny serin proteas specificky rozpoznávající a štěpící sekvenci Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser. Tato sekvence je v expresním vektoru pET-15b umístěna za sekvencí histidinové afinitní kotvy, díky čemuž je možné z fúzního proteinu histidinovou kotvu odštěpit. Pro správné určení množství použitého thrombinu je nutné zjistit přibližnou stávající koncentraci roztoku proteinu. Po přidání patřičného množství enzymu je směs inkubována 12 hodin při 4 °C.

## **7. Specifické štěpení TEV proteasou**

TEV proteasa (proteasa virů tabákové mozaiky, "Tobacco Etch Virus" (Lucast TS et al., 2001) je enzym, který rozpoznává sekvenci Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) a specificky ji štěpí mezi Gln a Gly/Ser. Pro použití správného množství TEV proteasy je nutné zjistit přibližnou stávající koncentraci proteinu v roztoku. Po té je přidáno patřičné množství TEV proteasy (Sigma Aldrich) a vzorek je inkubován po dobu 80 minut při 37 °C a konstantních otáčkách 190 rpm.

## **8. Kationtová výměnná chromatografie**

Kationtová výměnná chromatografie je metoda, která se obecně používá k separaci částic nesoucích kladný náboj. Vzhledem k amfipatickému charakteru proteinů lze pomocí pH prostředí navodit u purifikovaného proteinu žádoucí náboj. Pomocí on-line webových nástrojů pod záložkou ProtParam na webové stránce expasy.org lze na základě primární sekvence proteinu určit teoretický izoelektrický bod proteinu (pI) tedy pH při kterém má protein teoreticky neutrální náboj. Převědeme-li potom protein do prostředí o

nižším pH, než je jeho pI, bude mít protein celkově kladný náboj. Všechny proteiny, které budou mít při tomto pH neutrální, nebo záporný náboj se na matrici určenou k zachycení kladně nabitých částic nezachytí. Podstatou separace je tedy elektrostatická interakce kladně nabitých částic s negativně nabitou matricí, kterou je naplněna chromatografická kolona. Na matrici dochází k výměně kationtů  $\text{Ni}^{2+}$  za proteiny nesoucí kladný náboj, jež se na ní za vhodných podmínek váží silnějšími elektrostatickými interakcemi. Následná eluce je prováděna pufrem se vzrůstajícím gradientem iontové síly. Podobně jako u výše popsaných typů chromatografií je matrice na koloně nejprve ekvilibrována vhodným pufrem. Následně je nanesen roztok purifikovaného proteinu. Dále je kolona promyta promývacím pufrem a na závěr je protein eluován elučním pufrem.

## **9. Aniontová výměnná chromatografie**

Aniontová výměnná chromatografie je obdobou kationtové výměnné chromatografie s tím rozdílem, že protein je převeden do roztoku o vyšším pH než je jeho pI a tím je u něj dosaženo celkového negativního náboje, tudíž se protein váže na kladně nabitou matrici.

## **10. Gelová permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie je chromatografická metoda, při které jsou molekuly separovány na základě své velikosti ("molekulární hmotnosti") a tvaru. Náplň chromatografické kolony tvoří gel obsahující pórovité částice. Molekuly, jejichž průřez je menší než průřez pórů gelových částic, vstupují do gelových částic a jejich pohyb kolonou je zpomalován oproti pohybu mobilní fáze. Molekuly, které jsou větší než póry v gelových částicích, s náplní kolony neinteragují. Obecně platí, že větší molekuly projdou kolonou rychleji, než ty menší. Postup gelové permeační chromatografie vyžaduje nejprve obvyklou ekvilibraci vodícím pufrem. Dále je na kolonu nanesen roztok s purifikovaným proteinem. Objem naneseného vzorku je vzhledem k vlastnostem kolony objemově velmi omezen, pokud by se nanášelo více vzorku, než je doporučeno, dojde k nekvalitnímu rozdělení proteinů. Gelovou permeační chromatografií lze též použít k výměně pufru proteinového roztoku místo dialýzy, nebo k odstranění nízkomolekulárních látek. Nevýhodou takového postupu je naředění vzorku, které je s gelovou permeační chromatografií spojeno.

## **11. Dialýza**

Dialýza je separační metoda, které lze použít k odstranění nízkomolekulárních látek z roztoků proteinů, nebo též ke změně složení roztoku, ve kterém je protein rozpuštěn. Při

této metodě se používá membrána tvaru střívka (tzv. dialyzační střevo) s vhodnou velikostí pórů. Membrána je nepropustná pro látky větší velikosti, než je velikost pórů (proteiny) zatímco nízkomolekulární látky (např. soli, ale třeba i velmi malé proteiny) se pohybují přes membránu ve směru klesajícího gradientu elektrochemického potenciálu. Proteinové frakce se po jednotlivých purifikačních krocích obvykle dialyzují z toho důvodu, že pro další purifikační krok nebo pro další experimenty je nezbytná změna složení roztoku, ve kterém je protein rozpuštěn. Dialýza je obvykle prováděna při 4 °C ve stonásobném nadbytku dialyzačního roztoku po dobu 8 h.

## **12. Zkoncentrování roztoku proteinu**

Některé purifikační metody vzhledem ke své kapacitě vyžadují značně koncentrovaný roztok proteinu (např. gelová permeační chromatografie). Navíc při provádění některých purifikačních metod může docházet k naředění roztoku proteinu a to zejména během eluce proteinu a následné dialýzy. Proto je obvykle v některé fázi purifikace nutné zvýšit koncentraci proteinu separováním části rozpouštědla. Také po ukončení purifikace je v některých případech nezbytné zvýšit koncentraci proteinu, neboť vyšší proteinová koncentrace může být nutná pro další experimenty. Pro zkoncentrování roztoku proteinu se mohou použít koncentrátoři, kde horní (později blíže ke středu rotoru) část tvoří zkumavka, na jejímž dně je umístěná celulosová membrána propustná pro molekuly o určité velikosti. Dolní část koncentrátoru tvoří sběrná zkumavka, do které je jímán roztok, který během centrifugace projde přes membránu. Pro zkoncentrování všech našich proteinových konstruktů byly použity koncentrátoři Centrikon s membránou s prostupem molekul menších než 10 000 kDa (Milipore).

## **13. Vertikální elektroforéza SDS - PAGE**

Vertikální elektroforéza SDS–PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) je metoda, které se používá k vizualizaci a analýze složení proteinového roztoku. Účinkem SDS proteiny denaturují a získávají jednotný záporný náboj a tyčinkovitý tvar. Díky tomu, že v prostředí SDS mají všechny molekuly proteinů jednotný náboj, se při průchodu proudem roztokem pohybují všechny směrem k anodě. Polyakrylamidový gel, na který je vzorek nanášen a jenž brání volnému postupu proteinů od katody k anodě, obsahuje ve své struktuře póry, jejichž velikost je srovnatelná s velikostí proteinů. Molekuly proteinů jsou tak separovány na principu „molekulového síta“ vzhledem ke své velikosti neboli molekulové hmotnosti. Malé proteiny se pohybují polyakrylamidovým gelem rychleji než velké proteiny. Polyakrylamidový gel má dvě části. Kratší část s jamkami pro nanášení vzorků tvořenou řidším gelem, kde dochází během migrace k seskupení migrujících proteinů z dané vzorkové jamky, se nazývá



zaváděcí nebo též zaostřovací gel (složení viz Tab. 1). Delší část pak tvoří separační gel o vhodné hustotě (složení viz Tab. 1). Po určité době od spuštění separace je proces zastaven a proteiny jsou vizualizovány barvou obsahující například modř Coomasie, která specificky barví proteiny.

### **Roztoky pro přípravu gelů:**

#### Pufr pro separační gel (pH 8,8):

75 ml 2 mol.dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 8,8)

4 ml 10% SDS

21 ml dH<sub>2</sub>O

#### Pufr pro zaváděcí gel (pH 6,8):

50 ml 1 mol.dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 6,8)

4 ml 10% SDS

46 ml dH<sub>2</sub>O

#### 10x koncentrovaný TBE pufr:

50 g Tris-HCl

144 g Glycin

10 g SDS

- doplněno vodou do 1 litru

**Tab. 1 Příprava 12% akrylamidového gelu pro SDS-PAGE.**

	separační gel	zaváděcí gel
30% Akrylamid	3 ml	0,25 ml
Pufr + SDS	2 ml	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	2,6 ml	1,1 ml
Persulfát amonný	50 µl	25 µl
TEMED	7,5 µl	4 µl

### **Roztoky pro vizualizaci proteinů:**

#### Barvicí roztok:

1g „Coomasie Blue“ R-250

450 ml Methanol

450 ml dH<sub>2</sub>O

100 ml Kyselina octová 70%

#### Odbarvovací roztok:

100 ml Metanol

100 ml Kyselina octová 70%

800 ml dH<sub>2</sub>O

#### Pufř pro přípravu vzorků:

0,6 ml 1 mol.dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 6,8)

5 ml 50% Glycerol

2 ml 10% SDS

0,5 ml β-Merkaptoethanol

1 ml 1% Bromfenolová modř

0,9 ml dH<sub>2</sub>O

#### 3.2.1.10 Fosforylace proteinů

Fosforylace proteinů je reakce, při které je fosfátová skupina (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) navázána na serinové, nebo Treoninový zbytek za katalytické aktivity vhodné protein-kinasy přičemž zdrojem fosfátové skupiny jsou molekuly ATP (adeosin-trifosfát). K fosforylaci FOXO4 proteinových konstruktů byla použita komerčně dodávaná proteinkinasa PKBα (specifická aktivita 579 U.mg<sup>-1</sup> o koncentraci 0,4 mg.ml<sup>-1</sup>) (Upstate Biotechnology). Množství použité kinasy se teoreticky řídí vztahem: „1 jednotka (Unit) aktivity PKBα odpovídá 1 nmol fosfátu navázaného na modelový peptid „Crossite“ o koncentraci 30 μM za jednu minutu při 30 °C a v přítomnosti 100 μM ATP“. V našem případě byly fosforylovány aminokyselinové zbytky Thr28 a Ser193 v sekvenci proteinu FOXO4. Množství použité PKBα bylo 9 U na 1 mg proteinu FOXO4. Fosforylace probíhala 2 h při 30 °C za přítomnosti 20 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,75 mM ATP.

#### 3.2.1.11 Značení sondou 1,5-IAEDANS

1,5-IAEDANS(5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonová kyselina) je fluorescenční sonda, kterou je možné specificky kovalentně navázat na cysteinový zbytek v molekule proteinu. Excitační vlnová délka této sondy je 336 nm a emisní vlnová délka 490 nm. Tato sonda je vhodná pro svou relativně dlouhou dobu života excitovaného stavu, 15 - 20 nanosekund, pro měření časově rozlišené fluorescence a díky svému absorpčnímu a emisnímu spektru i pro měření Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Na jedné straně se její absorpční spektrum překrývá s emisním spektrem tryptofanu a stává se tím akceptorem fluorescence při přenosu energie a na druhé straně se její emisní spektrum překrývá s absorpčním spektrem např. fluoresceinu, čímž může zastávat roli donoru fluorescence.

Všechny proteinové konstrukty značené sondou 1,5-IAEDANS byly nejprve dialyzovány proti redukčnímu pufru o složení: 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA a 5 mM DTT.

Následně byla provedena několikanásobná dialýza proti pufru pro značení sondou

1,5-IAEDANS nebo gelová filtrace rovněž s použitím tohoto pufru za účelem odstranění DTT, jež nesmí být při značení přítomno. Pro značení byly použity vždy 1 - 2 mg proteinu o přibližné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Pro značení byl použit čtyřiceti násobný molární nadbytek sondy 1,5-IAEDANS ( $M_r$  1,5-IAEDANS je 434,25  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Reakce byly inkubovány 2 h při 30  $^\circ\text{C}$  a dále byla reakční směs ponechána 12 h při 4  $^\circ\text{C}$ . Po uplynutí této doby byla přebytečná sonda odstraněna dialýzou proti pufru pro značení a dále purifikována gelovou filtrací v prostředí téhož pufru. Účinnost navázání sondy byla ověřena spektrofotometricky. Rovněž byl stanoven poměr navázané a volné sondy v roztoku. Molární absorpční koeficient sondy při vlnové délce 336 nm je roven 5700  $\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$ . Dále byla provedena korekce pro absorpci sondy při vlnové délce 280 nm. Absorpční koeficient při této vlnové délce byl určen z poměru absorbancí volné sondy při  $\lambda = 336$  nm a  $\lambda = 280$  nm a absorpčního koeficientu při  $\lambda = 336$  nm. Řádně označené proteiny, tj. proteiny s poměrem jedna sonda na jednu molekulu proteinu byly použity k dalším experimentům.

**Pufr pro značení sondou 1,5-IAEDANS:**

50 mM Tris-HCl (pH = 7,5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA

### 3.2.1.12 Značení sondou 5-IAF

Fluorescenční sonda 5-IAF (5-iodoacetamidofluorescein) (Invitrogen) byla použita pro značení monomerních konstruktů 14-3-3 $\zeta$ , kde při experimentech FRET sloužila jako akceptor fluorescence při rezonančním přenosu energie. Pro značení byl použit protein o koncentraci 40  $\mu\text{M}$  v pufru: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA a sonda 5-IAF ve čtyřiceti molárním nadbytku. Směs byla inkubována 8h při 4  $^\circ\text{C}$ . Nadbytečná sonda byla odstraněna dialýzou proti stejnému pufru jako při gelové permeační chromatografii. Stechiometrie navázání sondy byla stanovena změřením absorbance při vlnové délce 492 nm s použitím extinkčního koeficientu 78 000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Efekt značení sondou byl shledán 99 - 100%.

### 3.2.1.13 Měření koncentrace proteinů

Koncentraci proteinů v roztoku lze určit změřením absorbance roztoku při 280 nm. Světlo o této vlnové délce je pohlcováno zbytky tryptofanu, tyrosinu a cysteinu. Při známé sekvenci proteinu lze pak určit jeho molární absorpční koeficient a vypočítat koncentraci proteinu v roztoku. Absorbance roztoku proteinu se měří proti roztoku o stejném složení avšak prostého proteinů. V našem případě byla absorbance měřena na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific). Molární absorpční koeficient byl určen pomocí on-line softwareového nástroje pod záložkou ProtParam na webové stránce expasy.org.

### 3.2.1.14 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie lze využít k ověření modifikací proteinové sekvence. Analyzovaný protein je specificky rozštěpen na definované peptidy, které jsou zachyceny na matici pro použití s metodou MALDI-TOF (MALDI= "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization", TOF="time-of-flight"). Zachycená částice je společně s matricí ionizována dusíkovým laserem, ionty jsou urychleny silným elektromagnetickým polem a vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Zde se měří doba letu částice, z níž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice. Porovnáním molekulové hmotnosti nemodifikovaných a modifikovaných peptidů lze konstatovat přítomnost modifikace.

V našem případě byla takto ověřována fosforylace proteinů a značení fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS. Měření a analýzu hmotnostní spektrometrie všech modifikací provedl RNDr. Miroslav Šulc, PhD., v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Metoda MALDI-TOF byla provedena na hmotnostním spektrometru BIFLEX (Bruker-Franzen).

### 3.2.1.15 Exprese a purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub>

#### 1. Exprese proteinu

Expresa všech proteinových konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> probíhala v buňkách *E.coli* BL21(DE3) po dobu 20 h za teploty 20 °C a konstantních otáček 200 rpm ve 2 L LB média s koncentrací Ampicilinu 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Indukce exprese proběhla přidavkem IPTG do finální koncentrace 0,2 mM při OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8.

#### 2. Sklizení buněk

Po uplynutí doby exprese proteinu byly buňky peletovány ve velkokapacitní centrifuze K80 (MLW) po dobu 20 minut při 4 °C a rychlosti otáček 7500 rpm. Peleta buněk byla resuspendována 40 ml pufru pro sonikaci a purifikaci na GST chelatující sepharóze a uložen do -80 °C.

#### 3. Sonikace

Sonikace byla provedena v ledové lázni na přístroji Misonix. Suspenze buněk byla nejprve vyjmuta z -80 °C a ve studené vodě rozmrazena. Poté byl přidán lysozym v množství 0,1 mg na 1 ml buněčné suspenze a suspenze byla inkubována na míchadle 20 minut při 4 °C. Následně byla suspenze sonikována čtyřmi osmiminutovými pulzy, s dvouminutovými přestávkami, při výkonu sonikátoru 50 W.

#### **4. Ultracentrifugace**

Ultracentrifugace byla provedena na přístroji Eppendorf 5804R po dobu 45 minut při maximálních otáčkách tj. 13 000 rpm a při teplotě 4 °C.

#### **5. GST afinitní chromatografie**

GST afinitní chromatografie byla provedena s použitím peristaltické pumpy (Ismatec) (pouze eluce proteinu byla vždy provedena gravitačně), ve skleněné koloně (Econo column, Bio-rad) naplněné 5 ml gelové matrice GST-sepharózou (Amersham Biosciences). Postup purifikace byl následovný:

1. 20 ml dH<sub>2</sub>O (promytí, průtok 2 ml/min)
2. 20 ml vodící pufr pro GST-Sep. (ekvilibrace, průtok 2 ml/min)
3. nanesení sonikátu (průtok 1 ml/min)
4. 250 ml vodící pufr pro GST-Sep. (promytí, průtok 2 ml/min)
5. 20 ml eluční pufr pro GST-Sep. (eluce)

Frakce byly sbírány po 1,5 ml a dále analyzovány pomocí SD-PAGE na 12% akrylamidovém gelu.

#### **6. Elektroforéza SDS-PAGE**

Pro elektroforézu SDS-PAGE byl použit 1mm silný 12% akrylamidový gel s deseti jamkami. Celkový objem nanášeného vzorku byl 10 µl (odebráno z 15 µl směsi obsahující 12 µl roztoku proteinu a 3 µl vzorkového pufru denaturované 60 s při teplotě 100 °C). Do 1. jamky byl vždy umístěn standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein™; Bio-rad). Elektroforéza probíhala 50 až 60 minut při napětí 180 V a laboratorní teplotě. Po vypnutí přístroje byly vzorky obarveny barvicím roztokem a gel odbarven zahřátým odbarvovacím roztokem. Složení roztoků je univerzální pro všechny purifikace a je uvedeno v obecném popisu elektroforézy SDS-PAGE (kapitola 3.2.1.9 oddíl 13). Frakce obsahující významné množství proteinu v požadované čistotě byly sloučeny v jednu směs.

#### **7. Specifické štěpení TEV proteasou**

Pro specifické štěpení TEV proteasou byla změřena koncentrace purifikovaného roztoku, vypočteno přibližné množství exprimovaného FOXO4<sub>11-213</sub> a přidáno patřičné množství TEV proteasy (Promega; c = 10 Uµl<sup>-1</sup>; aktivita 200 Umg<sup>-1</sup>). Směs byla inkubována po dobu 120 minut při 30 °C a konstantních otáčkách 190 rpm.

## 8. Dialýza

Pro další purifikační krok (kationtovou výměnu) byl purifikovaný roztok převeden dialýzou do vodícího pufru pro kationtovou výměnu. Dialýza probíhala proti 100 násobnému objemu purifikovaného roztoku, při 4 °C na míchadle po dobu 12 h. Použita byla dialyzační membrána (Visking) s MWCO 10 kDa.

## 9. Kationtová výměnná chromatografie

Kationtová výměnná chromatografie byla prováděna na SP-Sepharóze (Amersham Biosciences) s použitím přístroje pro HPLC ÄKTA (Amersham Biosciences). Objem kolony naplněné SP-Sepharózou činil 1 ml. Eluce byla prováděna gradientem iontové síly od 20% elučního pufru do 100% elučního pufru v rozmezí 10 CV (z anglického "Column volume" tedy objem kolony). Postup purifikace byl následovný.

1. 5 ml dH<sub>2</sub>O (promytí, průtok 1 ml/min)
2. 5 ml vodící pufr pro kat. výměnu (ekvilibrace, průtok 1 ml/min)
3. nanesení vzorku (průtok 1 ml/min)
4. 2 ml vodící pufr pro kat. výměnu (promytí I., průtok 1 ml/min)
5. 2 ml 20% eluční pufr ve vodícím pufru pro kat. (promytí II., průtok 1 ml/min)
6. 10 ml gradient 20% - 100% elučního pufru ve vodícím pufru pro kat. (eluce, průtok 1 ml/min)

Frakce byly sbírány po 1 ml a dále analyzovány pomocí SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu.

## 10. Zakoncentrování proteinů

Postup dle metody uvedené v kapitole 3.2.1.9 oddílu 12. Konečný objem byl v tomto případě 0,5 ml proteinového roztoku.

## 11. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla prováděna s použitím přístroje pro HPLC ÄKTA (Amersham Biosciences) na koloně Tricorn 10/300 s objemem 25 ml naplněné nosičem Superdex 75 (Amersham Biosciences). Nanášený vzorek měl vždy maximální objem 0,5 ml. Purifikační kolona byla vždy nejprve ekvilibrována pufrem pro gelovou permeační chromatografii do ustálení konduktivity prostředí a až po té byl nanesen vzorek. Průtok byl nastaven tak, aby tlak v koloně nepřesáhl 1,5 MPa (obvykle 0,5 ml/min). Eluovaný roztok byl jímán do frakcí po 0,5 ml a dále analyzován na elektroforóze SDS-PAGE.

## 12. Další úpravy

Měření koncentrace, fosforylace proteinů a značení sondou 1,5-IAEDANS probíhalo vždy dle postupu uvedeného u popisu metody.

### **Pufry pro purifikaci konstruktů proteinu FOXO411-213:**

Pufr pro sonikaci a purifikaci na GST-Sep.:

2x PBS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF (pH 7,5)

PBS pufr (10x konc. pufr):

1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 43 mM; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Vodící pufr pro GST-Sep.:

20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM NaCl; 10 mM DTT; 1 mM EDTA

Eluční pufr pro GST-Sep.:

20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM NaCl; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 10 mM Glutathion (pH 8,0)

Vodící pufr kationtové výměny na SP-Sep.:

50 mM Citrát sodný pH 6,3; 2 mM DTT; 1 mM EDTA

Eluční pufr kationtové výměny na SP-Sep.:

50 mM Citrát sodný pH 6,3; 1 mM NaCl; 2 mM DTT; 1 mM EDTA

Vodící pufr gelové permeační chromatografie:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 10% Glycerol

### 3.2.1.16 Expres a purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub>

#### 1. Expres

Expres všech proteinových konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub> probíhala v buňkách *E.coli* BL21(DE3) po dobu 20 h za teploty 20 °C a konstantních otáček 200 rpm ve 2L LB média s koncentrací Ampicilinu 100 µg·ml<sup>-1</sup>. Indukce exprese proběhla přidávkem IPTG do finální koncentrace 0,5 mM při OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8.

#### 2. Sklizení buněk

Po uplynutí doby exprese proteinu byly buňky peletovány ve velkokapacitní centrifuge K80 (MLW) za dobu 20 minut při 4 °C a rychlosti otáček 7500 rpm. Peleta buněk byla resuspendována ve 40 ml pufru pro sonikaci a purifikaci na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze a uložen při -80 °C.

### 3. Sonikace

Sonikace byla provedena v ledové lázni na přístroji Misonix. Suspenze buněk byla nejprve vyjmuta z  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a ve studené vodě rozmrazena. Poté byl přidán lysozym v množství 0,1 mg na 1 ml buněčné suspenze a suspenze byla inkubována na míchadle 20 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byla suspenze sonikována čtyřicetkrát 15 s pulzy, vždy s 30 s přestávkami, při výkonu sonikátoru 50 W.

### 4. Ultracentrifugace

Ultracentrifugace byla provedena na přístroji 5804R (Eppendorf) po dobu 45 minut při maximálních otáčkách tj. 13 000 rpm a při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5. Afinitní chromatografie na $\text{Ni}^{2+}$ chelatuující sepharóze

Afinitní chromatografie na  $\text{Ni}^{2+}$  chelatuující sepharóze byla provedena s použitím peristaltické pumpy (Ismatec) (pouze eluce proteinu byla vždy provedena gravitačně) ve skleněné koloně (Econo column, Bio-rad) naplněné 5 ml gelové matrice  $\text{Ni}^{2+}$  chelatuující sepharózy (Amersham Biosciences). Postup purifikace byl následovný:

1. 20 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  (promytí, průtok 2 ml/min)
2. 20 ml vodící pufr pro  $\text{Ni}^{2+}$  Sep. (ekvilibrace, průtok 2 ml/min)
3. nanesení sonikátu (průtok 1 ml/min)
4. 250 ml vodící pufr pro  $\text{Ni}^{2+}$  Sep. (promytí I, průtok 2 ml/min)
5. 250 ml 10% eluční pufr pro  $\text{Ni}^{2+}$  Sep. ve vodícím pufru pro  $\text{Ni}^{2+}$  Sep. (promytí II, průtok 2 ml/min)
6. 20 ml eluční pufr pro  $\text{Ni}^{2+}$  Sepharózu (eluce)

Frakce byly sbírány po 1,5 ml a dále analyzovány pomocí SD-PAGE na 12% akrylamidovém gelu.

### 6. Elektroforéza SDS-PAGE

Pro elektroforézu SDS-PAGE byl použit 1mm silný 12% akrylamidový gel s deseti jamkami. Celkový objem nanášeného vzorku byl 10  $\mu\text{l}$  (odebráno z 15  $\mu\text{l}$  směsi obsahující 12  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu a 3  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru denaturované 60 s při teplotě  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Do 1. jamky byl vždy umístěn standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein™; Bio-rad). Elektroforéza probíhala 50 až 60 minut při napětí 180 V a laboratorní teplotě. Po vypnutí přístroje byly vzorky obarveny barvicím roztokem a gel odbarven zahřátým odbarvovacím roztokem. Složení roztoků je univerzální pro všechny purifikace a je uvedeno v obecném popisu elektroforézy SDS-PAGE. Frakce obsahující významné množství proteinu v požadované čistotě byly sloučeny v jednu směs.



## 7. Specifické štěpení thrombinem

Pro specifické štěpení thrombinem byla změřena koncentrace purifikovaného roztoku, vypočteno přibližné množství exprimovaného FOXO4<sub>82-207</sub> a přidáno patřičné množství thrombinu (Sigma-Aldrich;  $c = 1 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ; specifická aktivita  $5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Směs byla inkubována po dobu 12 h při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 8. Dialýza

Pro další purifikační krok (kationtovou výměnu) byl purifikovaný roztok převeden dialýzou do vodícího pufru pro kationtovou výměnu. Dialýza probíhala proti 100 násobnému objemu purifikovaného roztoku, při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  na míchadle po dobu 12 h. Použita byla dialyzační membrána (Visking) s MWCO 10 kDa.

## 9. Kationtová výměnná chromatografie

Kationtová výměnná chromatografie byla prováděna na SP-Sepharóze (Amersham Biosciences) s použitím přístroje pro HPLC ÄKTA (Amersham Biosciences). Objem kolony činil 1. Eluce byla prováděna gradientem iontové síly od 20% elučního pufru do 100% elučního pufru v rozmezí 10 CV (z anglického "Column volume" tedy objem kolony). Postup purifikace byl následovný.

1. 5 ml dH<sub>2</sub>O (promytí, průtok 1 ml/min)
2. 5 ml vodící pufr pro kat. výměnu (ekvilibrace, průtok 1 ml/min)
3. nanesení vzorku (průtok 1 ml/min)
4. 2 ml vodící pufr pro kat. výměnu (promytí I., průtok 1 ml/min)
5. 2 ml 20% eluční pufr ve vodícím pufru pro kat. (promytí II., průtok 1 ml/min)
6. 10 ml gradient 20% - 100% elučního pufru ve vodícím pufru pro kat. (eluce, průtok 1 ml/min)

Frakce byly sbírány po 1 ml a dále analyzovány pomocí SD-PAGE na 12% akrylamidovém gelu.

## 10. Zakoncentrování proteinů

Postup dle metody uvedené v kapitole 3.2.1.9 oddílu 12. Konečný objem byl v tomto případě 0,5 ml proteinového roztoku.

## 11. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla prováděna s použitím přístroje pro HPLC ÄKTA (Amersham Biosciences) na koloně Tricorn 10/300 s objemem 25 ml naplněné

nosičem Superdex 75 (Amersham Biosciences). Nanášený vzorek měl vždy maximální objem 0,5 ml. Purifikační kolona byla vždy nejprve ekvilibrována pufrům pro gelovou permeační chromatografii do ustálení konduktivity prostředí a až po té byl nanesen vzorek. Průtok byl nastaven tak, aby tlak v koloně nepřesáhl 1,5 MPa (obvykle 0,5 ml/min). Eluovaný roztok byl jímán do frakcí po 0,5 ml a dále analyzován na elektroforéze SDS-PAGE.

## 12. Další úpravy

Měření koncentrace, fosforylace proteinů a značení sondou 1,5-IAEDANS probíhalo vždy dle postupu uvedeného u popisu metody.

### **Pufry pro purifikaci konstruktů proteinu FOXO482-207:**

Pufr pro sonikaci a purifikaci na Ni<sup>2+</sup> Sep.:

1x PBS; 1 M NaCl; 4 mM β-Merkaptoethanol; 2 mM Imidazol; 1 mM PMSF (pH 7,5)

PBS pufr (10x konc. pufr):

1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 43 mM; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Vodící pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep.:

1x PBS; 0,5 M NaCl; 2 mM β-Merkaptoethanol; 2 mM Imidazol (pH 7,5)

Eluční pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep.:

1x PBS; 0,5 M NaCl; 2 mM β-Merkaptoethanol; 0,6 M Imidazol (pH 8)

Vodící pufr kationtové výměny na SP-Sep.:

50 mM Citrát sodný pH 6,3; 2 mM DTT; 1 mM EDTA

Eluční pufr kationtové výměny na SP-Sep.:

50 mM Citrát sodný pH 6,3; 1 mM NaCl; 2 mM DTT; 1 mM EDTA

Vodící pufr gelové permeační chromatografie:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 10%Glycerol

### 3.2.1.17 Expres a purifikace proteinových konstruktů 14-3-3ζ

#### 1. Expres

Expres všech proteinových konstruktů 14-3-3ζ probíhala v buňkách *E.coli* BL21(DE3) po dobu 20 h za teploty 20 °C a konstantních otáček 200 rpm ve 2L LB média s koncentrací Ampicilinu 100 μg.ml<sup>-1</sup>. Indukce exprese proběhla přidávkem IPTG do finální koncentrace 0,2 mM při OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8

## 2. Sklizení buněk

Po uplynutí doby exprese proteinu byly buňky peletovány ve velkokapacitní centrifuze K80 (MLW) za dobu 20 minut při 4 °C a rychlosti otáček 7500 rpm. Peleta buněk byla resuspendována 40 ml pufru pro sonikaci a purifikaci na Ni<sup>2+</sup> chelatující sepharóze a uložen do -80 °C.

## 3. Sonikace

Sonikace byla provedena v ledové lázni na přístroji Misonix. Suspenze buněk byla nejprve vyjmuta z -80 °C a ve studené vodě rozmrazena. Poté byl přidán lysozym v množství 0,1 mg na 1 ml buněčné suspenze a suspenze byla inkubována na míchadle 20 minut při 4 °C. Následně byla suspenze sonikována čtyřmi osmiminutovými pulzy, s dvouminutovými přestávkami, při výkonu sonikátoru 50 W.

## 4. Ultracentrifugace

Ultracentrifugace byla provedena na přístroji Eppendorf 5804R po dobu 45 minut při maximálních otáčkách tj. 13 000 rpm a při teplotě 4 °C.

## 5. Afinitní chromatografie na Ni<sup>2+</sup> chelatující sepharóze

Afinitní chromatografie na Ni<sup>2+</sup> chelatující sepharóze byla provedena s použitím peristaltické pumpy (Ismatek) (pouze eluce proteinu byla vždy provedena gravitačně) ve skleněné koloně (Econo column, Bio-rad) naplněné 5 ml gelové matrice Ni<sup>2+</sup> chelatující sepharózy (Amersham Biosciences). Postup purifikace byl následovný:

1. 20 ml dH<sub>2</sub>O (promytí, průtok 2 ml/min)
2. 20 ml vodící pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep. (ekvilibrace, průtok 2 ml/min)
3. nanesení sonikátu (průtok 1 ml/min)
4. 250 ml vodící pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep. (promytí I, průtok 2 ml/min)
5. 250 ml 10% eluční pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep. ve vodícím pufru pro Ni<sup>2+</sup> Sep. (promytí II, průtok 2 ml/min)
6. 20 ml eluční pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep. (eluce)

Frakce byly sbírány po 1,5 ml a dále analyzovány pomocí SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu.

## 6. Elektroforéza SDS-PAGE

Pro elektroforézu SDS-PAGE byl použit 1mm silný 12% akrylamidový gel s deseti jamkami. Celkový objem nanášeného vzorku byl 10 µl (odebráno z 15 µl směsi obsahující 12 µl roztoku proteinu a 3 µl vzorkového pufru denaturované 60 s při teplotě 100 °C). Do

1. jamky byl vždy umístěn standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein™; Bio-rad). Elektroforéza probíhala 50 až 60 minut při napětí 180 V a laboratorní teplotě. Po vypnutí přístroje byly vzorky obarveny barvicím roztokem a gel odbarven zahřátým odbarvovacím roztokem. Složení roztoků je univerzální pro všechny purifikace a je uvedeno v obecném popisu elektroforézy SDS-PAGE. Frakce obsahující významné množství proteinu v požadované čistotě byly sloučeny v jednu směs.

## 7. Specifické štěpení thrombinem

Pro specifické štěpení thrombinem byla změřena koncentrace purifikovaného roztoku, vypočteno přibližné množství exprimovaného 14-3-3ζ a přidáno patričné množství thrombinu (Sigma-Aldrich;  $c = 1 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ; specifická aktivita  $5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Směs byla inkubována po dobu 12 h při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 8. Dialýza

Pro další purifikační krok (aniontovou výměnu) byl purifikovaný roztok převeden dialýzou do vodícího pufru pro kationtovou výměnu. Dialýza probíhala proti 100 násobnému objemu purifikovaného roztoku, při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  na míchadle po dobu 12 h. Použita byla dialyzační membrána (Visking) s MWCO 10 kDa.

## 9. Aniontová výměnná chromatografie

Aniontová výměnná chromatografie byla prováděna na Q-Sepharóze (Amersham Biosciences) s použitím přístroje pro HPLC ÄKTA (Amersham Biosciences). Objem kolony činil 1 ml. Eluce byla prováděna gradientem iontové síly od 20% elučního pufru do 100% elučního pufru v rozmezí 10 CV (z anglického "Column volume" tedy objem kolony). Postup purifikace byl následovný.

1. 5 ml dH<sub>2</sub>O (promytí, průtok 1 ml/min)
2. 5 ml vodící pufr pro aniont. výměnu (ekvilibrace, průtok 1 ml/min)
3. nanesení vzorku (průtok 1 ml/min)
4. 2 ml vodící pufr pro aniont. výměnu (promytí I., průtok 1 ml/min)
5. 2 ml 20% eluční pufr ve vodícím pufru pro aniont. (promytí II., průtok 1 ml/min)
6. 10 ml gradient 20% - 100% elučního pufru ve vodícím pufru pro aniont. výměnu (eluce, průtok 1 ml/min)

Frakce byly sbírány po 1 ml a dále analyzovány pomocí SD-PAGE na 12% akrylamidovém gelu.

## 10. Další úpravy

Měření koncentrace, fosforylace proteinů a značení sondou 1,5-IAEDANS probíhalo vždy dle postupu uvedeného u popisu metody.

Pufr pro sonikaci a purifikaci na Ni<sup>2+</sup> Sep.:

1x PBS; 1 M NaCl; 4 mM β-Merkaptoethanol; 2 mM Imidazol; 1 mM PMSF (pH 7,5)

PBS pufr (10x konc. pufr):

1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 43 mM; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Vodící pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep.:

1x PBS; 0,5 M NaCl; 2 mM β-Merkaptoethanol; 2 mM Imidazol (pH 7,5)

Eluční pufr pro Ni<sup>2+</sup> Sep.:

1x PBS; 0,5 M NaCl; 2 mM β-Merkaptoethanol; 0,6 M Imidazol (pH 8)

Vodící pufr aniontové výměny na Q-Sep.:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM DTT; 1 mM EDTA

Eluční pufr aniontové výměny na Q-Sep.:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM NaCl; 2 mM DTT; 1 mM EDTA

## 3.2.2 Experimentální metody

### 3.2.2.1 Měření stacionární fluorescence

Měřením stacionární fluorescence, respektive stacionární anizotropie fluorescence je možné získat data, která nám při vhodném matematickém zpracování mohou poskytnout informaci o disociační konstantě dvou interagujících elementů a tedy o jejich vzájemné afinitě. Tato metoda byla použita pro ověření vazebných vlastností různých typů komplexů, které byly předmětem experimentů. Pro měření byl vždy jeden z elementů komplexu označen fluorescenční sondou. Koncentrace tohoto elementu byla v roztoku konstantní, zatímco druhým elementem byl roztok titrován. Po každé titraci byla na fluorimetru změřena intenzita fluorescence po excitaci fluorescenční sondy vhodnou vlnovou délkou ve dvou navzájem kolmých rovinách. Ze změny poměru těchto intenzit byla spočítána dle následujícího vztahu anizotropie fluorescence "r":

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) \quad (\text{rovnice 1})$$

Kde  $I_{\parallel}$  představuje intenzitu polarizované fluorescence naměřenou v rovině rovnoběžné a  $I_{\perp}$  představuje intenzitu polarizované fluorescence naměřenou v rovině kolmé. Frakce navázané DNA ( $F_B$ ) byla spočítána na základě vztahu:

$$F_B = (r_{\text{OBS}} - r_{\text{min}}) / [(r_{\text{max}} - r_{\text{OBS}})Q + (r_{\text{OBS}} - r_{\text{min}})] \quad (\text{rovnice 2}),$$

kde  $Q$  představuje poměr kvantových výtěžků vázaného a volného fluoroforu,  $r_{\text{max}}$  je

hodnota anizotropie při saturaci,  $r_{OBS}$  je hodnota anizotropie pro každou jednotlivou koncentraci ligandu a  $r_{OBS}$  je minimální hodnota anizotropie pozorovaná při měření volné DNA.

Parametr  $F_B$  byl vyneseno do grafu oproti známým koncentracím titrovaného ligandu a hodnota disociační konstanty ( $K_D$ ) byla stanovena extrapolací pomocí rovnice:

$$F_B = \frac{K_D + [P_1] + [P_2] - \sqrt{(K_D + [P_1] + [P_2])^2 - 4[P_1][P_2]}}{2[P_1]} \quad (\text{rovnice 3}),$$

kde  $K_D$  je hodnota rovnovážné disociační konstanty,  $[P_1]$  je koncentrace fluorescenčně značeného ligandu a  $[P_2]$  je koncentrace titrovaného ligandu. Porovnáním hodnot  $K_D$  vzorků lze usuzovat na změnu, či zachování vazebných vlastností ligandů.

Nelineární proložení dat bylo provedeno pomocí Origin 6.0 (Microcal Software Inc.)

Vazebné eseje byly měřeny na fluorimetru Perkin Elmer LS50B. Jako fluorescenční sondy byly použity sondy: fluorescein, tryptofan a 1,5-IAEDANS. Další detaily a nastavení metody jsou pro větší přehled uvedeny u jednotlivých výsledků měření.

### 3.2.2.2 Měření časově rozlišené fluorescence

Jednou z metod pro sledování časově rozlišené fluorescence je metoda opakované pulzní excitace, kdy délka excitačního pulzu je obvykle kratší, než doba dohasínání fluorescence, což umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů. Díky tomu lze sledovat pokles intenzity fluorescence v čase, která je relativní a nemusí záviset na skutečné hodnotě intenzity fluorescence, a která je navíc závislá na vlastnostech okolí sondy. Zásadní sledovanou veličinou je střední doba života excitovaného stavu molekuly " $\tau$ ", tj. doba mezi excitací molekuly (absorbací fotonu) a emisí světla při návratu molekuly do základního stavu. Doba dohasínání je nezávislá na koncentraci vzorku a naopak závislá na okolním prostředí a může být použita k určení polaritý prostředí, pH, teploty, koncentrace iontů, či přítomnosti zhašedla.

Při použití pulzní metody je vzorek excitován krátkým pulzem s trváním mnohem kratším, než je doba dohasínání fluorescence  $\tau$ . Závislost intenzity fluorescence na čase je použita pro výpočet doby dohasínání  $\tau$ . Pro záznam časově rozlišené fluorescence se používá metoda "Počítání fotonů" ("Time-Correlated Single Photon Counting" (TSCP)), což znamená, že se měří čas mezi excitačním pulzem a zaznamenáním emitovaného fotonu na detektoru čímž se vytvoří časová distribuce fotonů. Porovnáním křivek různých vzorků, nebo z parametrů křivky proložené touto distribucí lze extrahovat řadu dalších informací o okolí fluorescenční sondy nebo o dynamice a rotaci molekul (Lakowicz JR, 2006).

Měření časově rozlišené fluorescence bylo uskutečněno ve spolupráci s Doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a Doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc.

z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Pro měření byl použit přístroj se zdrojem barvivového laseru (Spectra Physics, model 375), a detektorem pro počítání fotonů s fotonásobičem (Hamamatsu, R3809U-50). Šířka vstupních a výstupních štěrbin paprsku byla nastavena na 15 nm. Před první z těchto štěrbin byl umístěn barevný filtr (Zeiss, UG1) k odstranění rozptýleného světla. Jako fluorescenční sondy byly použity sondy: fluorescein, tryptofan a 1,5-IAEDANS.

### Sledování dohasínání intenzity fluorescence

Dohasínání intenzity fluorescence bylo vždy získáváno pod tzv. "magickým" úhlem, kdy měřené hodnoty intenzity fluorescence  $I(t)$  nezávisí na rotační difuzi fluoroforu a poskytují nezkreslenou informaci o středních dobách života excitované molekuly. Při výpočtu střední doby života se předpokládá exponenciální průběh dohasínání fluorescence dle rovnice:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{rovnice 4}),$$

kde  $\tau_i$  a  $\alpha_i$  jsou doby života fluorescence a korespondující amplitudy. Hodnota  $I(t)$  byla analyzována metodou maximální entropie ("singular value decomposition - maximum entropy method", SVD-MEM). Pro výpočet bylo vybráno 100 hodnot  $\alpha_i$  v rozmezí 20 ps až 20 ns. Průměrná doba života byla dále spočítána ze vztahu

$$\bar{\tau} = \sum_i f_i \tau_i = \sum_i (\alpha_i \tau_i^2) / \sum_i (\alpha_i \tau_i) \quad (\text{rovnice 5})$$

Frakční intenzity  $f_i$  byly vypočítány dle následujícího vztahu:

$$f_i = \alpha_i \tau_i / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (\text{rovnice 6}),$$

kde  $f_i$  představuje frakční intenzitu  $i$ -té složky  $\tau_i$ .

### Sledování dohasínání anizotropie fluorescence

Parametry dohasínání anizotropie fluorescence  $r(t)$  byly získány z polarizované rovnoběžné  $I_{||}$  a kolmé  $I_{\perp}$  složky dohasínání. Data byla analyzována metodou maximální entropie s použitím následujících vztahů:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-t/\phi_i} \quad (\text{rovnice 7}),$$

kde  $\beta_i$  představuje distribuci korelačních časů  $\phi_i$ . Součet hodnot  $\beta_i$  je roven počáteční anizotropii  $r_0$ :

$$\sum \beta_i = r_0 \text{ (rovnice 8)}$$

Pro výpočet bylo použito 100 korelačních časů  $\phi$  rovnoměrně rozprostřených po logaritmické stupnici v rozmezí 100 ps až 500 ns.

### Zhášení fluorescence sondy AEDANS (quenching)

Pro analýzu přístupnosti sondy 1,5-IAEDANS byla využita metoda zhášení fluorescence. K roztoku proteinového komplexu byl přidán akrylamid v různých koncentracích [Q] jako "zhášedlo" fluorescence a byl sledován jeho účinek na dobu excitovaného stavu sondy AEDANS na volném FOXO4 a FOXO4 v komplexu s proteinem 14-3-3. Data ze zhášené časově rozlišené fluorescence byla analyzována Sternovou-Volmerovou rovnicí:

$$\bar{\tau}_0/\bar{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \bar{\tau}_0 \cdot [Q] \text{ (rovnice 9),}$$

kde  $\bar{\tau}_0$  a  $\bar{\tau}$  představují průměrnou dobu života excitovaného stavu za nepřítomnosti a v přítomnosti zhášedla.  $K_{SV}$  a  $k_q$  jsou Sternova-Volmerova konstanta a bimolekulární zhášecí konstanta.

### Měření Försterova rezonančního přenosu energie (FRET)

Metodu rezonančního přenosu energie mezi donorem fluorescence a jejím akceptorem lze využít k výpočtu průměrné vzdálenosti těchto dvou molekul. Průměrná účinnost přenosu energie E byla spočítána z průměrné doby excitovaného stavu molekuly donoru fluorescence (AEDANS) za nepřítomnosti ( $\tau_D$ ) a přítomnosti ( $\tau_{DA}$ ) akceptoru fluorescence (fluorescein).

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \text{ (rovnice 10)}$$

Průměrná vzdálenost mezi donorem a akceptorem fluorescence byla spočítána pomocí vztahu:

$$R = R_0 \sqrt{E^{-1} - 1} \text{ (rovnice 11),}$$

kde  $R_0$  je Försterův kritický poloměr. Ten je dán rovnicí:

$$R_0 = (8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \text{ \AA} \text{ (rovnice 12),}$$

kde n je index lomu prostředí,  $Q_D$  je kvantový výtěžek emise donoru při absenci akceptoru,  $\kappa^2$  je orientační faktor a  $J(\lambda)$  je překryvový integrál fluorescence donoru a absorpce akceptoru, který má podobu:

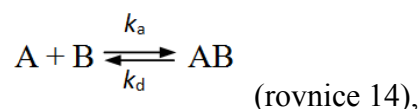
$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1} \text{ (rovnice 13),}$$



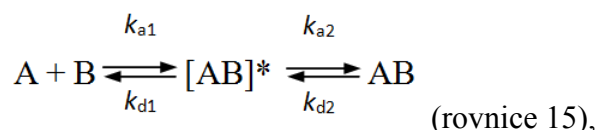
kde  $F_D(\lambda)$  a  $\epsilon_a(\lambda)$  představují intenzity fluorescence donoru a molární absorpční koeficient akceptoru při vlnové délce  $\lambda$  a optické dráze 1 cm.

### 3.2.2.3 Metoda SPR

Metoda povrchové resonance plazmonu SPR (z anglického Surface Plasmon Resonance) je metoda, při které se měří změna indexu lomu na tenké vrstvě zlaceného povrchu (tzv. čipu). Tato změna indexu lomu je proporcionalní k okamžité koncentraci látek na povrchu čipu. Tato metoda umožňuje nejen určení rovnovážné disociační konstanty ( $K_D$ ), ale i pro měření kinetických disociačních ( $k_D$ ) i asociačních konstant ( $k_A$ ). Samotné uspořádání metody je takové, že na čip (sklo potažené tenkou zlatou vrstvou) je navázán ligand, přes který proudí vodící roztok s analytem (tedy látkou vázající se na ligand). Na tenké zlaté vrstvě je snímána změna indexu lomu a z odpovědi se vytváří senzogram, který lze později analyticky zpracovat. Při studiu interakce FOXO4 s DNA byl pro analýzu dat byl použit jednak Langmuirův kinetický model popisující přímé utvoření komplexu (AB) z proteinu (A) a DNA (B).



kde  $k_a$  a  $k_d$  představují asociační a disociační konstanty. Dále byl použit tzv. dvou-stavový model (vhodný za předpokladu konformačních změn), který popisuje vytvoření komplexu AB ve dvou krocích.



kde  $[AB]^*$  reprezentuje komplex v „tranzitním“ stavu a AB ve stavu konečném (Krauss G et al., 1976; Lipschultz CA et al., 2000). Parametry  $k_{a1}$  a  $k_{d1}$  představují asociační a disociační konstanty prvního kroku (vytvoření komplexu), zatímco  $k_{a2}$  a  $k_{d2}$  představují asociační a disociační konstanty druhého kroku (konformační změny). Rovnovážná disociační konstanta pro Langmuirův model byla stanovena rovnicí:

$$K_D = k_d/k_a \quad (\text{rovnice 16})$$

Rovnovážná disociační konstanta pro dvou-stavový model byla stanovena rovnicí:

$$K_D = 1/[(k_{a1}/k_{d1}) \times (1 + k_{a2}/k_{d2})] \quad (\text{rovnice 17})$$

Měření byla prováděna na přístroji ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System (Bio-rad, Hercules), na LCP čipu s povrchem s navázaným neutravidinem ve spolupráci s Mgr. Ladislavem Bumbou, Ph.D. Na LCP čip s povrchem upraveným pro navázání vzorků s konjugovaným Biotinem na 5' konci byla navázána biotinylovaná dsDNA (VBC

Biotech) s motivem IRE (5'-GACTATCAAAACAACGC-3'), DBE (5'-GACTATGTAAACAACGC-3') a náhodným (5'-AACGTATGCTCTAGCCA-3') pro negativní kontrolu. dsDNA byla připravena ze směsi dvou komplementárních oligonukleotidů v poměru 1:1 zahřátím na 70 °C po dobu 10 min a pomalým zchlazením (po dobu 20 min.) na laboratorní teplotu. Takto připravená dsDNA byla naředěna na finální koncentraci 100 nM v pufru PBS s 0,05% Tween20 a zachycena na čip při průtoku 30 µl/min. Celková doba průtoku byla 2 minuty. Slabě navázaný materiál byl z čipu odstraněn promytím 2x 60 µl 2M NaCl. Takto připravený čip by konfrontován se vzorky FOXO4<sub>82-207</sub> postupně o koncentracích: **12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM; 200 nM** naředěných ve vodícím pufru o složení: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0.005% Tween-20.

Všechna měření byla prováděna za teploty 25 °C a průtoku 25 - 75 µl/min. Mezi jednotlivými měřeními byl povrch čipu regenerován 100 µl 2M NaCl. Získané senzogramy byly korelovány vzhledem k pozadí pomocí bodů na čipu, které nejsou vystaveny navázání ligandu, ale jsou vystaveny toku analytu a dále odečtením hodnot získaných na kanálech 1 - 5, kde probíhala slepá injekce.

#### 3.2.2.4 CD spektroskopie

Lineárně polarizované světlo lze rozložit na levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla. Obě tyto složky procházejí prostředím lehce odlišnou rychlostí, čímž dochází ke stáčení roviny polarizovaného světla. Obě tyto složky jsou také jinak absorbovány opticky aktivními látkami a rovinně polarizované světlo se mění na elipticky polarizované. Pokud pozorujeme rozdíl v molárních absorpčních koeficientech pro levo- a pravotočivou složku, hovoříme o tzv. cirkulárním dichroismu (CD). Analýza CD spekter může přinést informaci o sekundární struktuře studovaného proteinu a jejích případných změnách.

CD spektra studovaných proteinových konstruktů byla měřena v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 mm (Agilent) pomocí spektrofotometru J-810 (Jasco). Měřená spektrální oblast byla v rozmezí 200 - 320 nm s přechodovou rychlostí 10 nm/min. Reakční čas byl 8 s, rozlišení 1 nm, šířka vlnového pásma rovněž 1 nm a citlivost 100 mdeg. Konečné spektrum bylo získáno jako průměr 5 měření. Dále bylo spektrum korelováno na základní hladinu odečtením spektra roztoku prostého polypeptidů. Spektra byla zaznamenána při laboratorní teplotě v pufru následujícího složení: 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5); 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 2 mM 2-merkaptoetanol a 10% (w/v) glycerol. Koncentrace proteinových konstruktů FOXO4-DBD byla 6 µM.

## 4 Výsledky

### 4.1 Příprava pracovních konstruktů

#### 4.1.1 Příprava expresních vektorů a cílená bodová mutagenese

Výsledkem přípravy expresních vektorů a cílené bodové mutagenese byla řada cDNA pracovních konstruktů individuálně designovaných pro experimenty. Tato cDNA byla ověřena sekvenací ve Středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

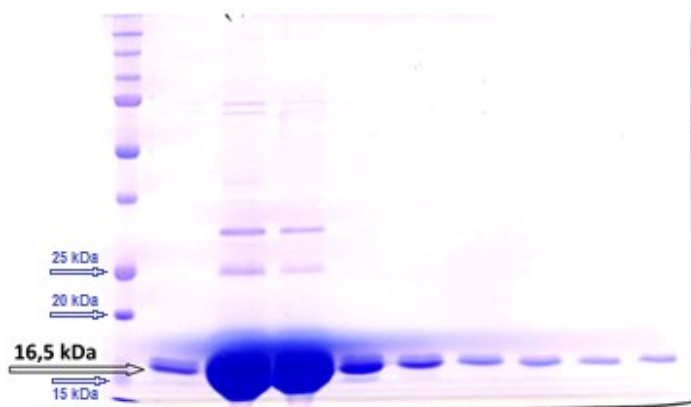
#### 4.1.2 Purifikace proteinových konstruktů

Pracovní konstrukty byly purifikovány dle popsanych metod. Pro ilustraci zde předložím výsledky průběhu a závěru purifikace vždy jednoho zástupce skupiny konstruktů purifikovaných stejným způsobem.

##### 4.1.2.1 Purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub>

###### 1. Afinity chromatografie na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze

Průběžným znázorněním výsledků purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub> na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze je obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 20). Jako standard molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad)

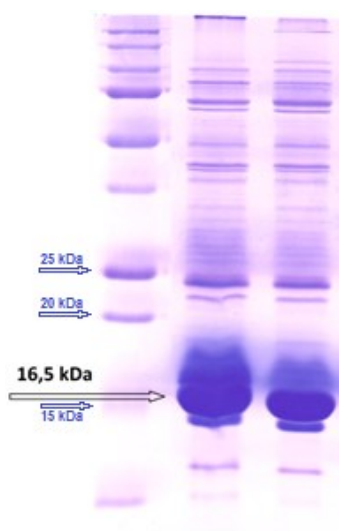


**Obr. 20 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE afinity chromatografie FOXO4<sub>82-207</sub> na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

Takovýto výsledek ukazuje na to, že frakce analyzované ve 3. a 4. dráze zleva mají dostatečnou čistotu a koncentraci pro další purifikaci.

## 2. Specifické štěpení thrombinem

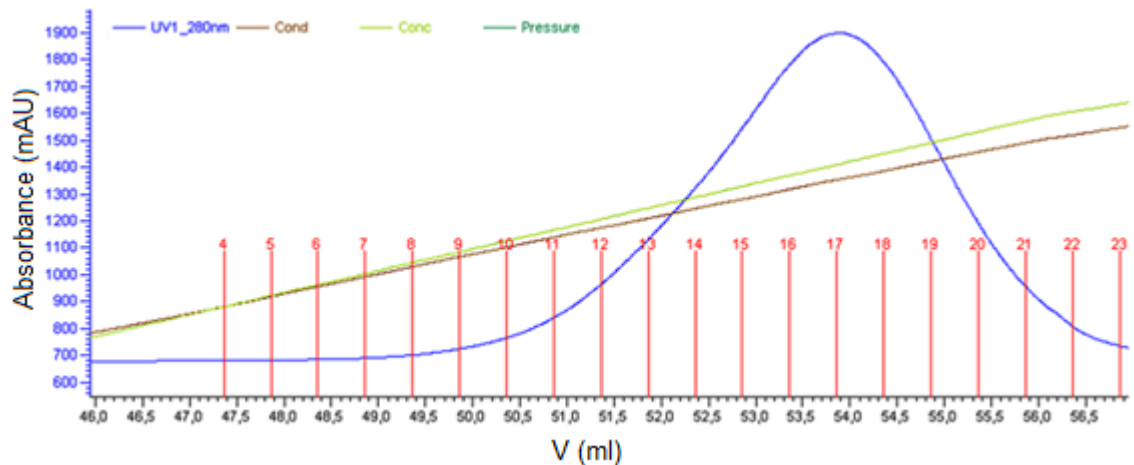
Výsledkem štěpení His-tag afinitní kotvy specificky enzymem thrombinem je proteinový konstrukt bez této afinitní kotvy a tedy s nižší molekulovou hmotností. Úspěšnost této úpravy byla ověřena pomocí elektroforézy SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu jejíž výsledek demonstruje obrázek 21. Jako standard molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad).



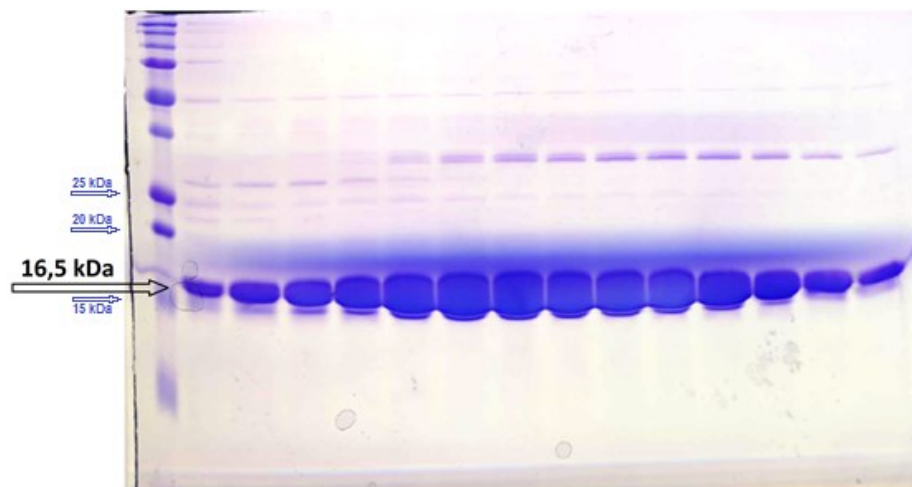
**Obr. 21 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE specifického štěpení thrombinem.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z poklesu molekulové hmotnosti vzorku po inkubaci s thrombinem (3. dráha) oproti neštěpenému vzorku (2. dráha) lze usuzovat, že odštěpení histidinové afinitní kotvy proběhlo v pořádku.

## 3. Kationtová výměnná chromatografie

Průběžným znázorněním výsledků kationtové výměnné chromatografie na SP-Sepharóze je grafický záznam závislosti absorpance na objemu pufru prošlého kolonou (Obr. 22) a obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 23). Jako standard molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad).



**Obr. 22 Chromatografický záznam eluce kationtové výměnné chromatografie FOXO4<sub>82-207</sub>.** Eluce proteinu je zachycena pomocí jednotek AU ("Absorbance Unit") (modrá křivka) vzhledem k průtoku pufru. Z chromatogramu je patrná distribuce proteinu v jednotlivých frakcích. Dále je možné sledovat křivku stoupajícího gradientu elučního pufru (zelená křivka) a křivku stoupající konduktivity roztoku, což je způsobeno stoupající iontovou silou protékajícího pufru. Pro další purifikaci byly použity frakce 13 až 19.

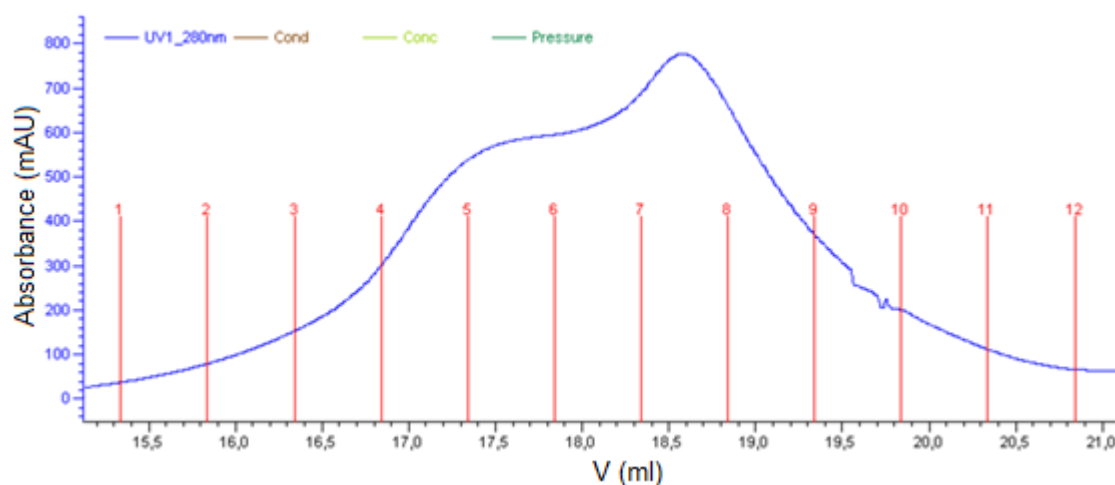


**Obr. 23 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE kationtové výměnné chromatografie FOXO4<sub>82-207</sub> na SP-Sepharóze.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

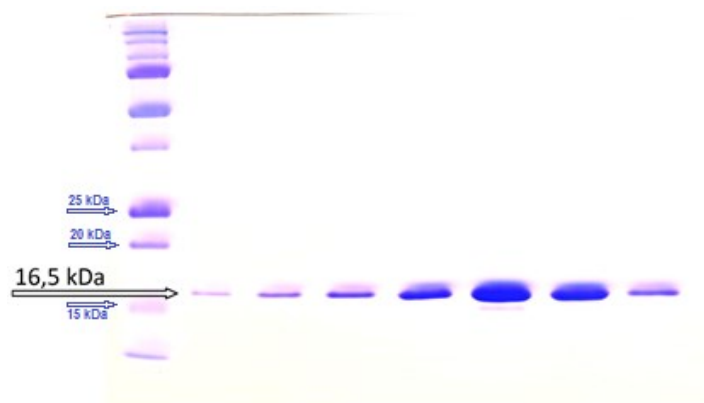
#### 4. Gelová permeační chromatografie

Průběžným znázorněním výsledků gelové permeační chromatografie na Seperdex 75 je grafický záznam závislosti absorbance na objemu pufru prošlého kolonou (Obr. 24) a

obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 25). Jako standard molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad).



**Obr. 24 Chromatografický záznam gelové permeační chromatografie FOXO4<sub>82-207</sub>.** Eluce proteinu je zachycena pomocí jednotek AU ("Absorbance Unit") (modrá křivka) vzhledem k průtoku pufru. Z chromatogramu je patrná distribuce proteinu v jednotlivých frakcích. Pro další purifikaci byly použity frakce 7 až 9.



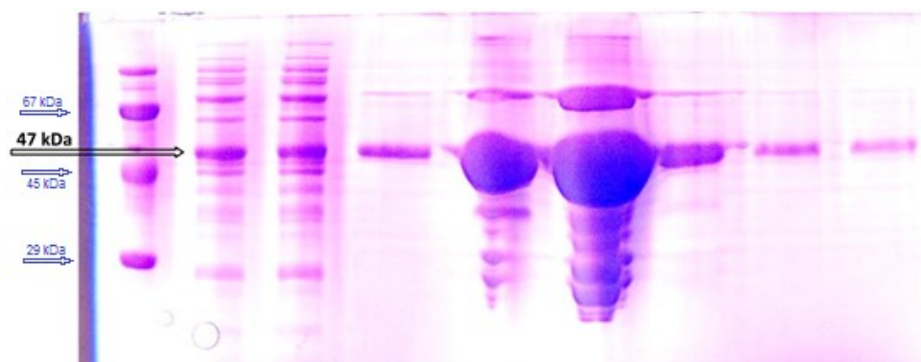
**Obr. 25 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE gelové permeační chromatografie FOXO4<sub>82-207</sub> na koloně Superdex 75.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

Výsledkem purifikace konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub> bylo obvykle 5 - 10 mg proteinu požadované čistoty a koncentrace 2 - 4 mg/ml.

#### 4.1.2.2 Purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub>

##### 1. Afinitní chromatografie na GST sepharóze

Průběžným znázorněním výsledků purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> na GST sepharóze je obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 26). Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů o molekulových hmotnostech 97 kDa, 67 kDa, 45 kDa a 29 kDa.

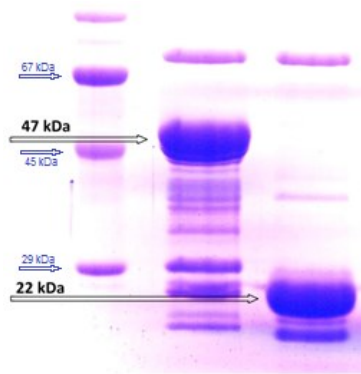


**Obr. 26 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE afinitní chromatografie GST-FOXO4<sub>11-213</sub> na GST sepharóze.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

Takovýto výsledek ukazuje na to, že frakce analyzované v 5. a 6. dráze zleva mají dostatečnou čistotu a koncentraci pro další purifikaci.

##### 2. Specifické štěpení TEV proteasou

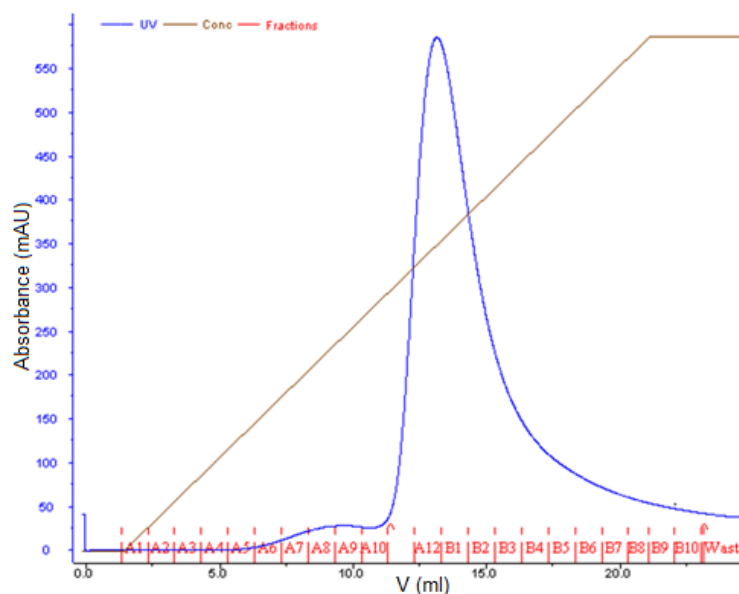
Výsledkem štěpení GST afinitní kotvy specificky enzymem TEV proteasou je proteinový konstrukt bez této afinitní kotvy a tedy s nižší molekulovou hmotností. Úspěšnost této úpravy byla ověřena pomocí elektroforézy SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu jejíž výsledek demonstruje obrázek 27. Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů s proteiny o molekulových hmotnostech 97 kDa, 67 kDa, 45 kDa a 29 kDa.



**Obr. 27 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE specifického štěpení TEV proteasou.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z poklesu molekulové hmotnosti vzorku po inkubaci s TEV proteasou (3. dráha) oproti neštěpenému vzorku (2. dráha) lze usuzovat, že odštěpení GST fúzního proteinu proběhlo v pořádku.

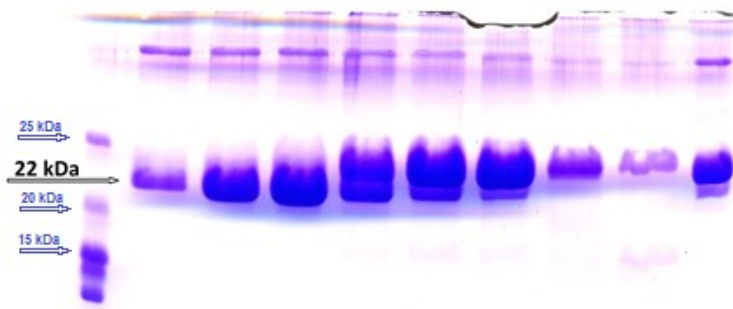
### 3. Kationtová výměnná chromatografie

Průběžným výsledkem kationtové výměnné chromatografie na SP-Sepharóze je grafický záznam závislosti absorpance na objemu pufru prošlého kolonou (Obr. 28) a obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 29). Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů s proteiny o molekulových hmotnostech 29 kDa, 21 kDa, 12,5 kDa a 6,5 kDa.



**Obr. 28 Chromatografický záznam eluce kationtové výměnné chromatografie FOXO4<sub>11-213</sub>.** Eluce proteinu je zachycena pomocí jednotek AU ("Absorbance Unit") (modrá křivka) vzhledem k průtoku pufru. Z chromatogramu je patrná distribuce proteinu v jednotlivých frakcích. Dále je možné sledovat křivku stoupající konduktivity elučního pufru (hnědá křivka), což je způsobeno stoupající iontovou silou elučního pufru. Pro další purifikaci byly použity frakce A11 až B4.

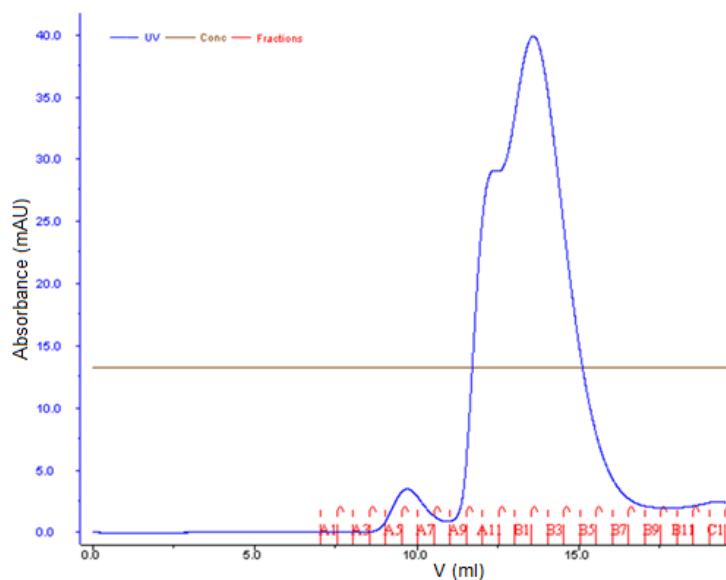




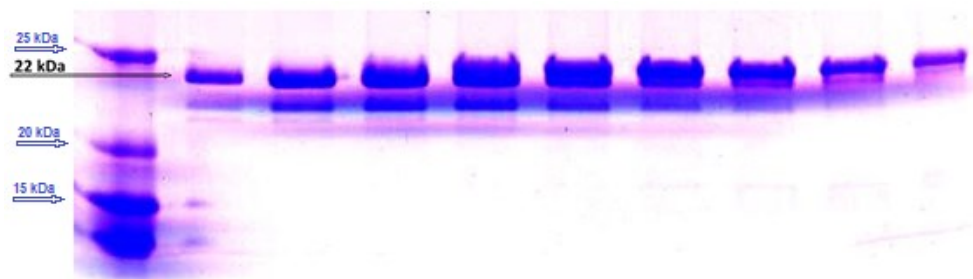
**Obr. 29** 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE kationtové výměnné chromatografie FOXO4<sub>11-213</sub> na SP-Sepharóze. Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

#### 4. Gelová permeační chromatografie

Průběžným výsledkem gelové permeační chromatografie na Superdex 75 je grafický záznam závislosti absorbance na objemu pufru prošlého kolonou (Obr. 30) a obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 31). Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů s proteiny o molekulových hmotnostech 29 kDa, 21 kDa, 12,5 kDa a 6,5 kDa.



**Obr. 30** Chromatografický záznam gelové permeační chromatografie FOXO4<sub>11-213</sub>. Eluce proteinu je zachycena pomocí jednotek AU ("Absorbance Unit") (modrá křivka) vzhledem k průtoku pufru. Z chromatogramu je patrná distribuce proteinu v jednotlivých frakcích. Pro další použití jsou vhodné frakce přibližně 30 až 100 % maxima hlavního píku, tedy frakce B1 až B6. Ve frakcích A5 až A12 se předpokládá přítomnost agregovaného proteinu.



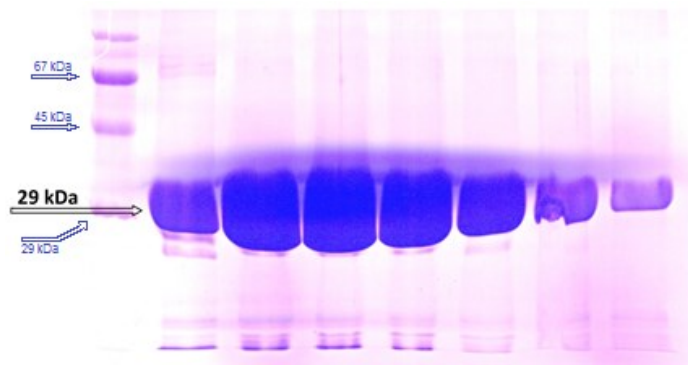
**Obr. 31 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE gelové permeační chromatografie FOXO4<sub>11-213</sub> na koloně Superdex 75.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

Výsledkem purifikace konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> bylo obvykle 4 - 6 mg proteinu požadované čistoty a koncentrace 2 - 3 mg/ml.

#### 4.1.2.3 Purifikace proteinových konstruktů 14-3-3ζ

##### 1. Afinitní chromatografie na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze

Průběžným znázorněním výsledků purifikace proteinových konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub> na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze je obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 32). Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů s proteiny o molekulových hmotnostech 97 kDa, 67 kDa, 45 kDa a 29 kDa.

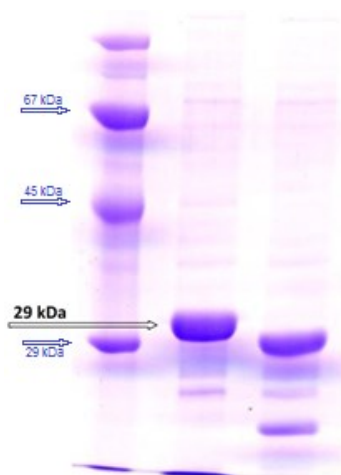


**Obr. 32 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE afinitní chromatografie 14-3-3ζ na Ni<sup>2+</sup> chelatuující sepharóze.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.

Takovýto výsledek ukazuje na to, že frakce analyzované v drahách 2 - 6 (zleva) mají dostatečnou čistotu a koncentraci pro další purifikaci.

## 6. Specifické štěpení thrombinem

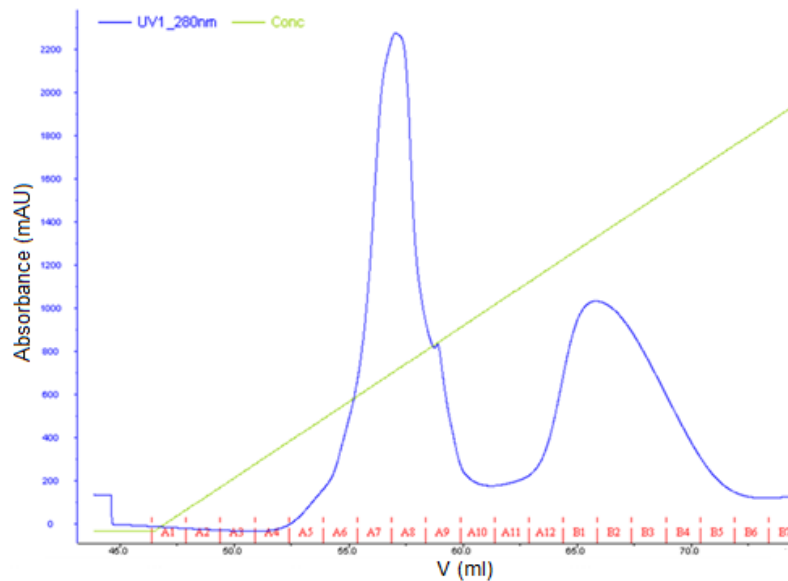
Výsledkem štěpení His-tag afinitní kotvy specificky enzymem thrombinem je proteinový konstrukt bez této afinitní kotvy a tedy s nižší molekulovou hmotností. Úspěšnost této úpravy byla ověřena pomocí elektroforézy SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu jejíž výsledek demonstruje obrázek 33. Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů o molekulových hmotnostech 97 kDa, 67 kDa, 45 kDa a 29 kDa.



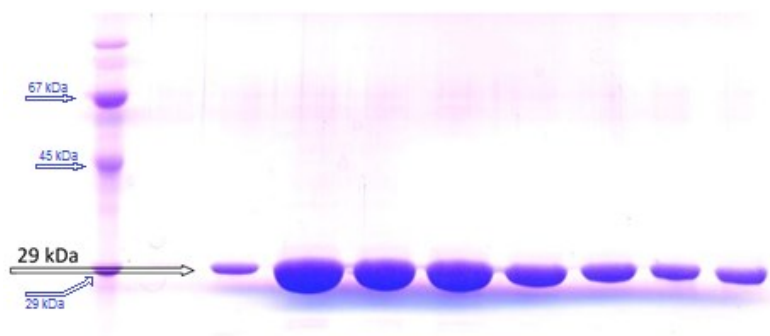
**Obr. 33 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE specifického štěpení thrombinem.** Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z poklesu molekulové hmotnosti vzorku po inkubaci s thrombinem (3. dráha) oproti neštěpenému vzorku (2. dráha) lze usuzovat, že odštěpení His-tag afinitní kotvy proběhlo v pořádku.

## 7. Aniontová výměnná chromatografie

Průběžným výsledkem aniontové výměnné chromatografie na SP-Sepharóze je grafický záznam závislosti absorbance na objemu pufru prošlého kolonou (Obr. 34) a obarvený 12% akrylamidový gel z SDS-PAGE (Obr. 35). Jako standard molekulových hmotností byla použita směs proteinů o molekulových hmotnostech 97 kDa, 67 kDa, 45 kDa a 29 kDa.



**Obr. 34 Chromatografický záznam eluce aniontové výměnné chromatografie 14-3-3 $\zeta$  na Q-Sepharóze.** *Eluce proteinu je zachycena pomocí jednotek AU ("Absorbance Unit") (modrá křivka) vzhledem k průtoku pufru. Z chromatogramu je patrná distribuce proteinu v jednotlivých frakcích. Dále je možné sledovat křivku stoupajícího gradientu elučního pufru (zelená křivka). Pro další purifikaci byly použity frakce A7 až A9.*



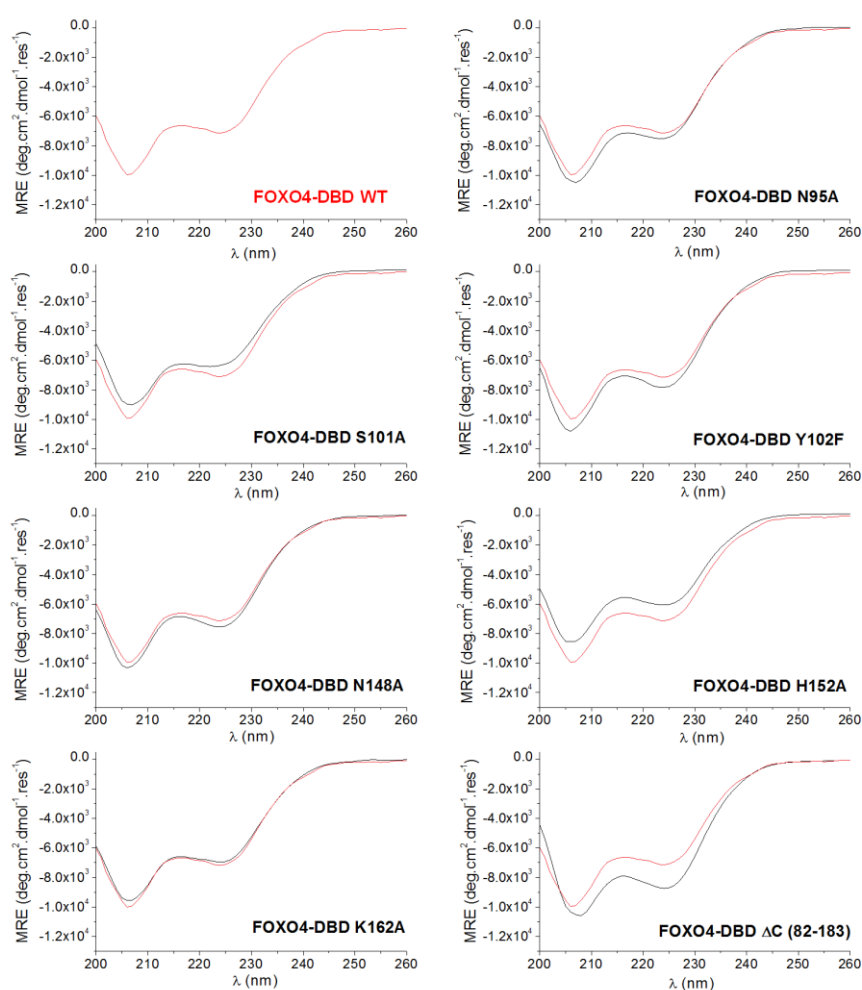
**Obr. 35 12% akrylamidový gel elektroforézy SDS-PAGE aniontové výměnné chromatografie 14-3-3 $\zeta$  na Q-Sepharóze.** *Proteiny v akrylamidové gelu SDS-PAGE jsou obarveny modře. Z velikosti a počtu pásů v jednotlivých drahách lze usuzovat na koncentraci a čistotu frakcí. V první dráze zleva je umístěn standard molekulových hmotností.*

Výsledkem purifikace konstruktů 14-3-3 $\zeta$  bylo obvykle 5 - 10 mg proteinu požadované čistoty a koncentrace 2 - 4 mg/ml.

## 4.2 Ověření vlastností proteinových konstruktů FOXO4

### 4.2.1 Ověření strukturní integrity proteinových konstruktů FOXO4-DBD pomocí CD spektroskopie

CD spektroskopie byla použita pro ověření integrity proteinových konstruktů FOXO4-DBD. Vzhledem ke změnám v primární struktuře proteinů existovala určitá pravděpodobnost, že jejich sekundární struktura a integrita by mohla doznat podstatných změn. Tato obava se ovšem v případě našich proteinových konstruktů ukázala jako lichá a všechny studované proteinové konstrukty si udržely stabilní a v dostatečné míře nepozměněnou strukturu, jak ukazuje shrnutí proměřených CD spekter na následujícím obrázku (Obr. 36).



**Obr. 36** Srovnání CD spekter vybraných proteinových konstruktů FOXO4-DBD s CD spektrem s FOXO4-DBD WT. Grafické vyjádření proměření CD spekter vybraných proteinových konstruktů ukazuje srovnání a shodu CD spektra vybraného proteinového konstruktů (černá křivka) s křivkou CD spektra FOXO4-DBD WT (červená křivka). Ze shrnutí je patrné, že charakter křivky se nemění, což ukazuje na nezměněnou strukturu mutantních forem FOXO4-DBD.

## 4.2.2 Ověření vazebných vlastností proteinových konstruktů

Abychom měli jistotu, že výsledky experimentů budou správně interpretovány, bylo třeba nejprve ověřit, že jejich biologická funkce nebyla nezbytnými úpravami pozměněna a proteinové konstrukty váží své vazebné partnery s nezměněnou afinitou.

### 4.2.2.1 Ověření DNA vazebných vlastností konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub>

Konstrukty proteinu FOXO4 byly použity jak pro experimenty v komplexu s DNA, tak v komplexu se 14-3-3 $\zeta$ . Při měření DNA vazebných vlastností proteinových konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> byly použity následující konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub>: WT; W-mutant (tryptofany pouze na pozici 173 a 174); single Cys<sup>92</sup>; single Cys<sup>142</sup>; single Cys<sup>155</sup>; single Cys<sup>183</sup>.

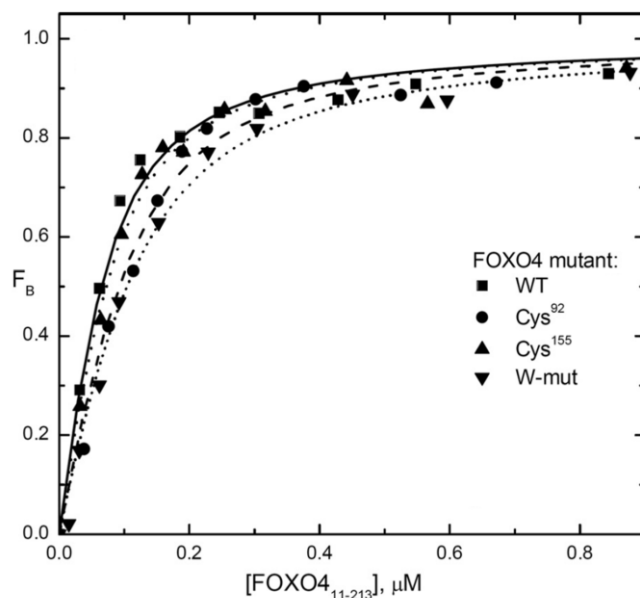
Jako vazebný partner byla použita dsDNA s motivem DBE značená fluorescenční sondou fluorescein:

**5' fluorescein-GCGTTGTTTACGC 3'**

**5'GCGTAAACAACGC 3'**

o koncentraci v kyvetě 100 nM. FOXO4<sub>11-213</sub> byl ve zvyšující se koncentraci titrován k roztoku dsDNA v kyvetě a po každé titraci byla změřena fluorescence při excitaci vzorku vlnovou délkou 494 nm. Emise byla měřena při vlnové délce 520 nm na přístroji PerkinElmer LS50B. Měření probíhala při 17 °C v pufru: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA.

Výsledkem měření byly vazebné izotermy, které nám poskytly informaci o rovnovážné disociační konstantě ( $K_D$ ) komplexů FOXO4 s dsDNA. Pro všechny připravené FOXO4<sub>11-213</sub> proteiny byly získány hodnoty  $K_D$  v rozmezí 28 - 42 nM. To je plně srovnatelné s  $K_D$  získanou pro FOXO4<sub>11-213</sub> WT ( $K_D = 34 \pm 6$  nM) (Silhan et al., 2009). Na základě těchto hodnot lze usuzovat na nezměněné vazebné vlastnosti konstruktů vzhledem k dsDNA s motivem DBE. Na obrázku 37 jsou znázorněny příklady vazebných izoterm pro konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub> single Cys<sup>92</sup> a FOXO4<sub>11-213</sub> single Cys<sup>155</sup> a jejich srovnání s vazebnou izotermou FOXO4<sub>11-213</sub> WT.



**Obr. 37** Vazebné izotermy pro ověření DNA vazebných vlastností konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub>. Při vynesení parametru  $F_B$  (frakce navázané DNA) oproti koncentraci titrovaného FOXO4<sub>11-213</sub> se vazebné izotermy jednotlivých konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> téměř překrývají s vazebnou křivkou FOXO4<sub>11-213</sub> WT, což ukazuje na jejich nezměněné vazebné vlastnosti.

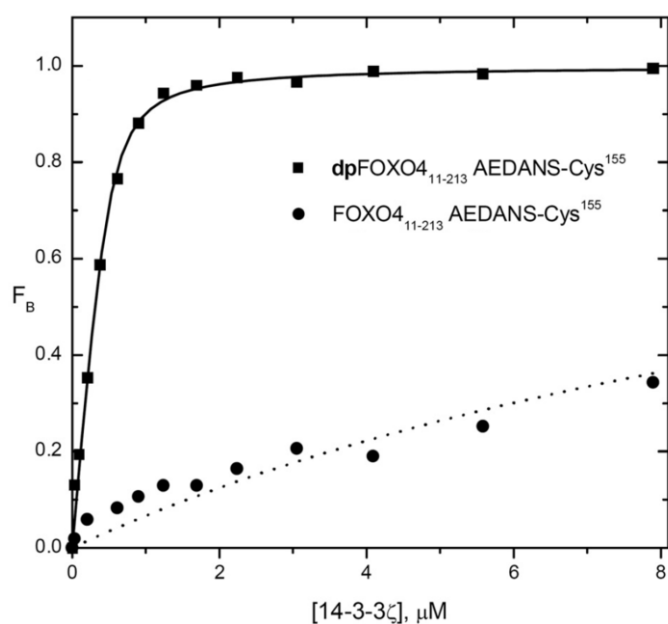
#### 4.2.2.2 Ověření vazebných vlastností konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> vzhledem k proteinu 14-3-3 $\zeta$

Pro ověření afinity připravených proteinových konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> vzhledem k proteinu 14-3-3 $\zeta$  byly použity následující konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub>: single Cys<sup>92</sup>; single Cys<sup>92</sup>; single Cys<sup>142</sup>; single Cys<sup>142</sup>; single Cys<sup>155</sup>; Cys<sup>155</sup>; single Cys<sup>183</sup>; Cys<sup>183</sup>.

Pro tento typ experimentu byly konstrukty FOXO4 místně specificky modifikovány thiol-reaktivní fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS a fosforylovány pomocí PKB $\alpha$  (-> dpFOXO4). Jako ligand, byl použit 14-3-3 $\zeta$  WT.

Ten byl ve zvyšujícím se množství titrován k roztoku konstruktu FOXO4<sub>11-213</sub> o koncentraci 0,5  $\mu$ M. Po každé titraci byla změřena fluorescence při excitaci vzorku vlnovou délkou 336 nm. Emise byla měřena při vlnové délce 490 nm na přístroji PerkinElmer LS50B. Měření probíhalo při 17 °C v pufru: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA.

Výsledkem měření byly vazebné izotermy, které nám poskytly informaci o rovnovážné disociační konstantě ( $K_D$ ) komplexu. Pro všechny připravené dpFOXO4<sub>11-213</sub> proteiny včetně WT byly získány hodnoty  $K_D$  v rozmezí 60 - 120 nM (Obr. 38) (Silhan et al., 2009). Na základě těchto dat lze usuzovat na nezměněné vazebné vlastnosti fosforylovaných konstruktů vzhledem k 14-3-3 $\zeta$ WT.



**Obr. 38** Vazebné izotermy získané při ověření vazebných vlastností konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> vzhledem k 14-3-3 $\zeta$ . Při vynesení parametru  $F_B$  (frakce navázaného FOXO4<sub>11-213</sub>) oproti koncentraci titrovaného 14-3-3 $\zeta$  je zřejmé, že vazebné izotermy fosforylovaného FOXO4<sub>11-213</sub> (dpFOXO4<sub>11-213</sub>) mají výrazně odlišný průběh od křivek systému s nefosforylovaným FOXO4<sub>11-213</sub>. Ze získaných dat lze usuzovat, že fosforylované konstrukty dpFOXO4<sub>11-213</sub> tvoří v roztoku komplex s proteinem 14-3-3 $\zeta$ .

### 4.3 Studium interakcí FOXO4-DBD s proteinem 14-3-3 $\zeta$

#### 4.3.1 Sledování změn v okolí místně definovaného fluoroforu

V následujících kapitolách shrnuji výsledky sledování změn v okolí různých typů fluoroforů pomocí fluorescenčních metod. Ve vazebných esejích bylo vždy sledováno chování volné a vázané formy sledované molekuly. Z naměřených hodnot a vzhledem ke známému umístění fluoroforů jsme schopni charakterizovat, zda ve sledované oblasti dochází, či nedochází ke strukturálním změnám, eventuálně vyhodnotit, k jak výrazným změnám zde dochází.

##### 4.3.1.1 Sledování časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS

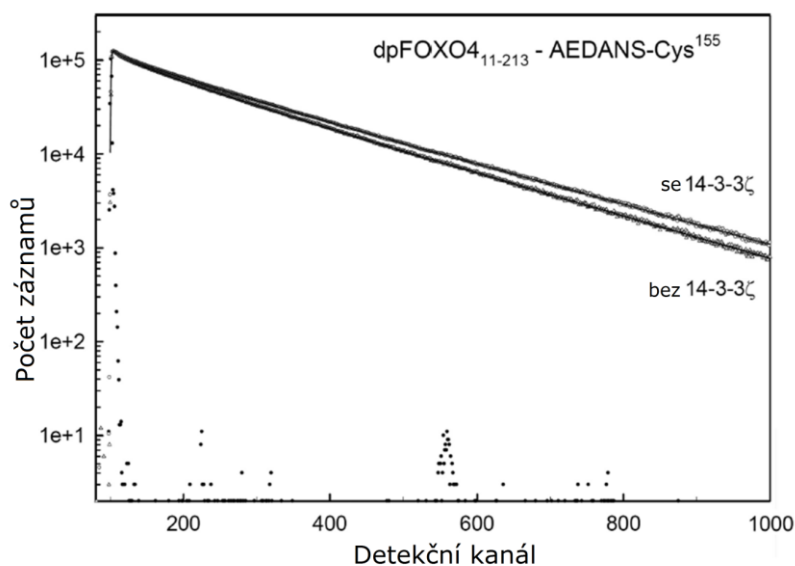
Jedním z možných mechanismů jak protein 14-3-3 inhibuje navázání transkripčních faktorů FOXO na molekulu DNA, je sterické stínění DNA vazebného rozhraní v DNA



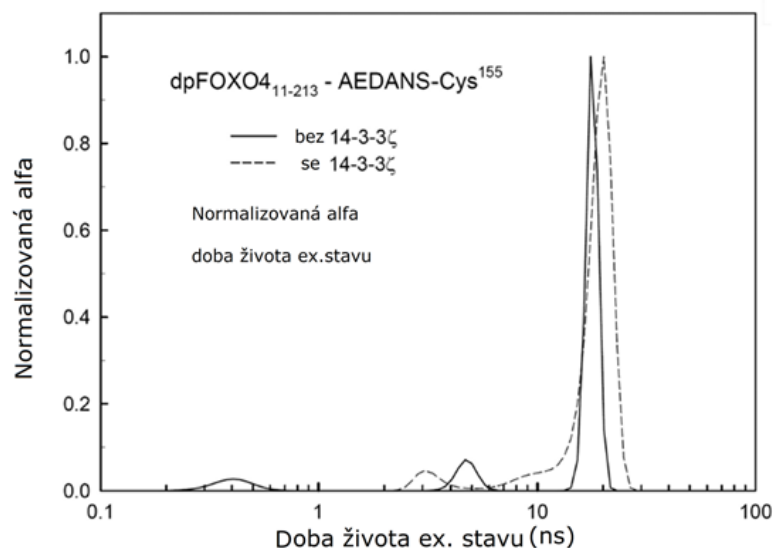
vazebné doméně proteinu FOXO. Pro lepší poznání změn, které se dějí při navázání proteinu 14-3-3 na FOXO-DBD byla provedena měření časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence všech čtyř single Cys mutantů FOXO4<sub>11-213</sub> s navázanou fluorescenční sondou AEDANS.

Všechna měření časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence byla prováděna pod tzv. "magickým úhlem" při teplotě 22 °C. Měření probíhalo v pufru: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA. Pro měření byly použity následující konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub> a dpFOXO4<sub>11-213</sub>: single Cys<sup>92</sup>; single Cys<sup>142</sup>; single Cys<sup>155</sup>; single Cys<sup>183</sup>.

Konstrukty byly značeny sondou AEDANS. Jejich koncentrace v kyvetě během experimentu byla 15 μM, zatímco koncentrace vazebného partnera – proteinu 14-3-3ζ WT byla 30 μM. Fluorescence sondy AEDANS byla excitována při vlnové délce 315 nm a emise detekována při vlnové délce 400 nm. Všechny vzorky byly změřeny v uspořádání s fosforylovaným FOXO4 proteinem (**dpFOXO4**) a s nefosforylovaným FOXO4. Jako příklad jsou znázorněna data získaná pro mutant FOXO4<sub>11-213</sub> single Cys<sup>155</sup> v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3ζ. Na obrázku 39 je graf dohasínání intenzity fluorescence a na obrázku 40 distribuce dob života excitovaného stavu sondy AEDANS na Cys<sup>155</sup>. Tabulka 2 obsahuje hodnoty průměrných dob života excitovaného stavu ( $\bar{\tau}$ ) sondy AEDANS pro všechny studované mutanty FOXO4<sub>11-213</sub>.



**Obr. 39** Dohasínání intenzity fluorescence sondy AEDANS na Cys<sup>155</sup> při vazbě proteinu 14-3-3. Z rozdílného kinetiky dohasínání v nepřítomnosti a v přítomnosti proteinu 14-3-3ζ lze usuzovat na změnu prostředí v okolí fluorescenční sondy AEDANS v důsledku tvorby komplexu.



**Obr. 40** Distribuce dob života excitovaného stavu fluorescenční sondy AEDANS navázané na Cys<sup>155</sup>. Změny v distribuci dob života excitovaného stavu AEDANS na Cys<sup>155</sup> v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3ζ ukazují na změnu prostředí v okolí fluorescenční sondy.

**Tab. 2** Průměrná doba života excitovaného stavu ( $\bar{\tau}$ ) fluorescenční sondy AEDANS pro různé uspořádání vzorků FOXO4<sub>11-213</sub> single Cys a 14-3-3ζ

Single-Cys mutant	Průměrná střední doba života excitovaného stavu $\bar{\tau}$ <sup>a</sup>			
	FOXO4-(11-213)	FOXO4-(11-213) + 14-3-3ζ	dpFOXO4-(11-213)	dpFOXO4-(11-213) + 14-3-3ζ
AEDANS-Cys <sup>92</sup>	15.7	15.9	15.8	17.4
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	15.8	16.0	15.9	17.2
AEDANS-Cys <sup>155</sup>	17.3	17.4	17.5	18.7
AEDANS-Cys <sup>183</sup>	15.4	15.6	15.4	16.8

<sup>a</sup> hodnota S.D je  $\pm 0.1$  ns.

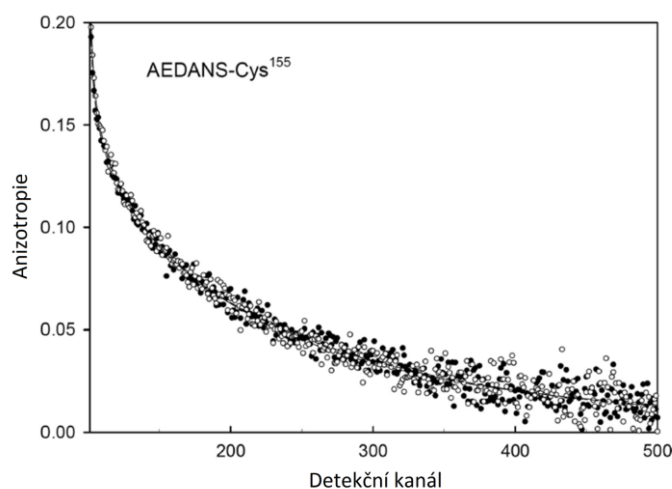
Z výsledků měření je patrné, že samotná fosforylace FOXO4 nemá vliv na střední dobu života excitovaného stavu sondy AEDANS navázané v jednotlivých pozicích. Dále se střední doba života excitovaného stavu sondy AEDANS nemění v uspořádání FOXO4:14-3-3ζ, kdy nedochází k tvorbě komplexu (tvorba komplexu vyžaduje fosforylaci FOXO4). Výrazné změny střední doba života excitovaného stavu sondy AEDANS ve všech studovaných pozicích byly pozorovány v systému dpFOXO4:14-3-3ζ. Z toho lze usuzovat, že pozorované zvýšení střední doby života excitovaného stavu sondy AEDANS je přímým důsledkem vazby proteinu 14-3-3ζ, který tak ovlivňuje buď přímo navázanou sondu či oblast na povrchu FOXO4, kde se sonda nachází. Největší změna byla pozorována pro dpFOXO4<sub>11-213</sub> se single Cys na pozicích 92 a 142. Na základě získaných dat můžeme usuzovat, že protein 14-3-3 interaguje se všemi čtyřmi oblastmi molekuly FOXO4, které byly označeny sondou AEDANS.

#### 4.3.1.2 Sledování časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS

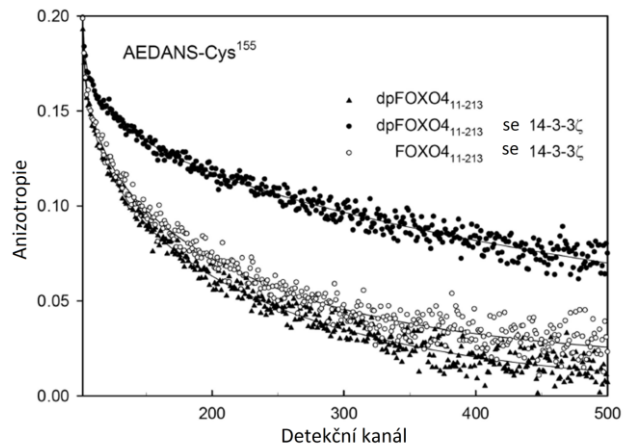
Sledování časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS jsme použili ke sledování efektu vazby proteinu 14-3-3 na segmentální pohyby označených oblastí DNA vazebné domény proteinu FOXO4. Tato pozorování nám přinesla řadu informací o charakteru vazby proteinu 14-3-3 v oblasti DNA vazebné domény proteinu FOXO4.

Měření časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence bylo prováděno za obdobných podmínek jako měření časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence. Pro měření byly použity následující proteinové konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub> a dp FOXO4<sub>11-213</sub>: single Cys<sup>92</sup>; single Cys<sup>142</sup>; single Cys<sup>155</sup>; single Cys<sup>183</sup>. Konstrukty byly značeny sondou AEDANS.

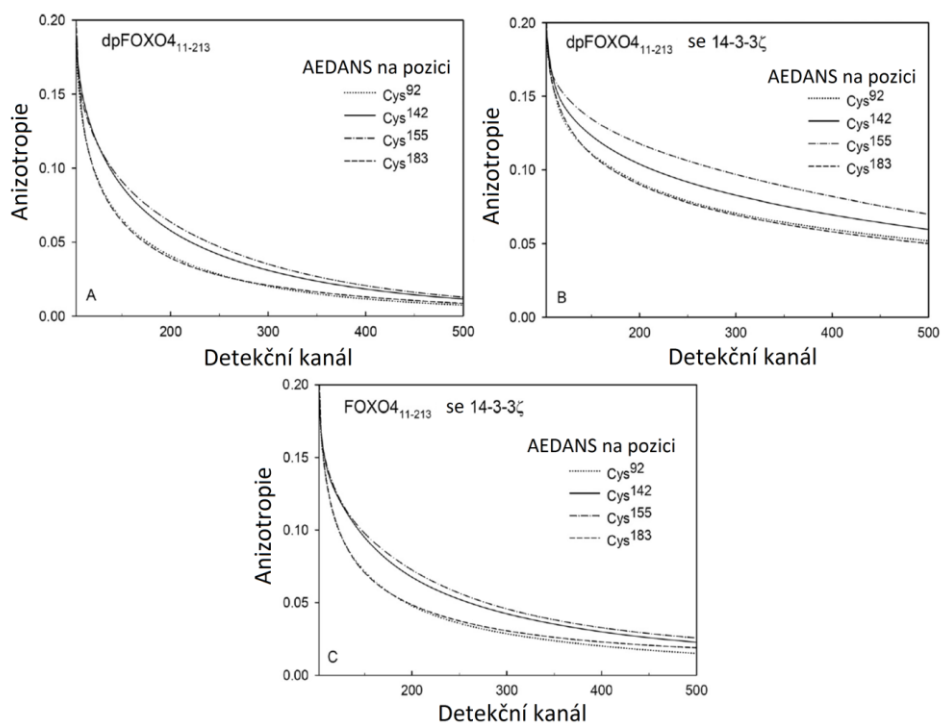
Tyto vzorky byly měřeny vždy v přítomnosti a v nepřítomnosti proteinu 14-3-3ζ WT. Znázorněním výsledků těchto měření je záznam časově-rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence a tabulka parametrů získaných analýzou dohasínání anizotropie. Obrázky 41 a 42 ukazují příklady časově-rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence AEDANS na Cys<sup>155</sup> (vliv fosforylace a vazby proteinu 14-3-3ζ). Obrázek 43 ukazuje vzájemné srovnání dohasínání anizotropie AEDANS všech studovaných mutantů FOXO4<sub>11-213</sub>. Parametry dohasínání anizotropie (výpočty hodnot rotačních korelačních časů a příslušných amplitud byly provedeny dle rovnic 7 a 8) a jsou uvedeny v tabulce 3.



**Obr. 41 Vliv fosforylace FOXO4<sub>11-213</sub> na dohasínání anizotropie fluorescence sondy AEDANS na Cys<sup>155</sup>.** Záznam dohasínání anizotropie fluorescence sondy AEDANS na fosforylovaném konstruktu FOXO4<sub>11-213</sub> single Cys<sup>155</sup> (plné tečky) se prakticky shoduje se záznamem dohasínání anizotropie fluorescence sondy AEDANS na nefosforylovaném konstruktu FOXO4<sub>11-213</sub> single Cys<sup>155</sup> (prázdné tečky).



**Obr. 42** Vliv 14-3-3 $\zeta$  na dohasínání anizotropie fluorescence sondy AEDANS. Na tomto grafu lze vysledovat, že dohasínání anizotropie fluorescence v přítomnosti 14-3-3 $\zeta$  je vzhledem ke vzorkům měřeným bez 14-3-3 $\zeta$  pomalejší. V případě fosforylovaného FOXO4 (dpFOXO4), který tvoří komplex se 14-3-3 $\zeta$  je tento rozdíl daleko výraznější v porovnání s nefosforylovaným FOXO4, který se 14-3-3 $\zeta$  neinteraguje.



**Obr. 43** Srovnání mobility sondy AEDANS na různých segmentech FOXO4-DBD. Srovnáním záznamů dohasínání anizotropie fluorescence lze usuzovat na pohyblivost jednotlivých segmentů označených fluorescenční sondou AEDANS. Jednotlivé typy čar představují nejlepší proložení záznamu dohasínání anizotropie fluorescence.

Ze srovnání křivek dohasínání anizotropie fluorescence (Obr. 43) lze soudit, že pohyblivost segmentů v oblasti cysteinů 142 a 155 je menší než pohyblivost segmentů v oblasti cysteinů 92 a 183. Tento rozdíl je zachován i při vazbě proteinu 14-3-3ζ. Z toho lze usuzovat, že ačkoliv je pohyblivost jednotlivých segmentů různá, všechny oblasti jsou co do pohyblivosti ovlivněny vazbou 14-3-3ζ. Tato pozorování potvrzují i hodnoty amplitud rotačních korelačních časů, které odpovídají rychlým pohybům ( $\phi_1$  a  $\phi_2$  pro dpFOXO4<sub>11-213</sub> a  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  a  $\phi_3$  pro dpFOXO4<sub>11-213</sub> v komplexu se 14-3-3ζ). Součty těchto amplitud  $\beta_{\text{fast}}$  ( $\beta_{\text{fast}} = \beta_1 + \beta_2$  pro dpFOXO4<sub>11-213</sub> a  $\beta_1 + \beta_2 + \beta_3$  pro dpFOXO4<sub>11-213</sub> v komplexu se 14-3-3ζ) jsou uvedeny v tabulce 3. Hodnota  $\beta_{\text{fast}}$  by měla být rovna nule při úplné imobilizaci sondy. Z poklesu hodnot  $\beta_{\text{fast}}$  při vazbě proteinu 14-3-3ζ na dpFOXO<sub>11-213</sub> lze usuzovat, že tvorba komplexu snižuje pohyblivost sondy AEDANS ve všech studovaných oblastech povrchu FOXO4, zejména však v oblastech obsahujících Cys<sup>92</sup> a Cys<sup>183</sup>. V oblastech obsahující Cys<sup>142</sup> a Cys<sup>155</sup> je vliv vazby proteinu 14-3-3ζ na mobilitu navázané sondy AEDANS výrazně slabší.

**Tab. 3 Parametry dohasínání anizotropie single Cys mutantů FOXO4<sub>11-213</sub>.**

Single-Cys FOXO4 <sub>11-213</sub>	dpFOXO4-(11-213)								
	$\beta_1$	$\phi_1$	$\beta_2$	$\phi_2$	$\beta_3$	$\phi_3$	$\beta_4$	$\phi_4$	$\beta_1 + \beta_2$ <sup>a</sup>
AEDANS-Cys <sup>92</sup>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>	0.145
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	0.070	0.7	0.075	5.2	0.045	24			0.091
AEDANS-Cys <sup>155</sup>	0.024	0.3	0.067	2.8	0.099	19			0.078
AEDANS-Cys <sup>183</sup>	0.033	0.3	0.045	2.7	0.112	18			0.145
	0.071	0.7	0.074	4.9	0.045	23			
Single-Cys FOXO4 <sub>11-213</sub>	dpFOXO4-(11-213) + 14-3-3ζ								
	$\beta_1$	$\phi_1$	$\beta_2$	$\phi_2$	$\beta_3$	$\phi_3$	$\beta_4$	$\phi_4$	$\beta_1 + \beta_2 + \beta_3$ <sup>a</sup>
AEDANS-Cys <sup>92</sup>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>	0.105
AEDANS-Cys <sup>142</sup>			0.047	0.9	0.058	7.6	0.085	80	0.083
AEDANS-Cys <sup>155</sup>	0.021	0.4	0.020	1.9	0.042	7.4	0.107	69	0.062
AEDANS-Cys <sup>183</sup>	0.018	0.3	0.020	2.3	0.024	8.2	0.128	67	0.106
			0.053	1.6	0.053	8.3	0.084	77	

<sup>a</sup> hodnota S.D. je  $\pm 0.005$ .

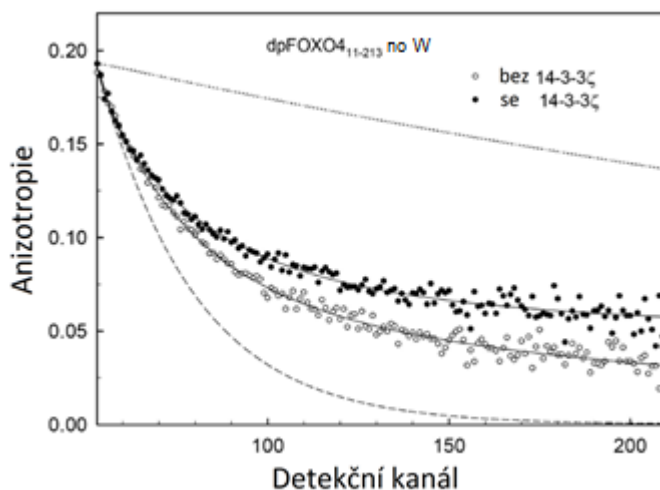
#### 4.3.1.3 Časově rozlišené dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence

Pro zmapování změn uvnitř DNA vazebné domény proteinu FOXO4 jsme použili časově rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence. Konstrukty FOXO4 byly upraveny tak, aby pozice tryptofanů, a tím sledovaná oblast, byla jasně definovaná. Záměrem bylo sledovat možné strukturní změny v této oblasti.

Měření časově rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence bylo prováděno za obdobných podmínek jako měření časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence sondy AEDANS s tím rozdílem, že excitace tryptofanů byla vyvolána monochromatickým zářením o vlnové délce 297 nm a fluorescence byla detekována při vlnové délce 355 nm. Pro měření byly použity proteinové konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub> noW a dpFOXO4<sub>11-213</sub> noW. Tyto vzorky byly měřeny vždy za přítomnosti a nepřítomnosti

proteinu: 14-3-3 $\zeta$  noW (konstrukt bez tryptofanů).

Znázorněním výsledků těchto měření je stejně jako v předchozí kapitole záznam časově-rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence (Obr. 44) a tabulka parametrů dohasínání anizotropie (Tab. 4).



**Obr. 44** Vliv vazby 14-3-3 $\zeta$  noW na dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanů 173 a 174 ve struktuře FOXO4<sub>11-213</sub>. Tento společný graf představuje srovnání dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanů za přítomnosti 14-3-3 $\zeta$  a bez jeho přítomnosti. Horní tečkovaná čára představuje hypotetickou situaci, kdy by segment v oblasti Trp173 a Trp174 byl kompletně imobilizován. Naproti tomu, dolní čárkovaná čára představuje hypotetickou situaci, při které by segment v oblasti Trp173 a Trp174 měl maximální volnost pohybu.

Na tomto společném grafu lze pozorovat, že dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanů v přítomnosti 14-3-3 $\zeta$  je vzhledem ke vzorkům bez 14-3-3 $\zeta$  pomalejší. Ovšem změna je velmi malá a spíše se zde projevuje jen zpomalení depolarizace anizotropie vzhledem ke zvýšené molekulové hmotnosti komplexu dpFOXO4:14-3-3. To potvrzují i parametry získané analýzou dohasínání anizotropie fluorescence (Tab. 4). Na základě těchto dat můžeme předpokládat, že vazba proteinu 14-3-3 $\zeta$  nezpůsobuje strukturální změnu (změnu mobility) v oblasti obsahující Trp<sup>173</sup> a Trp<sup>174</sup>.

**Tab. 4** Parametry dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanů 173 a 174 ve struktuře FOXO4<sub>11-213</sub>.

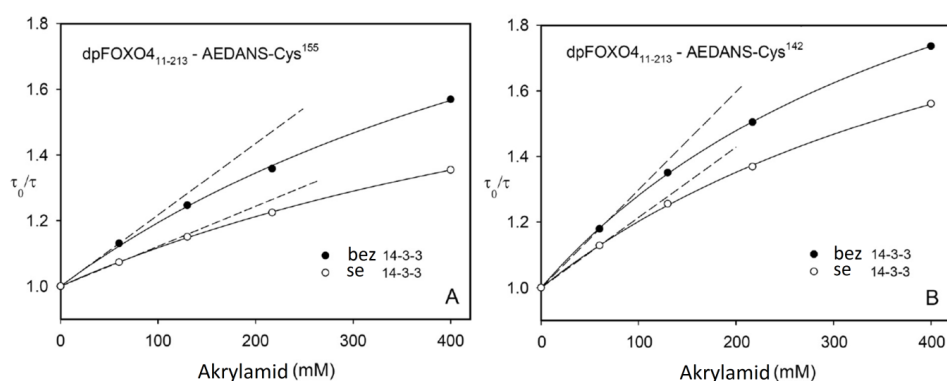
Vzorek	$\bar{\tau}^a$	$\beta_1^b$	$\phi_1$	$\beta_2$	$\phi_2$
	<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>
FOXO4-(11-213)W-mutant	4.9	0.12	2.4	0.07	18
dpFOXO4-(11-213)W-mutant	4.9	0.12	2.5	0.07	20
dpFOXO4-(11-213)W-mutant + 14-3-3	4.9	0.11	2.6	0.08	>45

<sup>a</sup> hodnota S.D. je  $\pm 0.1$  ns.

<sup>b</sup> hodnota S.D. je  $\pm 0.007$ .

#### 4.3.1.4 Zhášení fluorescence specificky umístěné fluorescenční sondy AEDANS

Předchozí experimenty ukázaly, že segmentální pohyb v oblasti cysteinů 142 a 155 není vazbou 14-3-3 $\zeta$  příliš omezen, ačkoliv se předpokládá interakce obou proteinů v této oblasti. Pro potvrzení teorie sterického stínění této oblasti byla provedena měření zhášení anizotropie fluorescence sondy AEDANS na cysteinech 142 a 155 akrylamidem, který by se při těsné blízkosti proteinů neměl dostat do nejbližšího okolí sondy a efekt zhášení by měl být minimální. Podmínky měření byly obdobné jako při předchozích sledování anizotropie fluorescence. Časově-rozlišené dohasínání intenzity fluorescence bylo měřeno při různých koncentracích zhášedla akrylamidu. Excitace byla provedena monochromatickým zářením o vlnové délce 315 nm a detekce emise byla změřena při vlnové délce 480 nm. Tyto experimenty byly provedeny se všemi připravenými proteinovými konstrukty FOXO4<sub>11-213</sub>. Vazebným partnerem proteinových konstruktů FOXO4 byl protein 14-3-3 $\zeta$  WT. Výsledkem pokusů je graf závislosti poměru  $\tau_0/\tau$  na různých koncentracích zhášedla akrylamidu (Obr. 45).



**Obr. 45** Efekt vazby 14-3-3 $\zeta$  na dobu života excitovaného stavu sondy AEDANS v přítomnosti zhášedla akrylamidu. Výsledky experimentu zhášení fluorescence sondy AEDANS na cysteinech 142 a 155 konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> ukazují srovnání efektu zhášedla v nepřítomnosti 14-3-3 $\zeta$  (plné tečky) a za přítomnosti a tedy při vazbě 14-3-3 $\zeta$  (prázdné tečky).

Závislost poměru  $\tau_0/\tau$  na různých koncentracích zhášedla akrylamidu vykazují ohyb směrem dolů, což je normální odchylka od linearit pro fluorofory s více komponentami doby života excitovaného stavu. Nižší hodnoty poměru  $\tau_0/\tau$  v přítomnosti 14-3-3 znamenají nárůst doby života excitovaného stavu fluoroforu a tedy snížený efekt zhášení, což v tomto případě podporuje teorii o omezení přístupu molekul zhášedla k fluoroforu způsobené těsnou blízkostí proteinů dpFOXO4 a 14-3-3 $\zeta$  v této oblasti.

### 4.3.2 Stanovení intermolekulárních vzdáleností v komplexu FOXO4-DBD:14-3-3 $\zeta$ metodou Försterova rezonančního přenosu energie

Záměrem těchto měření bylo získání několika specifických intermolekulárních vzdáleností v molekule komplexu fosforylovaného FOXO4:14-3-3, které by sloužily k vytvoření realistického modelu tohoto komplexu ze známých krystalových struktur obou podjednotek. Pro měření vzdáleností mezi donorem a akceptorem fluorescence v komplexu pFOXO4:14-3-3 $\zeta$  byly použity proteinové konstrukty pFOXO4<sub>82-207</sub>: single Cys<sup>101</sup>; single Cys<sup>142</sup> a single Cys<sup>183</sup>, všechny s navázanou fluorescenční sondou AEDANS v tomto případě sloužící jako excitující se donor při rezonančním přenosu energie na fluorescenční sondu fluorescein navázané na monomerní konstrukty 14-3-3 $\zeta$ : single Cys<sup>25</sup> a single Cys<sup>189</sup> (monomerní konstrukt obsahuje ve své struktuře mutaci Ser158 na Asp158, která zabraňuje utváření dimerní formy proteinu 14-3-3 $\zeta$ , tyto mutanty byly připraveny ve shodě s protokolem pro purifikaci proteinů 14-3-3 popsáným v kapitole 3.2.1.17). Monomerní verze proteinu 14-3-3 byla použita z důvodu nutnosti připravit systém obsahující pouze jednu molekulu donoru a jednu molekulu akceptoru (pro výpočet vzdálenosti mezi donorem a akceptorem je nutný právě takový systém). Sonda AEDANS byla excitována zářením o vlnové délce 315 nm a její emise byla detekována při vlnové délce 480 nm.

Försterův kritický poloměr ( $R_0$ ) donor-akceptorového páru AEDANS-fluorescein byl stanoven pomocí rovnic 11 a 12. Spočítané hodnoty překryvového integrálu  $J(\lambda)$  (dle rovnice 13) mezi AEDANS a fluoresceinem jsou uvedeny v tabulce 5. Kvantový výtěžek fluorescence pFOXO4<sub>82-207</sub>-AEDANS při 22 °C v přítomnosti neznačeného proteinu 14-3-3 byl stanoven 0,058 pro mutant single Cys<sup>101</sup>-AEDANS, 0,114 pro mutant single Cys<sup>142</sup>-AEDANS a 0,181 pro mutant single Cys<sup>183</sup>-AEDANS. Průměrné doby života excitovaného stavu ( $\bar{\tau}$ ) sondy AEDANS v přítomnosti a v nepřítomnosti akceptoru fluorescence (fluorescein), úspěšnost přenosu energie a spočítané průměrné vzdálenosti jsou rovněž součástí tabulky 5. Na základě získaných vzdáleností byl připraven realistický strukturní model komplexu pFOXO4:14-3-3 $\zeta$ , jehož vizualizaci uvádím jako obrázek 46.



**Tab. 5 Parametry intermolekulárních vzdáleností získaných metodou FRET**

pFOXO4 (donor)	14-3-3ζ (akceptor)	Uspořádání vzorku	$\tau^{a,b}$	$E^c$	$J(\lambda)^d$	$R_0^e$	$R$
Cys <sup>101</sup>	Cys <sup>25</sup>	pouze donor	16.8	51.8	$1.508 \times 10^{-13}$	34.7	34.3
Cys <sup>101</sup>	Cys <sup>189</sup>	donor + akceptor	8.1	47.3			35.3
Cys <sup>142</sup>	Cys <sup>25</sup>	pouze donor	8.9	32.7	$1.554 \times 10^{-13}$	39.0	44.0
Cys <sup>142</sup>	Cys <sup>189</sup>	donor + akceptor	16.5	31.3			44.5
Cys <sup>183</sup>	Cys <sup>25</sup>	pouze donor	11.1	42.2	$1.578 \times 10^{-13}$	42.3	44.5
Cys <sup>183</sup>	Cys <sup>189</sup>	donor + akceptor	16.6	28.1			49.4
			9.6				
			16.7				
			12.0				

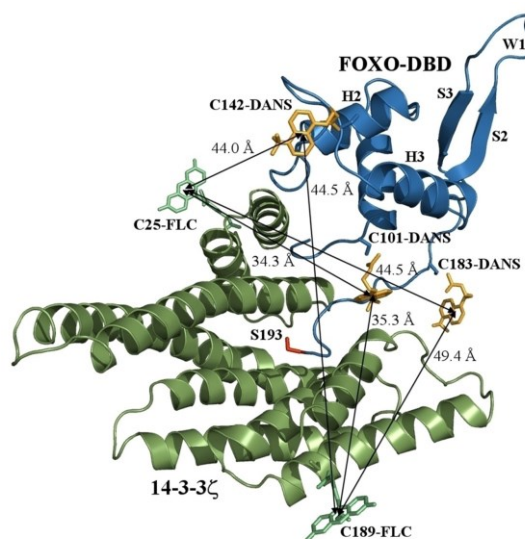
<sup>a</sup> Průměrná doba života byla spočítána jako  $\tau_{\text{mean}} = \sum f_i \tau_i$ , kde  $f_i$  je frakce intenzity i-té složky doby života  $\tau_i$ .

<sup>b</sup> hodnota S.D. je  $\pm 0.1$  ns

<sup>c</sup> přenos energie

<sup>d</sup> spektrální překryvový integrál fluorescence donoru a absorpce akceptoru

<sup>e</sup> Försterův kritický poloměr představuje vzdálenost mezi donorem a akceptorem kde efektivita FRET je 50%



**Obr. 46** Strukturní model komplexu FOXO4-DBD:14-3-3ζ s vyznačenými intermolekulárními vzdálenostmi. Realistický model komplexu FOXO4-DBD:14-3-3ζ nabízí lepší představu vzájemné pozice studovaných proteinů pro zhodnocení výsledků dalších měření. V modelu jsou šipkami vyznačeny intermolekulární vzdálenosti získané pomocí FRET.

#### 4.4 Studium mechanismu vazby FOXO4-DBD s DNA

Studium mechanismu vazby FOXO4-DBD s DNA bylo provedeno metodou SPR a dále bylo doplněno pozorováním segmentálních pohybů v oblasti FOXO4-DBD pomocí časově rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence. Metoda SPR byla použita pro její schopnost sledovat kinetiku molekulárních interakcí v reálném čase. Díky tomu, jsme byli schopni pozorovat konformační změny při vazbě FOXO4-DBD se dvěma DNA vazebnými motivy (DBE a IRE) a stanovit kinetický model této interakce. Tato měření byla provedena na řadě mutantů, kde mutace různých aminokyselin na

aminokyseliny alanin způsobila zrušení polární vazby v určitém místě (seznam mutantů a charakter nespécifické vazby v oblasti mutace je uveden v tabulce 6). Srovnání výsledků pro jednotlivé mutanty ukázalo, že určité nespécifické vazby FOXO4-DBD na páteř molekuly DNA hrají významnou roli pro sílu i specifičnost vazby.

Pozorování konformačních změn bylo na závěr doplněno sledováním časově rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence, které v souladu s výsledky SPR ukázalo výraznou redukci segmentální dynamiky FOXO4-DBD v komplexu s DNA.

**Tab. 6 Charakter slabých nekovalentních interakcí v komplexu FOXO4-DBD s DNA.**

konstrukt FOXO4-DBD	element sekundární struktury <sup>a</sup>	typ polárního kontaktu <sup>b</sup>
R94A	NT	SC-DNA(P)/ES
N95A	NT	SC-DNA(P),SC-W-DNA(P)
S101A	H1	SC-W-DNA(P)
Y102F	H1	SC-DNA(P)
S142A	H2-H3	SC-DNA(P),SC-W-DNA(P)
N148A	H3	SC-DNA(B),SC-W-DNA(B)
S149A	H3	SC-W-DNA(P)
R151A	H3	SC-W-DNA(B)
H152A	H3	SC-DNA(B),SC-W-DNA(B)
N153A	H3	SC-W-DNA(P)
S155A	H3	SC-DNA(P)
K162A	S2	SC-DNA(P)/ES
S171A	W1	SC-W-DNA(P)
S172A	W1	SC-DNA(P)
ΔC(82-183)	W2(chybějící)	1xSC-DNA(P)/ES,1xES,2xSC-DNA(P) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> NT, N-terminální smyčka; H1, α-helix H1; H2-H3, smyčka mezi α-helixy H2 a H3; H3, α-helix H3; S2, β skládaný list S2; W1, křídlo W1; W2, křídlo W2.

<sup>b</sup> SC-DNA(P), vodíková vazba postranního řetězce a fosfátové skupiny; SC-W-DNA(P), interakce postranního řetězce a fosfátové skupiny za účasti molekuly vody; SC-DNA(B), vodíková vazba postranního řetězce a báze; SC-W-DNA(B), báze specifická interakce postranního řetězce a báze za účasti molekuly vody; ES, elektrostatická

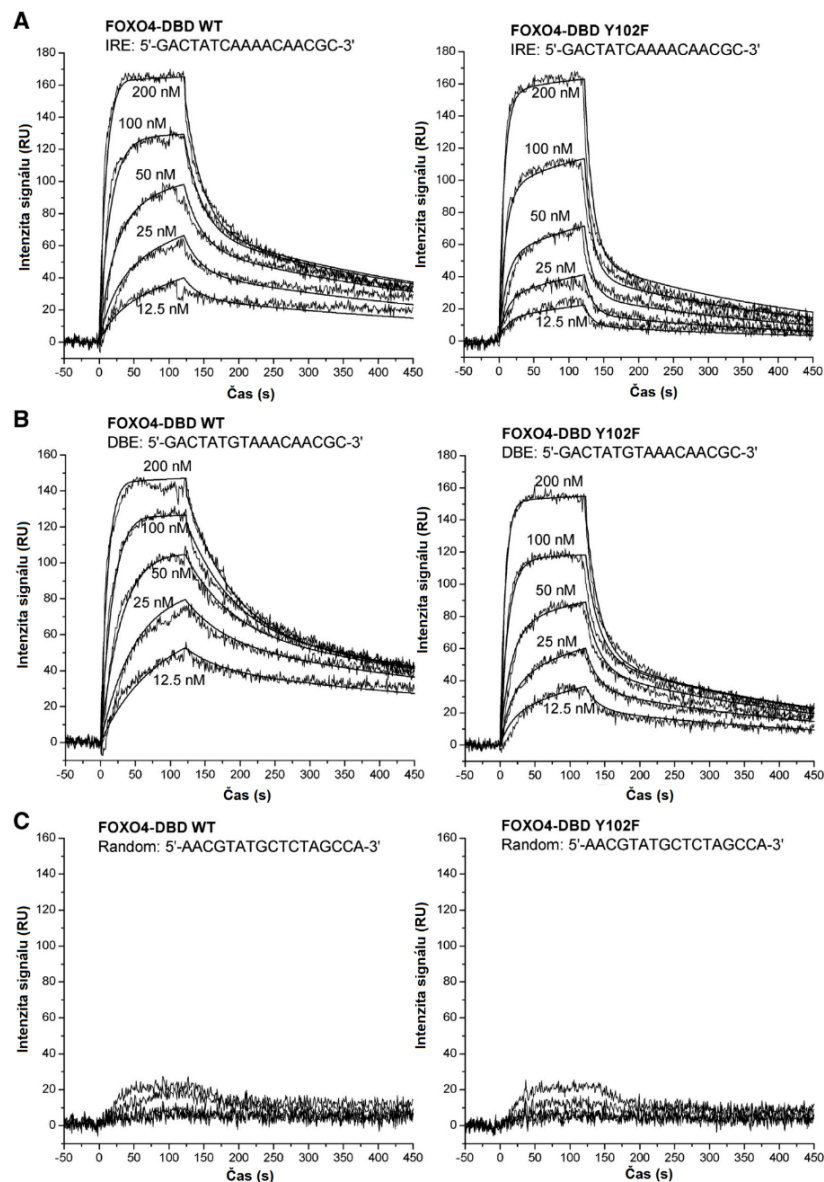
<sup>c</sup> informace získaná z krystalové struktury komplexu FOXO3-DBD-DNA (Tsai KL et al., 2007)

Tato tabulka ukazuje, jaké typy interakcí protein-DNA jsou ovlivněny v jednotlivých připravených mutantních verzích FOXO4-DBD.

#### 4.4.1 Studium kinetiky interakcí na DNA vazebném rozhraní FOXO4-DBD

Tato měření byla prováděna metodou SPR. Vazebným partnerem FOXO4-DBD proteinových konstruktů pro tato měření byla s Biotinem konjugovaná dsDNA s motivem IRE, DBE a s motivem nevazebné (náhodné) sekvence. Pro pozorování byly použity tyto dva vazebné motivy (DBE a IRE), protože každý z nich vykazuje rozdílnou afinitu vzhledem k FOXO-DBD (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008). Porovnání získaných výsledků nám tak může přinést informaci o významu jednotlivých kontaktů pro specifitu interakce mezi FOXO-DBD a DNA. dsDNA byla imobilizovaná na

neutravidinem ošetřeném LCP čipu přes molekulu biotinu. Aby byl minimalizován efekt přenosu hmoty a nespecifických vazeb, byla nejprve provedena měření pro tři různé koncentrace dsDNA. Data z těchto testovacích měření dosahovala změny indexu lomu v hodnotách 30, 80 a 150 RU (z angl. "Response Unit" = jednotka odpovědi, v grafech uvedeno jako "Intenzita signálu"). Tato předběžná měření různých koncentrací dsDNA byla prováděna s konstrukty FOXO4-DBD o koncentracích v rozmezí 10 až 200 nM. Výsledky těchto měření vykazovaly závislost rychlostní konstanty  $k_{off}$  na koncentraci při hodnotách RU 80 a 150, což ukazuje na nežádoucí efekt přenosu hmoty. Naproti tomu data při hodnotách 30 RU při konstantním průtoku 50  $\mu$ l/min dávala čistý signál a tyto podmínky byly proto vybrány pro studium kinetiky vazby. DNA navázaná na LCP čip byla postupně konfrontována se vzorky proteinu FOXO4-DBD o pěti různých koncentracích (12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM; 200 nM). Tímto způsobem byla získána sada senzogramů jednotlivých měření v reálném čase (Obr. 47). Tyto senzogramy byly dále zpracovány dle metodiky uvedené v oddíle Materiál a metody (kapitola 3.2.2.3), čímž byla získána řada parametrů uvedených v tabulkách 7 a 8. Při studiu interakcí na DNA vazebném rozhraní FOXO4 metodou SPR byly použity proteinové konstrukty FOXO4<sub>82-207</sub>: WT, R94A, N95A, S101A, Y102F, S142A, N148A, S149A, R151A, H152A, N153A, S155A, K162A, S171A, S172A,  $\Delta$ C (82-183). Tyto proteinové konstrukty byly konfrontovány s dsDNA s motivy DBE, IRE a nevazebným (náhodným) motivem.



**Obr. 47** Senzogramy získané pomocí SPR při měření kinetiky interakce FOXO4-DBD s DNA. Výstup signálu při měření SPR vytváří tzv. senzogram, tedy graf intenzity signálu z povrchu čipu v závislosti na čase. Zde jsou uvedeny senzogramy společně pro různé koncentrace vybraného vzorku. Každá samostatná křivka senzogramu má tři fáze. Fázi s kladnou směrnicí pro asociaci komplexu, fázi „plató“ a fázi se zápornou směrnicí pro disociaci vzorku. Z charakteru těchto tří fází lze vyčíst průběh interakce a extrapolovat hodnoty okamžitých asociačních a disociačních konstant stejně jako rovnovážnou disociační konstantu. Jako příklad senzogramů zde byly vybrány senzogramy proteinového konstruktu FOXO4<sub>82-207</sub>-DBD WT, jakožto standardu pro pozorování změn a proteinového konstruktu FOXO4<sub>82-207</sub>-DBD Y102F, jakožto konstruktu s výraznější změnou kinetiky při vazbě na DNA. Část A obrázku představuje srovnání interakce WT formy FOXO4 a konstruktu Y102F s motivem DNA IRE. Část B obrázku představuje srovnání interakce WT formy FOXO4 a konstruktu Y102F s motivem DNA DBE. Část C obrázku představuje srovnání interakce WT formy FOXO4 a konstruktu Y102F s ne vazebným náhodným (Random) motivem DNA.

Záznam signálu interakce FOXO4-DBD v reálném čase (senzogram) s oběma motivy dsDNA (DBE a IRE) vykazoval typický průběh asociační a disociační fáze (Obr. 47A a 47B). Nespecifičnost vazby byla vyloučena experimenty s vazbou konstruktů FOXO4-DBD na nevazebnou (náhodná) dsDNA, které se ukázali výlučně negativní (Obr. 47C).

Kinetické parametry interakce FOXO4-DBD s dsDNA byly spočítány z celkového proložení koncentračně závislých vazebných křivek. Pro získání asociačních a disociačních rychlostních konstant byla data nejdříve proložena jednoduchým Langmuirovým 1:1 modelem (Rovnice 14). Tento jednoduchý vazebný model však nebyl schopen adekvátně popsat získaná data. Proto byl dále k analýze použit tzv. dvou-stavový model zohledňující konformační změny (Rovnice 15). Tímto modelem spočítané asociační ( $k_{a1}$ ,  $k_{a2}$ ) a disociační ( $k_{d1}$ ,  $k_{d2}$ ) rychlostní konstanty pro oba vazebné motivy dsDNA DBE a IRE jsou uvedeny v tabulce 7 respektive 8, společně s rovnovážnými disociačními konstantami  $K_D$  pro jednotlivé mutanty FOXO4-DBD.

**Tab. 7 Parametry interakcí FOXO4-DBD s dsDNA motivu IRE.**

	$k_{a1} \times 10^{-5}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d1} \times 10^2$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{a2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ (nM) <sup>b</sup>	$\Delta$ <sup>c,d</sup>
WT (82-207)	1.67 ± 0.18	2.42 ± 0.31	3.65 ± 0.33	2.63 ± 0.28	60 ± 10	
R94A	1.85 ± 0.19	4.88 ± 0.56	3.74 ± 0.41	3.17 ± 0.35	120 ± 30	+
N95A	1.14 ± 0.09	3.56 ± 0.52	3.31 ± 0.34	2.35 ± 0.27	130 ± 30	+
S101A	0.87 ± 0.12	2.63 ± 0.31	3.47 ± 0.41	2.12 ± 0.25	120 ± 30	+
Y102F	1.59 ± 0.18	7.72 ± 0.83	2.99 ± 0.3	2.46 ± 0.28	220 ± 50	++
S142A	2.09 ± 0.23	1.96 ± 0.21	3.89 ± 0.46	1.68 ± 0.21	28 ± 7	*
N148A	1.84 ± 0.14	6.52 ± 0.52	2.7 ± 0.32	3.26 ± 0.35	190 ± 40	++
S149A	1.7 ± 0.21	4.62 ± 0.64	2.65 ± 0.28	1.85 ± 0.21	110 ± 30	-
R151A	0.98 ± 0.09	2.63 ± 0.38	4.8 ± 0.53	1.89 ± 0.21	80 ± 20	-
H152A	1.38 ± 0.14	4.19 ± 0.53	3.11 ± 0.37	2.25 ± 0.24	130 ± 30	+
N153A	1.25 ± 0.92	5.19 ± 0.58	3.61 ± 0.38	1.24 ± 0.14	110 ± 80	-
S155A	1.4 ± 0.17	5.13 ± 0.67	3.6 ± 0.35	1.36 ± 0.15	100 ± 20	-
K162A	1.31 ± 0.15	3.41 ± 0.37	2.92 ± 0.31	0.38 ± 0.04	30 ± 7	*
S171A	0.93 ± 0.12	2.02 ± 0.27	3.04 ± 0.33	0.84 ± 0.09	50 ± 10	-
S172A	1.6 ± 0.13	3.79 ± 0.65	3.08 ± 0.33	2.01 ± 0.22	90 ± 20	-
$\Delta C$ (82-183)	2.52 ± 0.35	28.3 ± 4.1	3.9 ± 0.43	3.18 ± 0.37	500 ± 100	+++

<sup>a</sup> Hodnoty parametrů jsou průměry ± S.D. z analýzy dvou duplicitních nezávislých měření

<sup>b</sup> Rovnovážná disociační konstanta ( $K_D$ ) byla stanovena vztahem  $1/[(k_{a1}/k_{d1}) \times (1 + k_{a2}/k_{d2})]$  za předpokladu dvoustavového vazebného modelu. Celková chyba byla spočítána z chyb ve stanovení rychlostních konstant.

<sup>c</sup> Relativní zvýšení  $K_D$  vzhledem k WT: (-), < 2×; (+), 2-3×; (++) , 3-4×; (+++) , >4×.

<sup>d</sup> (\*) značí významný pokles  $K_D$  vzhledem k WT

**Tab. 8 Parametry interakcí FOXO4-DBD s dsDNA motivu DBE**

	$k_{a1} \times 10^{-5}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d1} \times 10^2$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{a2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ (nM) <sup>b</sup>	$\Delta$ <sup>c,d</sup>
WT (82-207)	2.02 ± 0.19	1 ± 0.13	2.65 ± 0.24	1.32 ± 0.09	16 ± 3	
R94A	2.61 ± 0.35	1.93 ± 0.26	3.65 ± 0.4	2.33 ± 0.26	29 ± 7	-
N95A	1.37 ± 0.14	2.27 ± 0.25	3.47 ± 0.36	1.55 ± 0.18	50 ± 10	++
S101A	0.97 ± 0.11	2.04 ± 0.26	2.82 ± 0.31	1.42 ± 0.17	70 ± 20	+++
Y102F	2.14 ± 0.27	4.49 ± 0.58	3.49 ± 0.38	1.97 ± 0.21	80 ± 20	+++
S142A	2.6 ± 0.31	0.77 ± 0.09	2.68 ± 0.25	0.84 ± 0.1	7 ± 2	*
N148A	2.14 ± 0.23	4.59 ± 0.49	2.2 ± 0.24	3.79 ± 0.45	140 ± 30	+++
S149A	2.61 ± 0.35	2.06 ± 0.19	2.26 ± 0.27	0.77 ± 0.09	20 ± 5	-
R151A	1.11 ± 0.18	1.25 ± 0.1	3.61 ± 0.38	1.29 ± 0.16	30 ± 7	-
H152A	1.47 ± 0.19	3.6 ± 0.42	3.66 ± 0.39	1.61 ± 0.2	80 ± 20	+++
N153A	2.43 ± 0.29	3.36 ± 0.38	2.75 ± 0.31	0.97 ± 0.12	36 ± 8	+
S155A	1.44 ± 0.19	3.56 ± 0.48	4.79 ± 0.52	1.56 ± 0.17	60 ± 20	++
K162A	1.45 ± 0.17	2.55 ± 0.36	2.64 ± 0.29	1.53 ± 0.16	70 ± 20	+++
S171A	1.55 ± 0.19	1.07 ± 0.09	2.34 ± 0.25	0.14 ± 0.02	4 ± 1	*
S172A	2.04 ± 0.22	1.63 ± 0.18	3.14 ± 0.34	1.43 ± 0.15	25 ± 5	-
$\Delta C$ (82-183)	1.9 ± 0.28	25.2 ± 3.9	4.8 ± 0.52	3.41 ± 0.41	600 ± 100	+++

<sup>a</sup> Hodnoty parametrů jsou průměry ± S.D. z analýzy dvou duplicitních nezávislých měření

<sup>b</sup> Rovnovážná disociační konstanta ( $K_D$ ) byla stanovena vztahem  $1/[(k_{a1}/k_{d1}) \times (1+k_{a2}/k_{d2})]$  za předpokladu dvoustavového vazebného modelu. Celková chyba byla spočítána z chyb ve stanovení rychlostních konstant.

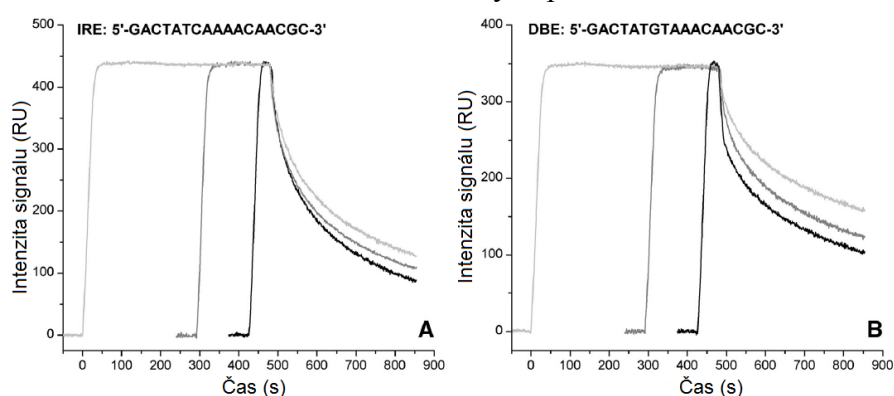
<sup>c</sup> Relativní zvýšení  $K_D$  vzhledem k WT: (-), < 2×; (+), 2-3×; (++) , 3-4×; (+++) , >4×.

<sup>d</sup> (\*) značí významný pokles  $K_D$  vzhledem k WT

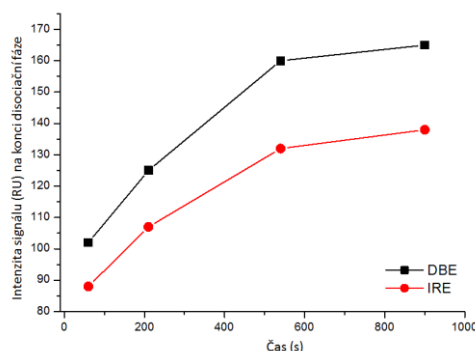
Výsledkem těchto měření a ukazatelem změn v kinetice vazby FOXO4-DBD a dsDNA vyvolané zrušením jedné konkrétní vazebné interakce je hodnota rovnovážné disociační konstanty  $K_D$ . Z tabulky 7 a 8 je patrné, že u většiny alaninových mutantů dochází ke změně této veličiny a tudíž lze soudit, že jednotlivé nescifické kontakty hrají podstatnou roli při interakci FOXO4-DBD s molekulou DNA. Dále byl stanoven kinetický model interakce FOXO4-DBD s DNA. Na základě lepšího parametru redukovaného  $\chi^2$  byl vyhodnocen dvou-stavový model jako model, který mnohem lépe popisuje průběh asociace a disociace komplexu FOXO4-DBD:dsDNA.

## 4.4.2 Sledování vlivu délky injekce analytu na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA

Součástí SPR experimentů bylo sledování vlivu délky injekce analytu na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA. Povrch čipu s navázanou dsDNA motivů IRE a DBE byl vystaven po různou dobu analytu FOXO4-DBD (WT) o vysoké koncentraci (300 nM). Ze senzogramů zarovnaných dle disociační fáze (Obr. 48) a z detailního pohledu na změnu intenzity signálu na konci disociační fáze (Obr. 49), lze vyčíst, že delší injekční čas (asociační fáze) měl přímý vliv na snížení míry disociace což ukazuje na zvýšení stability komplexu v čase. Průběh tohoto experimentu plně odpovídá empirickým pozorováním dvoustupňového modelu interakce dvou vazebných partnerů metodou SPR.



**Obr. 48** Efekt zvýšení injekčního času analytu (asociační fáze) na stabilitu komplexu. Překrytí senzogramů ukazuje efekt různých injekčních času analytu na disociaci komplexu FOXO4-DBD:DNA pro motivy dsDNA IRE (A) a DBE (B). Senzogramy jsou zarovnané podle disociační fáze pro názorné zobrazení efektu snížení míry disociace komplexu při vyšším injekčním čase (asociační fáze) analytu (FOXO4-DBD).



**Obr. 49** Detailní pohled na změnu intenzity signálu na konci disociační fáze při různé době nástřiku analytu. Zvyšující se síla signálu na konci asociační fáze pro interakci FOXO4 s motivy DNA DBE a IRE ukazuje na efekt zvýšení stability komplexu při vyšší době nástřiku analytu. Z obrázku je též patrné, že tento efekt je odlišný pro oba motivy DNA.

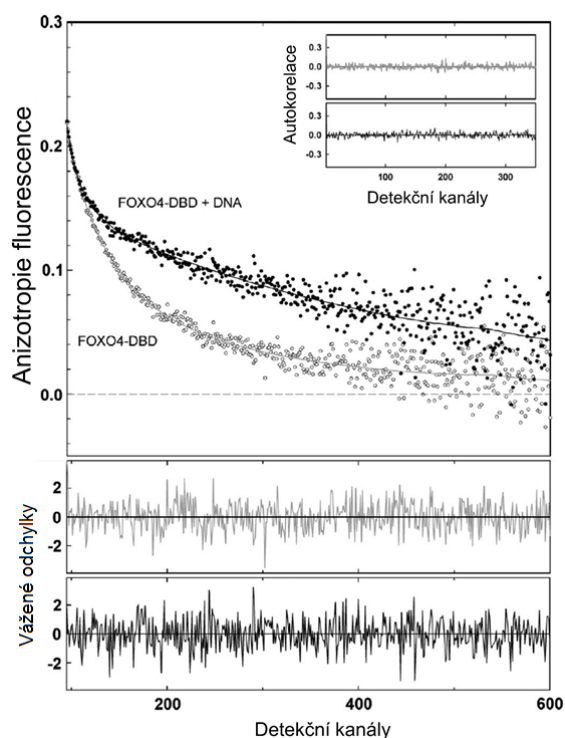
### 4.4.3 Studium konformačních změn FOXO4-DBD při vazbě na DNA

Pro podporu navrženého modelu, který popisuje vazbu FOXO4-DBD na DNA jako dvou-stavový proces zahrnující konformační změnu FOXO4-DBD byla provedena měření časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanů ve struktuře FOXO4-DBD. Pro tuto studii byl použit FOXO4-DBD WT, jelikož konstrukt FOXO4-DBD s jedním tryptofanem v rozpustné formě nebylo možné připravit. Měření byla provedena pro volný FOXO4-DBD a pro FOXO4-DBD v komplexu s DNA. Výsledky těchto měření jsou uvedena v následující tabulce 9 a na obrázcích 50 a 51.

**Tab. 9** Shrnutí měření časově rozlišené fluorescence tryptofanů FOXO4-DBD

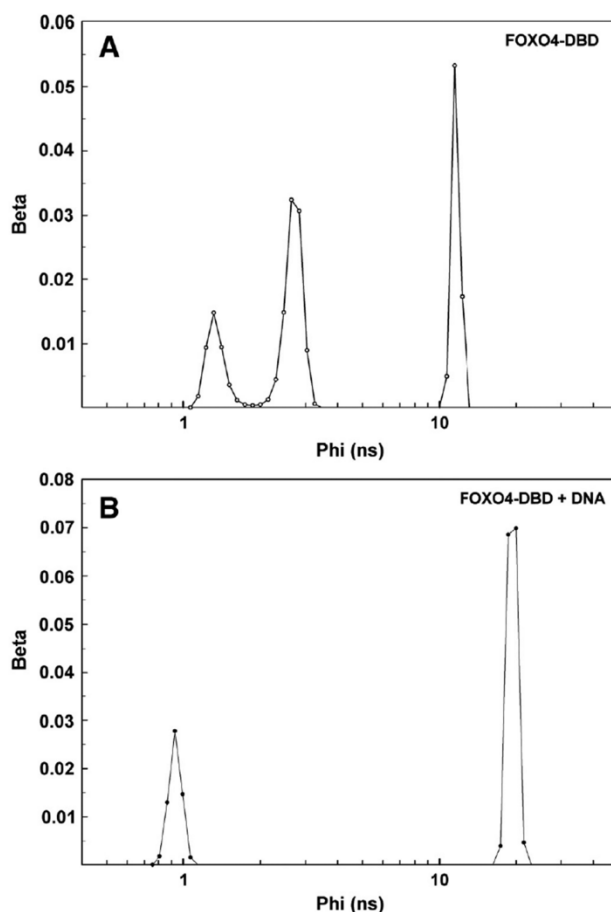
	$\bar{\tau}^*a$ (ns)	$\beta_1^*b$	$\phi_1^*c$	$\beta_2^*b$	$\phi_2^*c$	$\beta_3^*b$	$\phi_3^*c$
FOXO4-DBD	4.19	0.041	1.3	0.094	2.7	0.076	12
FOXO4-DBD + DNA	3.85	0.059	0.9	–	–	0.147	19

\*Hodnoty SD pro a,b a c byly SD<0,05 ns, SD<0,01 ns a SD<20%



**Obr. 50** Záznam časově-rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence volného FOXO4-DBD a FOXO4-DBD v komplexu s DNA. Záznam detekce anizotropie tryptofanové fluorescence volného FOXO4-DBD (prázdné tečky) a FOXO4-DBD v komplexu s DNA (plné tečky) na jednotlivých detekčních kanálech, společně se záznamy autokorelace a vážených odchylek, demonstrujícími kvalitu proložení zaznamenaných dat (šedivá pro volný FOXO4-DBD, černá pro FOXO4-DBD v komplexu s DNA).





**Obr. 51** Distribuce rotačních korelačních časů volného FOXO4-DBD a FOXO4-DBD v komplexu s DNA. (A) Distribuce rotačních korelačních časů volného FOXO4-DBD (B) Distribuce rotačních korelačních časů FOXO4-DBD v komplexu s DNA

Výrazná změna v hodnotě součtu amplitud odpovídajících rychlým pohybům  $\beta_1 + \beta_2$  a absence rotačně korelačního času  $\phi_2$  reprezentujícího segmentální pohyby molekuly proteinu při vazbě na DNA souhrnně ukazují na významné snížení pohyblivosti studovaných segmentů a tudíž na změny ve struktuře molekuly. Tyto výsledky tedy plně potvrzují vazebný model zahrnující konformační změnu FOXO4-DBD při vazbě na DNA.

## 5 Diskuse

### 5.1 Studium molekulárního mechanismu interakcí FOXO4-DBD s proteinem 14-3-3 $\zeta$

Proteiny 14-3-3 jsou skupinou vysoce konzervovaných dimerních proteinů, jenž se nachází ve všech eukaryotických organismech (Fu H et al., 2000; Aitken A, 2006). K dnešnímu dni bylo popsáno několik stovek rozličných proteinů, které interagují s proteiny 14-3-3. Mezi tyto proteiny patří proteiny účastníci se kontroly buněčného cyklu, kontroly metabolismu, řízení programované buněčné smrti - apoptózy nebo třeba proteiny účastníci se kontroly transkripce genů (Mackintosh C, 2004; Milne F et al., 2002). Ačkoliv interakce mezi proteiny 14-3-3 a jejich vazebnými partnery je obvykle kontrolována skrze fosforylaci vazebného partnera (Muslin A et al., 1996; Yaffe MB et al., 1997; Rittinger K et al., 1999), byla též popsána řada vazebných motivů proteinů 14-3-3, u kterých pro aktivaci interakce není fosforylace vyžadována (2000; Aitken A, 2006). Proteiny 14-3-3 se dají též charakterizovat jako proteiny modulující strukturu svých vazebných partnerů (molekulární "scaffold" proteiny), k čemuž jsou schopny využít několik různých molekulárních mechanismů (Fu H et al., 2000; Bridges et al., 2004). Role proteinů 14-3-3 při regulaci forkhead transkripčních faktorů FOXO se děje ve dvou stupních. Za prvé, vazba proteinu 14-3-3 na protein FOXO inhibuje interakci mezi FOXO a molekulou jaderné DNA (Cahill CM et al., 2001; Obsil T et al., 2003). A za druhé, proteiny 14-3-3 zabraňují transportu FOXO zpět do jádra zakrytím jejich jaderné lokalizační sekvence (NLS) (Renault VM et al., 2009; Brownawell AM et al., 2001; Rena G et al., 2001). Přesné molekulární mechanismy těchto procesů jsou stále nejasné, hlavně pro nedostatečné množství strukturních dat. V této práci byly ke studiu interakce protein-protein a interakce protein-DNA použity různé techniky fluorescenční spektroskopie a metoda rezonance povrchového plazmonu. Snažili jsme se o potvrzení několika hypotéz stanovených na základě předchozích znalostí této problematiky týkajících se mechanismu inhibice DNA vazebných vlastností transkripčního faktoru FOXO skrze interakci s regulačním proteinem 14-3-3. FOXO transkripční faktory obsahují ve své struktuře dvě vazebná místa pro protein 14-3-3 a obě tato vazebná místa jsou dle předchozích studií nutná pro optimální navázání na protein 14-3-3 (Brunet A et al., 1999; Zhao X et al., 2004; Obsil T et al., 2008). Tyto dva vazebné motivy ohraničují v pohledu na primární strukturu FOXO jeho DNA vazebnou doménu (DBD), čímž naznačují možnost, že by jedním z možných mechanismů bylo sterické stínění DBD proteinu FOXO robustní a rigidní strukturou proteinu 14-3-3. Měření časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ukázalo, že navázání proteinu 14-3-3 ovlivňuje fluorescenční vlastnosti sondy AEDANS místně specificky navázané na čtyřech různých místech ve struktuře

FOXO4-DBD, které reprezentují důležité oblasti DNA vazebného rozhraní (Obr. 39 a 40, Tab. 2). Z těchto pozorování je patrné, že změny ve fluorescenčních vlastnostech sondy AEDANS jsou způsobeny sterickým stíněním fluoroforu po navázání proteinu 14-3-3 $\zeta$ , což ukazuje na přítomnost fyzického kontaktu mezi proteinem 14-3-3 $\zeta$  a označenými studovanými oblastmi FOXO4-DBD. Tato pozorování jsou dále konzistentní s výsledky měření časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence, které ukazují omezení pohybu sondy AEDANS ve studovaných oblastech FOXO4-DBD při vazbě dpFOXO4 (fosforylovaný FOXO4) a proteinu 14-3-3 (Obr. 41 - 43 a Tab. 3). Další výsledky, tentokrát z pozorování časově rozlišené fluorescence tryptofanů ve struktuře FOXO4-DBD, ukazují na to, že při vazbě proteinu 14-3-3 $\zeta$  nedochází k výraznějším konformačním změnám uvnitř DNA-vazebné domény (přesněji v centrální oblasti domény, kde se tyto aminokyselinové zbytky nacházejí) (Obr. 44 a Tab. 4). Z toho lze usuzovat, že vazba proteinu 14-3-3 „blokuje“ oblast DNA-vazebné domény, aniž by výrazně ovlivnila strukturu tohoto proteinu.

Pro získání realistického strukturního modelu komplexu FOXO4:14-3-3 a lepšího zmapování interakcí mezi těmito proteiny bylo pomocí metody FRET stanoveno šest intermolekulárních vzdáleností v komplexu FOXO4-DBD:14-3-3 $\zeta$  (Tab. 5), a sice vždy mezi místně specificky navázanou sondou AEDANS ve struktuře FOXO4-DBD a obdobně fluoresceinem označeným 14-3-3 $\zeta$ . Model komplexu pFOXO4:14-3-3 $\zeta$  (Obr. 46) vytvořený s použitím těchto dat ukazuje, že FOXO4-DBD je zakotvena v centrálním kanálu dimerního proteinu 14-3-3 $\zeta$  stejným způsobem jak bylo ukázáno v předchozích studiích komplexu 14-3-3 $\zeta$  se serotonin N-acetyltransferasou (Obsil T et al., 2001). Tato pozice umožňuje plně efektivní zakrytí celého DNA vazebného rozhraní FOXO4 což je plně v souladu s výsledky našich fluorescenčních měření. Dalším aspektem vazby, který je plně v souladu jak s našimi výsledky, tak s výsledky publikovanými dříve (Obsilova V et al., 2005) je mobilita DNA vazebné domény FOXO4 při vazbě se 14-3-3 $\zeta$ , která podle všeho zůstává téměř nezměněná. Rotační korelační čas s hodnotou v rozmezí 3 až 8 ns odráží pohyblivost domény v konstruktu FOXO4<sub>11-213</sub> (Tab. 3,  $\phi_2$  za absence 14-3-3 $\zeta$  a  $\phi_3$  za přítomnosti 14-3-3 $\zeta$ ).

Vezmeme-li v potaz všechna získaná data, lze předpokládat, že protein 14-3-3 $\zeta$  fyzicky interaguje s DNA vazebným rozhraním fosforylovaného proteinu FOXO4. DNA vazebná doména FOXO4 je při tom kontaktu zakotvena v centrálním vazebném kanálu dimerního 14-3-3. Ovšem v rámci komplexu zůstává relativně volně pohyblivá. Pozorování tryptofanové fluorescence dále ukázalo, že nedochází k žádným zásadním konformačním změnám uvnitř FOXO4-DBD během vazby na 14-3-3. Lze tedy tvrdit, že protein 14-3-3 $\zeta$  působí jako „molekulární štít“, který zakrývá DNA vazebné rozhraní FOXO4 a tím inhibuje jeho interakci s cílovou DNA.

## 5.2 Studium kinetiky interakce FOXO4-DBD s DNA

Dalším cílem této práce byla detailní charakterizace interakce FOXO4-DBD s cílovou dsDNA. Pomocí metody SPR byla testována důležitost jednotlivých aminokyselinových zbytků v oblasti DNA vazebného rozhraní FOXO4. Tato problematika již byla studována několika vědeckými skupinami, nicméně jejich zájem byl zaměřen pouze na aminokyselinové zbytky, které tvoří báze-specifické kontakty, nebo slouží jako cílová místa posttranslačních modifikací (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2007; Matsuzaki H et al., 2005). Žádná z těchto skupin zatím neprovedla detailní kinetickou analýzu. Stejně tak nebylo doposud publikována studie, které by objasnila roli jednotlivých nespecifických kontaktů v oblasti FOXO-DBD na vazebnou afinitu a specifitu vazby FOXO-DBD na DNA.

FOXO-DBD interaguje s molekulou DNA díky kombinaci přímých kontaktů a molekulou vody zprostředkovaných kontaktů s postranními řetězci bází DNA (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2010). Pro stanovení individuální důležitosti těchto kontaktů na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA byly individuální aminokyselinové zbytky účastníci se těchto interakcí (Boura E et al., 2010) nahrazeny aminokyselinou alanin (kromě Tyr102, který byl nahrazen fenylalaninem). S těmito konstrukty byla provedena měření kinetiky v reálném čase s použitím metody SPR. Seznam studovaných mutantů společně s elementem sekundární struktury účastnícím se vazebné interakce a s typem vazebné interakce mezi postranním řetězcem studovaného aminokyselinového zbytku a bází DNA je uveden v tabulce 6.

Hodnoty kinetických parametrů (tabulky 7 a 8) ukazují, že FOXO4-DBD WT váže oba typy dsDNA s  $K_D$  v nanomolárním rozpětí s vazebnou afinitou pro dsDNA s motivem DBE asi čtyřikrát vyšší než pro dsDNA s motivem IRE, což je zcela v souladu s dříve publikovanými daty (Furuyama T et al., 2000; Brent MM et al., 2008). Celkové srovnání hodnot  $K_D$  ukazuje výrazný pokles vazebné afinity (zvýšení  $K_D$ ) pro několik mutantů FOXO4-DBD s mutacemi v různých částech DBD. V případě vazby na dsDNA s motivem IRE, byl největší pokles vazebné afinity zaznamenán pro mutanty Y102F, N148A a  $\Delta C$ , zatímco při vazbě na dsDNA s motivem DBE došlo k největšímu poklesu u mutantů S101A, Y102F, N148A, H152A, K162A a  $\Delta C$ . Převládající mechanismus, který vede ke snížení vazebné afinity těchto mutantů je rychlejší disociace komplexu, než je tomu u FOXO4-DBD WT. Tento proces je popsán disociační rychlostní konstantou  $k_{d1}$ . V případě interakce mutantů S142A a K162A s motivem IRE a v případě interakce mutantů S42A a S141A s motivem DBE byl pozorován opačný efekt, tedy zvýšení vazebné afinity FOXO4-DBD vzhledem k dsDNA. Z analýzy výsledků se zdá, že tento efekt je způsoben zpomalením rychlosti reverzních konformačních změn. Tento proces je popsán disociační rychlostní konstantou  $k_{d2}$ . Analýza dat též ukazuje, že dvou-stavový

model (rovnice 15) je zcela v souladu se strukturními daty FOXO proteinů a lépe popisuje průběh interakce, než jednoduchý jedno-stavový model. Při porovnání struktur FOXO-DBD bez navázané DNA a s navázanou DNA lze pozorovat významné rozdíly v několika oblastech a to zejména v oblasti N-koncového segmentu, v oblasti smyčky mezi helixy H2 a H3 a v oblasti „křídel“ W1 a W2 (pro orientaci ve struktuře FOXO4 viz Obr. 6 či 52) (Tsai KL et al., 2007; Boura E et al., 2010; Weigelt J et al., 2001; Wang F et al., 2008). Dle předchozích studií, které naše výsledky potvrzují, dochází k největším konformačním změnám v oblasti smyčky s helixy H2 a H3, která přejímá helikální strukturu v nepřítomnosti DNA, zatímco v přítomnosti DNA je tato oblast víceméně nestrukturovaná. Další poznatky ukazují, že ve všech FOXO-DBD:DNA komplexech je molekula DNA ohnuta směrem k FOXO-DBD, čímž se velký žlábek v oblasti vazebného motivu DNA lehce otevírá (Tsai KL et al., 2007; Boura E et al., 2010). Tudiž lze konstatovat, že konformační změny se dějí jak v molekule FOXO-DBD, tak v molekule cílové DNA. Analýza získaných dat dále ukázala, že pro různé mutanty pozorujeme různou změnu vazebné afinity FOXO-DBD vzhledem k motivům DBE a IRE. Rovněž ukázala, že nesespecifické fosfátové kontakty s páteří DNA mají různou důležitost při vazbě FOXO4-DBD a dsDNA. Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány pro mutanty S155A a K162A, které shodně vykazují značné snížení afinity vzhledem k motivu DBE a naopak žádnou změnu v afinitě vzhledem k motivu IRE.

### **5.3 Studium konformačních změn FOXO4-DBD při vazbě na DNA**

Výše z miněné experimenty poukázaly na přítomnost konformačních změn při interakci FOXO-DBD s DNA. Tyto konformační změny jsme se rozhodli potvrdit měřením časově rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence FOXO-DBD při interakci s DNA. Výsledky těchto měření jsou prezentovány v tabulce 9 a obrázky 50 a 51. Analýza rotačně korelačních časů, kde kratší korelační časy představují rychlé lokální pohyby Trp zbytků, zatímco delší rotačně korelační časy reflektují celkový rotační pohyb celého komplexu, ukázala výrazné snížení amplitudy ve třídě kratších korelačních časů ( $\beta_{\text{short}}$ ) při vazbě obou partnerů. Amplituda  $\beta_2$  byla v případě vytvoření komplexu redukována na nulu. Pozorování těchto změn lze interpretovat jako výrazné snížení segmentálních pohybů v pozorovaných oblastech a tedy jako změnu konformace. Tento efekt je zjevný také z grafu na obrázku 50, kde při porovnání hrubých dat dohasínání anizotropie fluorescence pozorujeme efekt pomalejšího dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence. Strukturní změnu FOXO-DBD během vazby na DNA podporují také dostupné struktury komplexů FOXO-DBD, kde při podrobném porovnání volných a vázaných forem FOXO-DBD můžeme pozorovat výrazné rozdíly v

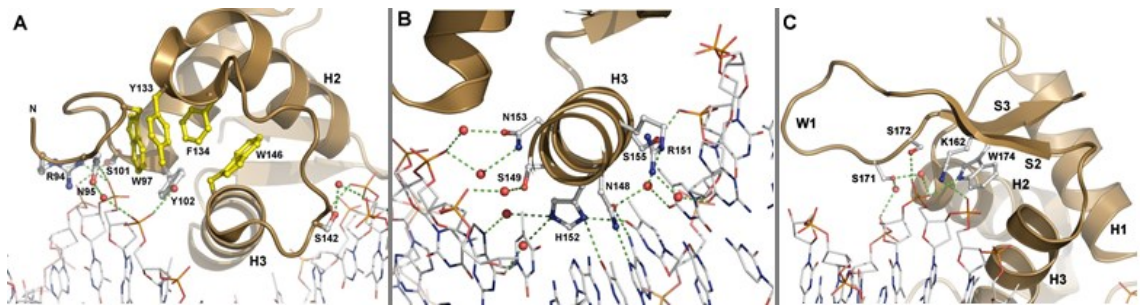
několika oblastech a to sice v N-terminálním regionu, smyčce mezi helixy H2 a H3 a v oblasti "křídel" W1 a W2.

## 5.4 Detailní analýza DNA vazebného rozhraní FOXO4-DBD

Tato podkapitola, která vychází z výsledků experimentů se souborem alaninových mutantů z oblasti DNA vazebného rozhraní FOXO4-DBD, je věnována detailnímu rozboru změn v této oblasti proteinu FOXO4 při kontaktu s DNA. Pomocí metody SPR byla studována vazba mutantů FOXO4-DBD na dva různé motivy DNA (DBE, IRE). Tyto experimenty umožnily objasnění významu jednotlivých nekovalentních interakcí pro stabilitu komplexu FOXO4-DBD s DNA.

### N-terminální část FOXO4-DBD

Pět aminokyselinových zbytků z N-terminální části FOXO4-DBD (až po helix H3) tvoří s molekulou DNA buď vazby přímé, nebo vazby přes molekulu vody. Jsou to aminokyselinové zbytky Arg95, Asn95, Ser101, Tyr102 a Ser142 (Tab. 6 nebo Obr. 5). Nejvýznamnější pokles DNA vazebné afinity při zmíněných experimentech pro motiv IRE byl zaznamenán u konstruktu FOXO4-DBD Y102F (Tab. 7). Pro motiv DBE byl nejvyšší pokles zaznamenán pro konstrukty S101A a Y102F (Tab. 8). Tato pozorování naznačují, že nespecifické vodíkové vazby postranních řetězců těchto aminokyselinových zbytků a fosfátových skupin bází, které se nacházejí na hranicích vazebného motivu, což je mimo jiné místo, kde se vazebné motivy DBE a IRE liší, jsou důležité pro celkovou stabilitu komplexu FOXO4-DBD:dsDNA. Mutace aminokyselinového zbytku Tyr102 na fenylalanin, která ruší jednu vodíkovou vazbu (respektive jeden nespecifický kontakt s fosfátovou kostrou DNA) tím, že je odstraněna fenolová hydroxylová skupina Tyr102, má za následek jednu z největších změn disociační konstanty ( $K_D$ ) mezi studovanými mutanty. Strukturální studie ukazují, že aminokyselinový zbytek Tyr102 je součástí klastru hydrofobních aminokyselinových zbytků složeného z Trp97 N-terminální smyčky, Tyr102 v helixu H1, Tyr133 a Phe134 ve smyčce mezi helixy H2 a H3 a Trp146 z N-terminální části helixu H3 (Obr. 52).



**Obr. 52 Vazebné rozhraní komplexu FOXO4-DBD:DNA** (A) Interakce mezi N-terminálním segmentem a DNA. Klastř hydrofobních aminokyselinových zbytků obklopujících aminokyselinový zbytek Trp102 je vyznačeno žlutě. (B) Interakce mezi rozpoznávacím helixem H3 a klíčovou rozpoznávací sekvencí. (C) Interakce mezi flexibilní oblastí, křídlem W1, a DNA. Molekuly vody jsou vyznačeny jako červené koule. Polární kontakty mezi FOXO4-DBD a DNA jsou vyznačeny jako zelené čáry.

Již dříve bylo zjištěno, že studované aminokyselinové zbytky obou zmiňovaných částí FOXO4-DBD, tedy N-terminální hranice helixu H3 a smyčky mezi helixy H2 a H3 ovlivňují DNA vazebné vlastnosti různých FOX proteinů pravděpodobně skrze změnu pozice rozpoznávacího helixu H3 (Pierrou S et al., 1994; Overdier DG et al., 1994; Marsden I et al., 1997; Marsden I et al., 1998). Vzhledem k těmto zjištěním lze spekulovat, zda kontakty mezi N-terminální oblastí FOXO-DBD a DNA, zahrnující kontakty aminokyselinových zbytků Asn95, Ser101 a Trp102, nehrají klíčovou roli v procesech orientace helixu H3 do velkého žlábků DNA. Pro úplnost dodejme, že v porovnání s ostatními skupinami FOX proteinů, všechny FOXO proteiny obsahují ve smyčce mezi helixy H2 a H3 navíc skupinu pěti aminokyselin (sekvence KGDSN) neznámé funkce. Krystalografické studie FOXO proteinů ukázaly, že v této oblasti nedochází k žádným (platí pro FOXO1 a FOXO3), nebo pouze k ojedinělým (FOXO4) kontaktům s molekulou DNA (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2010). Obrázek 52A znázorňující interakce pozorované ve struktuře komplexu FOXO4-DBD:dsDNA zobrazuje mimo jiné aminokyselinový zbytek Ser142, jenž tvoří několik nespécifických kontaktů s fosfátovými skupinami DNA. Jak je zřejmé z dat v tabulkách 7 a 8 mutace právě tohoto aminokyselinového zbytku značně ovlivňuje vazebnou afinitu. To naznačuje, že tento region by mohl hrát určitou roli v modulaci vazby proteinů FOXO na DNA.

### Helix H3, hlavní element v rozpoznávání DNA

Krystalové struktury FOXO-DBD:DNA ukazují, že vysoce konzervovaná sekvence helixu H3 tvoří rozsáhlé kontakty s bázemi klíčové rozpoznávací sekvence jak skrze přímé a vodíkové vazby přes molekulu vody, tak pomocí van der Waalových interakcí

(Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2010). Všechny přímé báze-specifické vazby jsou tvořeny aminokyselinovými zbytky Asn148 a His152 (Obr. 5 nebo 52B), a proto nepřekvapí, že mutace obou těchto aminokyselinových zbytků významně snižuje vazebnou afinitu FOXO4-DBD vzhledem k oběma vazebným motivům. Vzhledem k motivu DBE je potom snížení afinity (zvýšení  $K_D$ ) mnohem výraznější než pro motiv IRE (Tab 7 a 8). Rozdíly v relativní změně afinity vzhledem k motivům DBE i IRE byly pozorovány též pro mutace aminokyselinového zbytku Ser155, který za normální situace tvoří nespecifické kontakty s fosfátovou skupinou páteře DNA. Oproti těmto změnám, pozorovaným pro výše diskutované aminokyselinové zbytky, byla pozorována velmi malá, či žádná změna v hodnotě  $K_D$  pro další mutanty v oblasti helixu H3, a sice pro aminokyselinové zbytky Ser149, Arg151 a Asn153 a to jak pro motiv DBE, tak pro motiv IRE. Tyto tři aminokyselinové zbytky se účastní specifických kontaktů přes molekulu vody (Arg151) nebo nespecifické vazby s fosfátovou skupinou páteře DNA (Ser149 a Asn153). Vzhledem k výsledkům měření lze tvrdit, že tyto vazby nejsou těmi nejdůležitějšími pro specifitu vazby ani pro stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA.

### **Oblast ohybů (křídel) W1 a W**

Dalšími diskutovanými částmi DNA vazebného rozhraní FOXO4-DBD je oblast flexibilních smyček zvaných křídlo W1 a křídlo W2. Tato oblast je situována mezi strukturami S2 a S3 (Obr. 4). Již dříve bylo potvrzeno, že oblast křídla W1, která se velmi liší délkou i složením primární struktury napříč celou skupinou FOX proteinů, hraje podstatnou roli při rozpoznávání DNA vazebného motivu a při zprostředkování vazby s DNA a velmi ovlivňuje i stabilitu komplexů různých FOX-DBD s DNA (Tsai KL et al., 2007). V komplexech FOXO-DBD:DNA, tvoří čtyři různé aminokyselinové zbytky z této oblasti přímé nebo nespecifické kontakty s fosfátovou skupinou páteře DNA. Jsou to aminokyselinové zbytky Lys162, Ser171, Ser172 a Trp174 (Obr. 52C). K zajímavé situaci dochází u mutantů aminokyseliny Lys162 a Ser171. Mutant K162A, vykazuje určité snížení hodnoty  $K_D$  pro motiv IRE (Tab. 7) (z 60 nM na 30 nM) a naopak značné zvýšení této hodnoty pro motiv DBE (Tab. 8). Kinetická analýza těchto pozorování naznačuje, že v případě vazby s motivem IRE mutace K162A snižuje hodnotu rychlostní konstanty pro reverzní konformační změny ( $k_{d2}$ ), zatímco při vazbě s motivem DBE dochází ke zvýšení hodnoty rychlostní konstanty pro vznik komplexu ( $k_{d1}$ ). Opačný efekt můžeme pozorovat pro mutaci aminokyseliny Ser171. Mutace S171A, nemá v podstatě žádný efekt na změnu vazebné afinity, vzhledem k motivu IRE, ovšem při interakci s motivem DBE, dochází k významnému snížení hodnoty  $K_D$  díky snížení hodnoty rychlostní konstanty  $k_{d2}$ . Mutace S172A nemá v podstatě žádný efekt na vazbu FOXO4-DBD ani u jednoho z vazebných motivů. Pro další aminokyselinový zbytek, Trp174,



nebylo možné provést měření, jelikož změna Trp174 na fenylalanin způsobovala agregaci připraveného konstruktů.

Vysoce flexibilní oblast křídla W2 se nachází v C-terminální části FOXO-DBD a hraje významnou roli ve vzájemné interakci FOXO-DBD a DNA. Tato oblast obsahuje několik míst, která jsou cílem postranslačních modifikací a jejichž modifikace či mutace způsobuje, snížení vazebné afinity proteinu FOXO vzhledem DNA (Tsai KL et al., 2007; Brent MM et al., 2008; Boura E et al., 2007; Matsuzaki H et al., 2005). Ve struktuře komplexu FOXO3-DBD:DNA zaujímá křídlo W2 strukturovanou konformaci a jeho základní aminokyselinové zbytky tvoří elektrostatické interakce s fosfátovými skupinami velkého žlábků DNA bez zjevné báze specifity (Tsai KL et al., 2007). V krystalové struktuře komplexu FOXO3:DNA vykazuje většina těchto aminokyselinových zbytků vysoký B-faktor značící značnou flexibilitu této oblasti. Ve všech třech publikovaných strukturách komplexů FOXO1-DBD:DNA je křídlo W2 kompletně neuspořádané a proto nemohla být jeho interakce s DNA objasněna (Brent MM et al., 2008). Ovšem vazebné experimenty, kdy byla tato oblast kompletně odstraněna, naznačily snížení DNA vazebné afinity. Struktura komplexu FOXO4-DBD:DNA sice tuto oblast neobsahuje, protože pro získání dobře difraktujících krystalů musela být C-terminální část odstraněna (Boura E et al., 2010) ovšem experimenty SPR s konstruktem FOXO4-DBD s odstraněným C-terminálním regionem (konstrukt  $\Delta C$ , sekvence 82-183) ukazují dramatické snížení DNA vazebné afinity pro oba vazebné motivy (Tab 7 a 8). V obou případech vykazuje zkrácený protein v porovnání s FOXO4-DBD WT velmi zvýšenou rychlost disociace komplexu (popsaný konstantou  $k_{d2}$ ), což potvrzuje, že oblast křídla W2 je velmi důležitá pro stabilitu komplexů FOXO-DBD:DNA.

## 6 Závěr

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Pomocí metod fluorescenční spektroskopie bylo zjištěno, že protein 14-3-3 interaguje s několika oblastmi DNA vazebného povrchu proteinu FOXO4. Konkrétně se jednalo o oblasti helixů H2 a H3, N-terminálního segmentu a ohybů W1 a W2. Dále bylo zjištěno, že tvorba komplexu neindukuje strukturální změnu uvnitř DNA vazebné domény.
- 2) Metodou FRET bylo získáno 6 intermolekulárních vzdáleností v komplexu FOXO4:14-3-3. Tyto vzdálenosti byly použity k návrhu strukturálního modelu komplexu FOXO4:14-3-3. Tento model potvrdil, že protein 14-3-3 blokuje podstatnou část DNA vazebného povrchu proteinu FOXO4.
- 3) Pomocí bodové mutagenese byla připravena série alaninových mutantů FOXO4-DBD a metodou rezonance povrchového plazmonu byla provedena detailní analýza interakce DNA-vazebné domény FOXO4 s DNA. Tato analýza ukázala důležitost jednotlivých nekovalentních interakcí pro vazbu FOXO4-DBD na DNA a také pomohla stanovit kinetický model této interakce zahrnující konformační změnu FOXO4-DBD.
- 4) Na základě dat získaných sledováním časově-rozlišené tryptofanové fluorescence FOXO4-DBD při vazbě na DNA jsme dokázali charakterizovat strukturální změny DNA-vazebné domény FOXO4, které doprovázejí tuto interakci.

## 7 Seznam citované literatury

- Aitken A. *Semin Cancer Biol* 2006 Jun 16(3):162-72
- Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC. *Genomics* 1998 Jan 47(2):187-99
- Aprelikova O, Pace AJ, Fang B, Koller BH, Liu ET. *J Biol Chem* 2001 Jul 276(28):25647-50
- Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y, Fukamizu A. *Cell Signal* 2007 Mar 19(3):519-27
- Bhaskar PT, Hay N. *Dev Cell* 2007 Apr 12(4):487-502
- Bhat TN, Bentley G A, Boulot G, Greene MI, Tello D, Dall'Acqua W, Souchon H, Schwarz FP, Mariuzza RA, Poljak RJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 Feb 91,1089–1093
- Biggs WH, Cavenee WK, Arden KC Mamm. *Genome* 2001 Jun 12,416–425
- Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F. *Oncogene* 1997 Jan 14(2):195-202
- Boura E, Rezabkova L, Brynda J, Obsilova V, Obsil T. *J Biol Chem* 2007 Mar 282(11):8265-75
- Boura E, Silhan J, Herman P, Vecer J, Sulc M, Teisinger J, Obsilova V, Obsil T. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010 Dec 66(Pt 12):1351-7
- Brent MM, Anand R, Marmorstein R. *Structure* 2008 Sep 16,1407–1416
- Bridges D, Moorhead GB. *Sci STKE* 2004 Jul 2004(242):re10
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering B. *Mol Cell Biol* 2001 May 21(10):3534-46
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. *Cell* 1999 Mar 96(6):857-68
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB. *J Cell Biol* 2002 Mar 156(5):817-28
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. *Science* 2004 Mar 303(5666):2011-5
- Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G, Alexander-Bridges M. *J Biol Chem* 2001 Apr 276(16):13402-10
- Calnan DR, Brunet A. *Oncogene* 2008 Apr 27(16):2276-88
- Clark C. *Atlanta GA (SPX)* 2011 Sep 19 2011
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. *Nature* 1993 Jul 364(6436):412-20
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. *Science* 1984 Feb 223(4637):701-3

- Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. *Cancer Res* 1994 Jun 54:2869–2872
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. *Genes Dev* 2008 Jan 15;22(2):239-51
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000 40:617–647
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. *Biochem J* 2000 Jul 15;349(Pt 2):629-34
- Gajiwala KS, Chen H, Cornille F, Roques BP, Reith W, Mach B, Burley SK. *Nature* 2000 Feb 24;403(6772):916-21
- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher 3rd FJ, Emanuel BS et al. *Nat Genet* 1993 Nov 5:230–235
- Gardino AK, Smerdon SJ, Yaffe MB Semin. *Cancer Biol* 2006 Jun 16(3):173-82
- Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. *Mol Cell* 2005 Dec 20(6):963-9
- Gibson RP, Gloster TM, Roberts S, Warren RA, Storch de Gracia I, García A, Chiara JL, Davies GJ. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007 May 46(22):4115-9
- Guertin DA, Sabatini DM. *Cancer Cell* 2007 Jul 12(1):9-22
- Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T. *J Biol Chem* 1999 Jun 274(24):17184-92
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. *Mol Cell* 2008 Apr 30(2):214-26
- Henriksson ML, Francis MS, Peden A, Aili M, Stefansson K, Palmer R, Aitken A, Hallberg B. *Eur J Biochem* 2002 Oct 269(20):4921-9
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. *Mol Cell* 1997 Dec 1(1):3-11
- Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. *Blood* 1997 Nov 90(9):3714-9
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Nature* 1999 Oct 401(6753):616-20
- Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metalnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, et al. *Curr Biol* 2004 Aug 14:1436–1450
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. *Genes Dev* 2000 Jan 14:142–146
- Kopp M, Müller H, Holzer H. *J Biol Chem* 1993 Mar 268(7):4766-74
- Kopp M, Nwaka S, Holzer H. *Gene* 1994 Dec 150(2):403-4
- Krauss G, Riesner D, Maass G. *J Biochem* 1976 Sep 68(1):81-93
- Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. *J Biol Chem* 2000 Jul 28;275(30):23106-12
- Li Y, Inoki K, Vaccratsis P, Guan KL. *J Biol Chem* 2003 Apr 278(16):13663-71
- Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. *Science* 1997 Nov 278:1319–1322
- Lipschultz CA, Li Y, Smith-Gill S. *Methods* 2000 Mar 20(3):310-8

- Liu PP, Chen YC, Li C, Hsieh YH, Chen SW, Chen SH et al. *Proteins* 2002 Dec 49:543–553
- Lodygin D, Hermeking H Semin. *Cancer Biol* 2006 Jun 16(3):214-24
- Lucast LJ, Batey RT, Doudna, JA. *Biotechniques* 2001 Jul 30:544-550
- Mackintosh C. *Biochem J* 2004 Jul 381:329–342
- Marsden I, Chen Y, Jin C, Liao X. *Biochemistry* 1997 Oct 36(43):13248-55
- Marsden I, Jin C, Liao X. *J Mol Biol* 1998 May 278:293–299
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Aug 102(32):11278-83
- Mazet F, Yu JK, Liberles DA, Holland LZ, Shimeld SM. *Gene* 2003 Oct 316:79–89
- Milne FC, Moorhead G, Pozuelo Rubio M, Wong B, Kulma A, Harthill JE, Villadsen D, Cotelle V, MacKintosh C. *Biochem Soc Trans* 2002 Aug 30(4):379-81
- Moore BW, Perez VJ, Carlson FD. *The Marine Biological Laboratory* 1967 pp343–359
- Morrison DK. *Trends Cell Biol* 2009 Jan 19(1):16-23
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. *Cell* 1996 Mar 84(6):889-97
- Nwaka S, Holzer H. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998 58:197-237
- Obsil T, Ghirlando R, Anderson DE, Hickman AB, Dyda F. *Cell* 2001 Apr 105(2):257-67
- Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F. *Biochemistry* 2003 Dec 42(51):15264-72
- Obsil T, Obsilova V. *Oncogene* 2008 Apr 27(16):2263-75
- Obsil T, Obsilova V. *Biochim Biophys Acta* 2011 Nov 1813(11):1946-53
- Obsilova V, Vecer J, Herman P, Pabianova A, Sulc M, Teisinger J, Boura E, Obsil T. *Biochemistry* 2005 Aug 44(34):11608-17
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. *Nature* 1997 Oct 389(6654):994-9
- Ortiz CH, Maia JC, Tenan MN, Braz-Padrao GR, Mattoon JR, Panek AD. *J Bacteriol* 1983 Feb 153(2):644-51
- Overdier DG, PorCella A, Costa RH. *Cell Biol* 1994 Apr 14(4):2755-66
- Panni S, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Cesareni G, Castagnoli L. *FEMS Yeast Res* 2008 Feb 8(1):53-63
- Parry P, Wei Y, Evans G Genes Chromosomes. *Cancer* 1994 Oct 11(2):79-84
- Petosa C, Masters SC, Bankston LA, Pohl J, Wang B, Fu H, Liddington RC. *J Biol Chem* 1998 Jun 273(26):16305-10
- Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerbäck S, Carlsson P. *EMBO J* 1994 Oct 13(20):5002-12
- Porter GW, Khuri FR, Fu H. *Semin Cancer Biol* 2006 Jun 16(3):193-202

Reece JB. *Campbell BIOLOGY Publication* 2010 Oct ISBN-10: 0321558146|ISBN-13:978-0321558145|Edition: 9

Reiling JH, Sabatini DM. *Oncogene* 2006 Oct 25(48):6373-83

Rena G, Prescott AR, Guo S, Cohen P, Unterman TG. *Biochem J* 2001 Mar 354(Pt 3):605-12

Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A. *Cell Stem Cell* 2009 Nov 5(5):527-39

Rittinger K, Budman J, Xu J, Volinia S, Cantley LC, Smerdon SJ, Gambelin SJ, Yaffe MB. *Cell* 1999 Aug 4(2):153-66

Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. *Mol Cell Biol* 2006 Mar 26(6):2262-72

Shiyanova T, Liao X. *Arch Biochem Biophys* 1999 Feb 362(2):356-62

Silhan J, Vacha P, Strnadova P, Vecer J, Herman P, Sulc M, Teisinger J, Obsilova V, Obsil T. *J Biol Chem* 2009 Jul 284(29):19349-60

So CW, Cleary ML. *Mol Cell Biol* 2002 Sep 22(18):6542-52

So CW, Cleary ML. *Blood* 2003 Jan 101(2):633-9

Stroud JC, Wu Y, Bates DL, Han A, Nowick K, Paabo S, Tong H, Chen L. *Structure* 2006 Jan 14(1):159-66

Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh YJ. *J Cell Biol* 2005 Jul 170(2):295-304

Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. *Sci STKE* 2003 Mar 2003(172):RE5

Tsai KL, Huang CY, Chang CH, Sun YJ, Chuang WJ, Hsiao CD. *J Biol Chem* 2006 Jun 281(25):17400-9

Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD. *Nucleic Acids Res* 2007 Oct 35(20):6984-94

Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y. *EMBO J* 2004 Apr 23(8):1889-99

Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V. *Nature* 1998 Jul 394(6688):88-92

Tzivion G, Luo Z, Avruch J. *Semin Cancer Biol* 2006 Jun 16(3):203-13

Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. *Oncogene* 2001 Jun 20(26):3348-53

Uno I, Matsumoto K, Adachi K, Ishikawa T. *J Biol Chem* 1983 Sep 258(18):10867-72

van der Heide LP, Jacobs FM, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP. *Biochem J* 2005 Nov 391(Pt 3):623-9

van der Plaats JB. *Biochem Biophys Res Commun* 1974 Feb 56(3):580-7

van Dongen MJ, Cederberg A, Carlsson P, Enerbäck S, Wikström M. *J Mol Biol* 2000 Feb 296(2):351-9

- van Heusden GP. *Genomics* 2009 Nov 94(5):287-93
- van Heusden GP, Steensma HY. *Yeast* 2006 Feb 23(3):159-71
- Wang F, Marshall CB, Yamamoto K, Li GY, Plevin MJ, You H, Mak TW, Ikura M. *J Mol Biol* 2008 Dec 384(3):590-603
- Weigel D, Jäckle H. *Cell* 1989 May 57(4):645-58
- Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H. *Cell* 1990 Nov 63(3):455-6
- Weigelt J, Climent I, Dahlman-Wright K, Wikström M. *Biochemistry* 2001 May 40(20):5861-9
- Wera S, De Schrijver E, Geyskens I, Nwaka S, Thevelein JM. *Biochem J* 1999 Nov 343 Pt 3:621-6
- Wilker EW, Grant RA, Artim SC, Yaffe MB. *J Biol Chem* 2005 May 280(19):18891-8
- Wilker EW, van Vugt MA, Artim SA, Huang PH, Petersen CP, Reinhardt HC, Feng Y, Sharp PA, Sonenberg N, White FM, Yaffe MB. *Nature* 2007 Mar 446(7133):329-32
- Woods YL, Rena G. *Biochem Soc Trans* 2002 Aug 30(4):391-7
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A, Gamblin SJ. *Nature* 1995 Jul 376(6536):188-91
- Yaffe MB. *Cell* 1997 Dec 91(7):961-71
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC. *FEBS Lett* 2002 Feb 513(1):53-7
- Yang X, Lee WH, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson CV, Grossmann JG, Sundström M, Doyle DA, Elkins JM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 Nov 103(46):17237-42
- Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y. *Nat Cell Biol* 2005 Mar 7(3):278-85
- Yuan, Z, Becker, E B, Merlo, P, Yamada, T, DiBacco, S, Konishi, Y, Schaefer. *Science* 2008 Mar 319(5870):1665-8
- Zhang L, Wang H, Masters SC, Wang B, Barbieri JT, Fu H. *Biochemistry* 1999 Sep 38(37):12159-64
- Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST et al. *J Biol Chem* 2002 Nov 277(47):45276-84
- Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA et al. *Biochem J* 2004 Mar 378:839–849
- Zhou Y, Reddy S, Murrey H, Fei H, Levitan IB. *J Biol Chem* 2003 Mar 278:10073–10080

# 8 Přílohy



## Příloha 1 - Vácha P et al., 2013

Biophysical Chemistry 184 (2013) 68–78


Contents lists available at ScienceDirect

**Biophysical Chemistry**

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/biophyschem>

**Detailed kinetic analysis of the interaction between the FOXO4–DNA-binding domain and DNA**

 CrossMark

Petr Vácha<sup>a</sup>, Iva Zusková<sup>a,b</sup>, Ladislav Bumba<sup>c</sup>, Petr Herman<sup>d</sup>, Jaroslav Vecer<sup>d</sup>,  
Veronika Obsilová<sup>b</sup>, Tomas Obsil<sup>a,b,\*</sup>

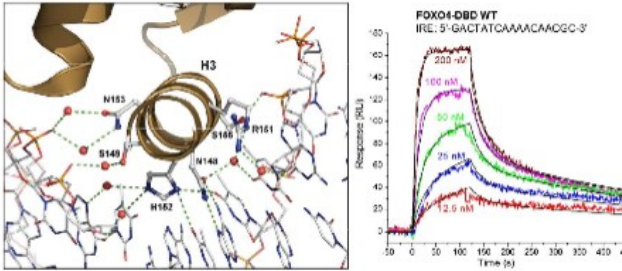
<sup>a</sup> Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, 12843 Prague, Czech Republic  
<sup>b</sup> Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 14220 Prague, Czech Republic  
<sup>c</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 14220 Prague, Czech Republic  
<sup>d</sup> Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Charles University in Prague, 12116 Prague, Czech Republic

---

**HIGHLIGHTS**

- Interaction between FOXO4 and DNA is described using a conformational change model.
- FOXO4–DBD undergoes a conformational change upon binding to the DNA.
- Segmental dynamics of FOXO4–DBD is reduced upon binding to the DNA.
- Non-specific contacts are important for binding affinity and specificity of FOXO4.

**GRAPHICAL ABSTRACT**



**ARTICLE INFO**

**Article history:**  
Received 16 July 2013  
Received in revised form 5 September 2013  
Accepted 5 September 2013  
Available online 15 September 2013

**Keywords:**  
FOXO4 forkhead transcription factor  
DNA-binding domain  
binding kinetics  
Surface plasmon resonance  
Time-resolved fluorescence  
Segmental dynamics

**ABSTRACT**

The FOXO forkhead transcription factors are potent transcriptional activators involved in a wide range of key biological processes. In this work, the real-time kinetics of the interaction between the FOXO4–DNA binding domain (FOXO4–DBD) and the DNA was studied by using surface plasmon resonance (SPR). SPR analysis revealed that the interaction between FOXO4–DBD and the double stranded DNA containing either the insulin-responsive or the DaF-16 family member-binding element is preferably described by using a conformational change model which suggests a structural change of FOXO4–DBD upon binding to the DNA. This was further confirmed by using the time-resolved tryptophan fluorescence anisotropy decay measurements which revealed profound reduction of segmental dynamics of FOXO4–DBD upon the complex formation. Alanine scanning of amino acid residues engaged in polar contacts with the DNA showed that certain non-specific contacts with the DNA backbone are very important for both the binding affinity and the binding specificity of FOXO4–DBD.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The FOXO transcription factors (FOXO1, FOXO3, FOXO4 and FOXO6) are potent transcriptional activators involved in a wide range of processes including energy metabolism control, DNA damage repair, cellular

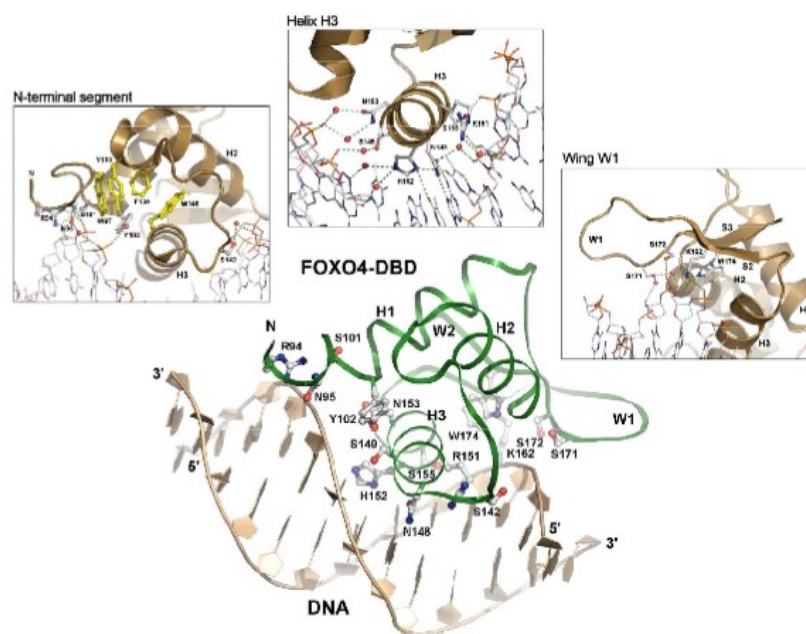
\* Corresponding author at: Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, 12843 Prague, Czech Republic. Tel.: +420 221951303; fax: +420 2228919752.  
E-mail address: [obsil@natur.cuni.cz](mailto:obsil@natur.cuni.cz) (T. Obsil).



proliferation, cell survival and stress resistance [1]. The FOXO proteins are members of the “O” subclass of the forkhead protein family (FOX) that comprises more than 100 proteins that are further classified into 17 subclasses (designated A–Q). All FOX proteins share a highly conserved DNA-binding domain (DBD), also known as the forkhead box or winged-helix domain, that possesses a compact  $\alpha/\beta$  fold and recognizes sequences containing the core motif 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' through a combination of direct and water-mediated side chain-base contacts [2,3]. The high conservation of forkhead DNA-binding domains as well as their binding motifs together with the large diversity of the biological processes the FOX proteins are involved in suggest the existence of a high degree of binding specificity [4]. Fine variations in binding affinity for different DNA response elements might be an important factor involved in the regulation of target gene expression by FOX proteins. Such mode of regulation has been shown, for example, for FoxA protein in the control of organogenesis [5]. However, factors underlying intrinsic variations in binding affinity of forkhead domains for different but very similar binding motifs are still not fully understood.

The most important part of the DNA-binding interface of forkhead domain is the helix H3, which binds into the major groove roughly perpendicular to the DNA axis and provides the principal contact surface with the core motif [3]. Residues involved in these interactions are conserved among all forkhead proteins and make a combination of direct

and water-mediated side chain-base contacts. Additional contacts with the DNA are made by residues from other parts of the domain including N-terminal segment, helices H1 and H2, and both flexible loops called wings W1 and W2. In addition, the forkhead domain binding narrows the major groove in which the helix H3 is located and induces a significant bend of the DNA. Members of FOXO subclass recognize two consensus motifs: 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', known as the insulin-responsive sequence (IRE) [6,7], and 5'-GTAAA(T/C)AA-3', known as the Daf-16 family member-binding element (DBE) [8,9]. Although both these sequences are closely related and include the core sequence, FOXO proteins bind the DBE sequence with higher affinity. Structural studies of FOXO-DBD-DNA complexes revealed expected mode of DNA recognition with residues from the helix H3 (N148 and H152 in FOXO4) making all direct base-specific contacts with the core sequence [10–12]. Other parts of FOXO-DBD DNA-binding interface include the N-terminal segment and both loops W1 and W2 that are involved in non-specific contacts with the phosphate groups of DNA backbone (Fig. 1). Solution structures of FOXO-DBD showed that the N-terminal segment, the loop W1 and especially the loop W2 are in the absence of DNA highly flexible [13,14]. The loop W2 is very important for the high-affinity binding of FOXO-DBD to the DNA, although being highly flexible and mostly disordered also in the presence of the DNA [11,15]. In addition, the loop between helices H2 and H3 adopts in apo-structures helical conformation while in the DNA-bound



**Fig. 1.** The crystal structure of the FOXO4-DBD-DNA complex [12]. Both the forkhead domain (green) and dsDNA (brown) are shown in ribbon representation. Secondary-structure elements are labeled according to the nomenclature typical for the winged-helix motif. All residues of FOXO4-DBD that are involved in polar contacts with the DNA are shown as sticks and spheres (brown), sticks and lines representation, respectively. A cluster of hydrophobic residues surrounding Y102 is shown in yellow. Water molecules are represented as red spheres. Polar contacts between FOXO4-DBD and DNA are represented by dashed green lines. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

complexes is unstructured. All these indicate that FOXO-DBD undergoes a structural transition during the binding to the DNA.

The FOXO-DBD-DNA interaction studies were focused so far mostly on base-specific contacts and sites of post-translational modifications within the DNA-binding interface [10,11,15–17]. However, it has been shown that non-DNA contact regions and non-specific contacts might affect the binding specificity and affinity of forkhead proteins through the repositioning of regions containing recognition elements (helix H3) and/or through the modulation of the dissociation rate of the protein-DNA complexes [18–21]. In order to better understand factors underlying FOXO's variations in affinity for different but closely related DNA sequences and especially the possible role of non-specific contacts, we performed alanine scanning mutagenesis of FOXO4-DBD amino acid residues engaged in polar contacts with the DNA followed by surface plasmon resonance (SPR) analysis. The real-time kinetics data revealed that the interaction between FOXO4-DBD and the double stranded DNA containing either IRE or DBE motif is preferably described by using a conformational change model which suggests a structural change of FOXO4-DBD upon binding to the DNA. Our SPR data show that all parts of the DNA-binding surface of FOXO4-DBD are important for the overall stability of the FOXO4-DBD-DNA complex and that certain non-specific contacts with the DNA backbone are very important for both the binding affinity and the binding specificity of FOXO4-DBD. The predominant mechanism that contributes to the decreased binding affinity upon the disruption of these contacts is the faster dissociation rate of the encounter complex compared to the wild-type.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Expression and purification of FOXO4-DBD

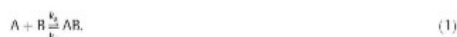
The human FOXO4-DBD (sequence 82–207) and all its mutant versions were expressed as described previously [12,15]. Briefly, FOXO4-DBD was expressed as N-terminal 6 × His-tag fusion proteins by IPTG induction for 20 h at 20 °C and purified from *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells using Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) according to the standard protocol. Eluted FOXO4-DBD was dialyzed against the buffer containing 50 mM sodium citrate (pH 6.3), 1 mM EDTA, 2 mM DTT and purified using cation-exchange chromatography on SP-Sepharose column (GE Healthcare Life Sciences). The final step, size-exclusion chromatography on Superdex 200 column (GE Healthcare Life Sciences), was performed in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, and 10% (w/v) glycerol. All mutants were generated by using the QuikChange kit (Stratagene) and mutations were confirmed by sequencing.

### 2.2. Surface plasmon resonance (SPR)

All SPR measurements were performed at 25 °C using a double-stranded DNA-coated LCP sensor chip mounted on a ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The double stranded DNA (dsDNA) was prepared by mixing of two complementary oligonucleotides in a molar ratio of 1:1 at 70 °C for 10 min and slowly (~20 min) cooled down to room temperature. The oligonucleotides were purchased from VBC Biotech (Vienna, Austria), and for dsDNA carrying IRE motif (underlined), oligonucleotides 5'-GACTATCAAAACAACGC-3' modified at 5' end by biotin and 5'-GCGTTGTTTGATAGTC-3'; for dsDNA carrying DBE sequence (underlined), oligonucleotides 5'-GACTATGTAACAACGC-3' modified at 5' end by biotin and 5'-GCGTTGTTTACATAGTC-3'; and for a control (random) dsDNA, oligonucleotides 5'-AACGTATGCTTAGCCA-3' modified at 5' end by biotin and 5'-TGGCTAGAGCATACGTT-3' were used, respectively. Biotinylated dsDNA was diluted to a final concentration of 100 nM in PBS buffer containing 0.05% Tween 20 and captured to a neutravidin-functionalized LCP chip at a flow rate of 30 µl/min for 2 min. Loosely attached material was removed from the chip surface by

two injections of 60 µl of 2 M NaCl. All SPR measurements were carried out in running buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT and 0.005% Tween-20 at the flow rate ranging from 25 to 75 µl/min for both association and dissociation phase of sensograms. The proteins were serially diluted in running buffer to indicated concentrations (200, 100, 50, 25 and 12.5 nM), and injected in parallel ("one-shot kinetics") over the immobilized dsDNA surface. Surfaces were typically regenerated with 100 µl of 2 M NaCl. The sensograms were corrected for sensor background by interspot referencing (the sites within the 6 × 6 array which are not exposed to ligand immobilization but are exposed to analyte flow), and double referenced by subtraction of analyte (channels 1–5) using a "blank" injection (channel 6).

The data were analyzed globally by fitting both the association and the dissociation phases simultaneously for five different FOXO4-DBD concentrations using both a 1:1 Langmuir-type binding model and the conformational change model to determine the kinetics association and dissociation rate constants. The Langmuir-type model assumes the interaction between protein (A) and DNA (B) resulting in a direct formation of the final complex (AB):



where  $k_a$  and  $k_d$  are the association and the dissociation rate constants, respectively. The conformational change model assumes the two-step association process:



where  $[AB]^*$  and  $AB$  represent encounter complex (transition state) and final docked state, respectively [22–24]. Parameters  $k_{a1}$  and  $k_{d1}$  are the association and the dissociation rate constants for the first step (encounter complex formation), while  $k_{a2}$  and  $k_{d2}$  are forward and reverse rate constants for the second step (conformational change). An apparent equilibrium dissociation constant,  $K_D$ , for the 1:1 Langmuir-type binding was determined as

$$K_D = k_d/k_a, \quad (3)$$

and for the conformational change binding model as

$$K_D = 1/[(k_{d1}/k_{a1}) \times (1 + k_{a2}/k_{d2})]. \quad (4)$$

Detailed description of both binding models including the rate equations and the description of the fitting procedure is shown in the supplementary material.

### 2.3. Time-resolved fluorescence measurements

Fluorescence intensity and anisotropy decays were measured on a time-correlated single photon counting apparatus, as described previously [25]. Tryptophan emission was excited at 298 nm by the third harmonic of the Ti:Sapphire laser emitting at 894 nm. Tryptophan fluorescence was collected at 355 nm using a monochromator equipped with a stack of UG1 and BG40 glass filters (Thorlabs) placed in front of its input slit. Typically, the decays were accumulated in 1024 channels with time resolution of 50 ps per channel until  $10^7$  counts per decay were reached. Samples were placed in a thermostatic holder, and all experiments were performed at 23 °C in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 2 mM DTT. The FOXO4-DBD concentration was 5 µM, and the dsDNA concentration was 15 µM. The following oligonucleotides containing consensus IRE motif (underlined) were used to prepare samples of dsDNA: 5'-GACTATCAAAACAACGC-3' and 5'-GCGTTGTTTGATAGTC-3'. The fluorescence decays were acquired

under magic-angle conditions in which the measured intensity decay,  $I(t)$ , is independent of the rotational diffusion of the chromophore and provides true lifetime information. Fluorescence was assumed to decay multieponentially according to the formula

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \times \exp(-t/\tau_i), \quad (5)$$

where  $\tau_i$  and  $\alpha_i$  are the fluorescence lifetimes and the corresponding amplitudes, respectively. A maximum entropy method was used to analyze  $I(t)$  [26]. The program yields amplitudes,  $\alpha_i$ , that represent the lifetime distribution. We chose 100 lifetimes equidistantly spaced in the logarithmic scale, covering the range from 20 ps to 20 ns. The mean lifetime was calculated as follows:

$$\tau_{\text{mean}} = \sum_i f_i \tau_i = \sum_i (\alpha_i \tau_i^2) / \sum_i (\alpha_i \tau_i), \quad (6)$$

where  $f_i$  is the fractional intensity of the  $i$ th lifetime component. The polarized components  $I_{\parallel}(t)$  and  $I_{\perp}(t)$  required for the construction of the fluorescence anisotropy  $r(t)$  were accumulated quasi-simultaneously with a switching frequency of 30 s. The polarized decays were measured with the emission polarizer set in the fixed vertical position, and excitation polarization plane was rotated 0° and 90°, respectively. This approach minimized the need to correct transmittances of the detection channel for different polarizations, because the G-factor was close to one. The value of the G-factor was determined in an independent experiment. The fluorescence anisotropy decays  $r(t)$  were obtained by simultaneous reconvolution analysis of both parallel  $I_{\parallel}(t)$  and perpendicular  $I_{\perp}(t)$  decay components. Data were analyzed by a model-independent maximum entropy method that does not set prior limits on the shape of the distributions [26]. The anisotropies  $r(t)$  were analyzed for a series of exponentials:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \times \exp(-t/\phi_i), \quad (7)$$

where the amplitudes  $\beta_i$  represent the distribution of the correlation times  $\phi_i$  and are related to the initial anisotropy  $r_0$  by the formula

$$\sum_i \beta_i = r_0. \quad (8)$$

We used 100 correlation times  $\phi_i$  equidistantly spaced in the logarithmic scale ranging from 50 ps to 200 ns.

#### 2.4. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) measurements were carried out as described previously [27]. Briefly, the CD spectra were measured in a quartz cuvette with an optical path length of 1 mm (Starna, USA) using a J-810 spectrometer (Jasco, Japan). The conditions of the measurements were as follows: a spectral region of 200–320 nm, a scanning speed of 10 nm/min, a response time of 8 s, a resolution of 1 nm, a bandwidth of 1 nm and a sensitivity of 100 mdeg. The final spectrum was obtained as an average of 5 accumulations. The spectra were corrected for a baseline by subtracting the spectra of the corresponding polypeptide-free solution. The spectra were recorded at room temperature (23 °C) in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 10% (w/v) glycerol. The FOXO4-DBD concentration was 6 μM.

### 3. Results

#### 3.1. Site-directed mutagenesis of FOXO4-DBD

The importance of various residues in FOXO4-DBD for its binding to the target DNA has already been investigated by several groups, but only for residues that are either involved in base-specific contacts or serve as sites of post-translational modifications [10,11,15–17]. However, neither detailed kinetic analysis nor the evaluation of the role of non-specific contacts (contacts to the phosphate groups of the DNA) for the binding affinity and specificity of FOXO4-DBD were published so far. In order to evaluate the importance of these contacts on the stability of FOXO4-DBD-DNA complexes, the amino acids involved in both specific and non-specific polar contacts between FOXO4-DBD and DNA [12] were substituted to alanine residue (with the exception of Y102 which was replaced by Phe), and the real-time binding kinetics of individual FOXO4-DBD mutants were analyzed by using surface plasmon resonance (SPR). The list of the FOXO4-DBD mutants and the type of interaction between the side-chain of the mutated residue and DNA are shown in Table 1. The expression yield as well as the solubility of all prepared mutants were unchanged compared to FOXO4-DBD WT. Structural integrity of prepared proteins was verified by using circular dichroism (CD) measurements. Supplemental Fig. S1 shows the far-UV CD spectra of FOXO4-DBD WT and mutants that exhibit the most profound change in DNA-binding affinity. As can be noticed the CD spectra of these mutants showed no significant differences compared to WT.

#### 3.2. Kinetics of interaction between FOXO4-DBD and DNA

Interactions of FOXO4-DBD with DNA were studied by immobilization of biotinylated double-stranded DNA (dsDNA) containing a random sequence, IRE or DBE motif, respectively, on the neutravidin-coupled LCP sensor chip. To minimize non-specific binding and mass transfer effect, three coupling concentrations of dsDNA leading to refractive index changes of 30, 80, and 150 RU were tested. Initial experiments at each of these dsDNA-coating concentrations were conducted with FOXO4-DBD at concentrations ranging from 10 to 200 nM. Initial estimates of  $k_{\text{off}}$  values showed concentration dependence at coupling levels of 80 and 150 RU which indicating mass transfer effects.

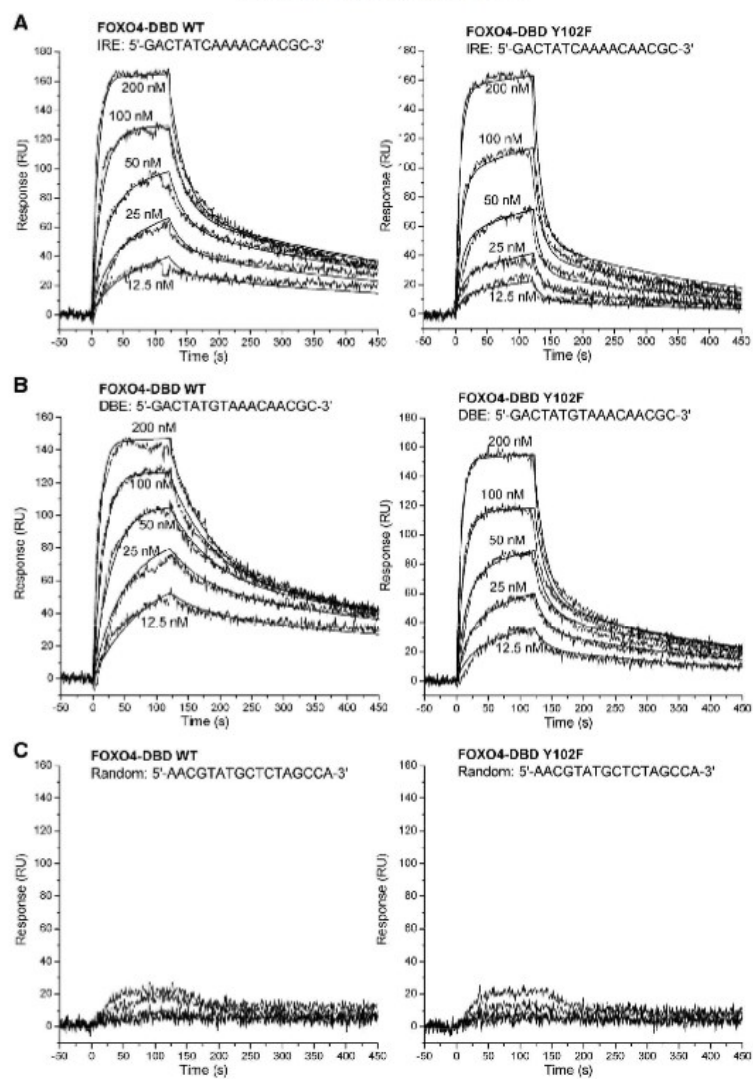
**Table 1**  
FOXO4-DBD mutants used in the SPR analysis.

FOXO4-DBD mutant	Secondary structure element <sup>a</sup>	Type of the polar contact(s) <sup>b</sup>
R94A	NT	SC-DNA(P);ES
N95A	NT	SC-DNA(P); SC-W-DNA(P)
S101A	H1	SC-W-DNA(P)
Y102F	H1	SC-DNA(P)
S142A	H2-H3	SC-DNA(P); SC-W-DNA(P)
N148A	H3	SC-DNA(B); SC-W-DNA(B)
S149A	H3	SC-W-DNA(P)
R151A	H3	SC-W-DNA(B)
H152A	H3	SC-DNA(B); SC-W-DNA(B)
N153A	H3	SC-W-DNA(P)
S155A	H3	SC-DNA(P)
K162A	S2	SC-DNA(P);ES
S171A	W1	SC-W-DNA(P)
S172A	W1	SC-DNA(P)
ΔC (R2-183)	W2 (missing)	1 × SC-DNA(P);ES, 1 × ES, 2 × SC-DNA(P) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> NT, N-terminal loop; H1, α-helix H1; H2-H3, loop between α-helices H2 and H3; H3, α-helix H3; S2, β-strand S2; W1, wing W1; W2, wing W2.

<sup>b</sup> SC-DNA(P), a hydrogen bond between the side chain and the phosphate group; SC-W-DNA(P), a water mediated interaction between the side chain and the phosphate group; SC-DNA(B), a hydrogen bond between the side chain and the base; SC-W-DNA(B), a water mediated base-specific interaction; ES, electrostatic interaction.

<sup>c</sup> Based on crystal structure of the FOXO4-DBD-DNA complex [10].



**Fig. 2.** SPR kinetic binding analysis of the interaction between DNA and FOXO4–DNA-binding domain (DBD). One-shot kinetics data of the wild-type FOXO4–DBD (left column) and the FOXO4–DBD–Y102F mutant (right column) interacting with dsDNA containing the insulin-responsive (A), the Dal-16 family member-binding element (B), and dsDNA containing a random DNA sequence (C). The proteins at indicated concentrations were injected in parallel over the sensor chip coated with dsDNA and the flow rate was maintained at 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  for both association and dissociation phases of the sensograms. The kinetic data were globally fitted by using a conformational change model (see Materials and methods). The fitted curves are superimposed as thin black line on top of the sensograms.

However, coupling level of 30 RU resulted in clear responses and concentration independence of  $k_{off}$  at flow rates ranging from 25 to 75  $\mu\text{l}/\text{min}$  (data not shown). Consequently, coupling level of 30 RU and flow rate of 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  were used for the remaining experiments.

Real time interaction of FOXO4-DBD with the IRE and DBE sequence revealed a typical association and dissociation phases of the sensogram (Fig. 2). Binding was specific, since negligible binding of FOXO4-DBD was detected to the chip coated with the random dsDNA sequence (Fig. 2C). Kinetic parameters of the FOXO4-DBD-DNA interactions were calculated from global fitting of concentration-dependent binding curves. The data were fitted to both a simple 1:1 Langmuir-type binding model (Eq. (1)) and a conformational change model (Eq. (2)). We found that the interaction between FOXO4-DBD and both used dsDNAs is significantly better described (in terms of reduced  $\chi^2$  and residual statistics) by the conformational change model compared to the 1:1 Langmuir-type model. The fits of the conformational change binding model to the SPR data of FOXO4-DBD WT and FOXO4-DBD Y102F mutant binding to IRE and DBE are shown as an example in Fig. 2A and B. The fits of the 1:1 Langmuir-type binding model to the same SPR data as well as the residual plots of these fits are shown in Fig. S2. To prove the conformational change model by SPR, variation in the injection times at high concentration of FOXO4-DBD (300 nM) were investigated for both IRE and DBE sequences. Changing the injection time of the analyte revealed that the dissociation rate was progressively decreased after longer contact time, indicating that the stability of the initial FOXO4-DBD-DNA complexes increases over time (Fig. 3 and Fig. S3).

### 3.3. Conformational change of FOXO4-DBD upon its binding to the DNA

To further validate the conformational change of FOXO4-DBD upon binding to the DNA, time-resolved tryptophan fluorescence anisotropy decay measurements were used to compare the segmental dynamics (flexibility) of FOXO4-DBD WT in its apo- and DNA-bound states. The FOXO4-DBD contains five tryptophan residues (W97, W126, W146, W173 and W174) that sample various regions of DBD including N-terminal segment, helices H2 and H3, and  $\beta$ -strand S3 (Fig. S4). Since we were unable to prepare mutants containing single Trp residue (simultaneous mutagenesis of four other Trp residues to Phe renders FOXO4-DBD insoluble, presumably due to misfolding) we decided to perform this experiment with FOXO4-DBD WT containing all five tryptophan residues. The time-resolved fluorescence intensity and anisotropy decays were analyzed using a singular-value

**Table 2**

Summary of time-resolved tryptophan fluorescence measurements of FOXO4-DBD.

	$\tau_{\text{mean}}^a$ (ns)	$\beta_1^{ns}$	$\phi_1^{ns}$	$\beta_2^{ns}$	$\phi_2^{ns}$	$\beta_3^{ns}$	$\phi_3^{ns}$
FOXO4-DBD	4.19	0.041	1.7	0.094	2.7	0.076	12
FOXO4-DBD + DNA	3.85	0.059	0.9	-	-	0.147	19

<sup>a</sup> The mean fluorescence lifetime ( $\tau_{\text{mean}}$ ) was calculated using Eq. (6).

<sup>b</sup> The fluorescence anisotropies  $r(t)$  were analyzed for series of exponentials (Eq. (7)), where the amplitudes  $\beta_i$  represent the distribution of the correlation times  $\phi_i$ .

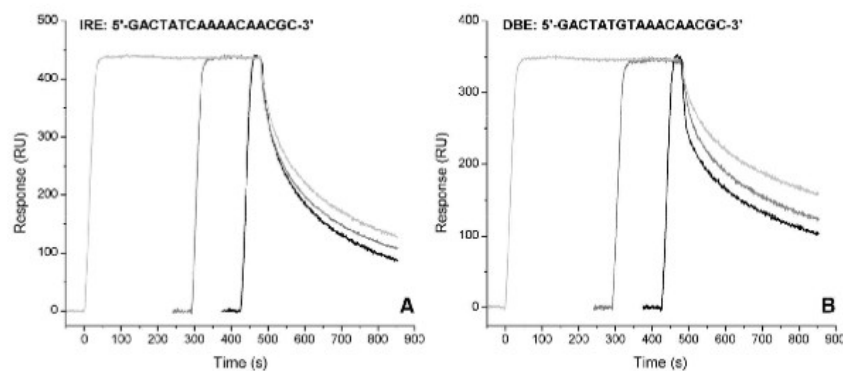
<sup>c</sup> SD < 0.05 ns.

<sup>d</sup> SD < 0.01.

<sup>e</sup> SD < 20%.

decomposition maximum entropy method as previously described [26]. The results of these experiments are presented in Table 2 and Figs. 4 and 5. The analysis of the fluorescence anisotropy decays revealed three and two classes of correlation times in the absence and the presence of the DNA, respectively (Table 2 and Fig. 5). Short correlation times located around 0.9–1.3 ns and 2.7 ns reflected the fast local motions of Trp residues. The long correlation time,  $\phi_3$ , likely reflected the rotational diffusion of the whole protein molecule or the protein-DNA complex. The change in the segmental mobility of FOXO-DBD was assessed from the change in the sum of amplitudes of fast anisotropy decay components ( $\beta_{\text{fast}} = \beta_1 + \beta_2$ ). As can be noticed, the binding of FOXO4-DBD to the DNA significantly decreased  $\beta_{\text{fast}}$  ( $\beta_{\text{fast}}(\text{FOXO4-DBD}) = 0.135$ ;  $\beta_{\text{fast}}(\text{FOXO4-DBD-DNA}) = 0.059$ ). In addition, the second component of the fluorescence anisotropy decay represented by the correlation time  $\phi_2$  was absent in the presence of the DNA. These changes can be interpreted as a significant reduction of segmental motions (flexibility) of the whole FOXO4-DBD molecule upon its binding to the DNA, since high mobility of any of the 5 Trps distributed around the whole molecule would lead to a fast fluorescence depolarization and increase of  $\beta_{\text{fast}}$ . The reduction of flexibility is also well demonstrated in the raw anisotropy decays by the lower decrease of the fluorescence anisotropy at short times after the excitation in the presence of the DNA (Fig. 4). Thus, results of time-resolved fluorescence anisotropy decay measurements strongly suggested that the FOXO4-DBD binding to the DNA is accompanied by structural changes in DBD corroborating the conformational change binding model for FOXO4-DBD-DNA interaction.

In addition, the conformational change model is also fully consistent with the available structural data on FOXO-DBD proteins. The comparison of apo- and DNA-bound structures of FOXO-DBD revealed significant



**Fig. 3.** Effect of different sample injection times on the dissociation rates of the sensograms. The wild-type FOXO4-DBD (300 nM) was injected at different contact times (association phase) over the sensor chip coated with dsDNA containing either the insulin responsive (IRE) (A), or the Dal-16 family member binding element (DBE) (B) at flow rate of 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . The sensograms were aligned to the end of the association phases in order to highlight the differences in the dissociation rates. No normalization of the sensograms was applied.

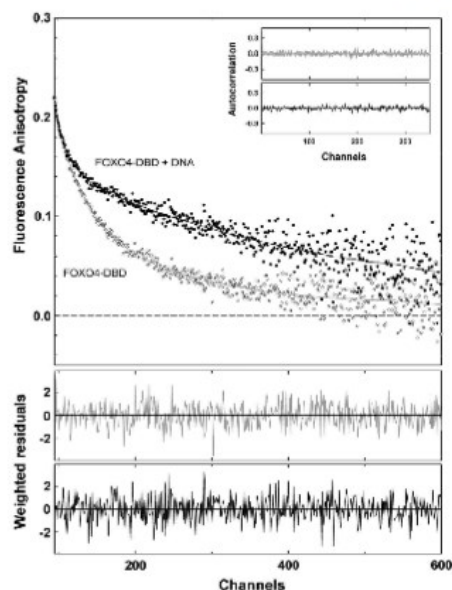


Fig. 4. Tryptophan fluorescence anisotropy decays constructed from the raw polarized decay data for FOXO4-DBD in the absence (○) and the presence (●) of dsDNA. The weighted residuals of both fits (gray, FOXO4-DBD alone; black, FOXO4-DBD + DNA) are shown in the lower panels. The quality of fits is also demonstrated by the autocorrelation functions shown in the inset (gray, FOXO4-DBD alone; black, FOXO4-DBD + DNA).

differences in several regions including the N-terminal region, the loop between helices H2 and H3, and both wings W1 and W2 (Fig. 6) [10,12–14]. The largest conformational change takes place within the H2–H3 loop which adopts helical structure in the absence of DNA while in its presence is mostly unstructured. In addition, in all FOXO-DBD–DNA complexes the DNA molecule is bent toward FOXO-DBD with the major groove being slightly wider in the core-motif region [10–12].

#### 3.4. Alanine scanning mutagenesis of amino acid residues engaged in contacts with the DNA

Based on the contact residues identified in the FOXO4-DBD–DNA complex, alanine scanning mutagenesis of FOXO4-DBD was performed followed by SPR analysis to assess the contribution of individual polar contacts for the stability of FOXO4-DBD–DNA complex as well as the kinetics of interaction. The calculated association and dissociation rate constants ( $k_{a1}$ ,  $k_{d2}$ ,  $k_{a1}$ , and  $k_{d1}$  from Eq. (2)) as well as  $K_D$  for interactions between prepared FOXO4-DBD variants and dsDNA containing IRE and DBE motifs are listed in Tables 3 and 4, respectively. Residuals plots for fits of the conformational change binding model to the SPR data of all FOXO4-DBD variants binding to IRE and DBE elements are shown in Figs. S5 and S6, respectively. The data analysis revealed that FOXO4-DBD WT binds both dsDNAs with  $K_D$  in the nanomolar range with the binding affinity being approximately four times higher for DBE compared to IRE ( $K_D$  of  $16 \pm 3$  nM and  $60 \pm 10$  nM for DBE and IRE, respectively), in a good agreement with previously published data [8,11].

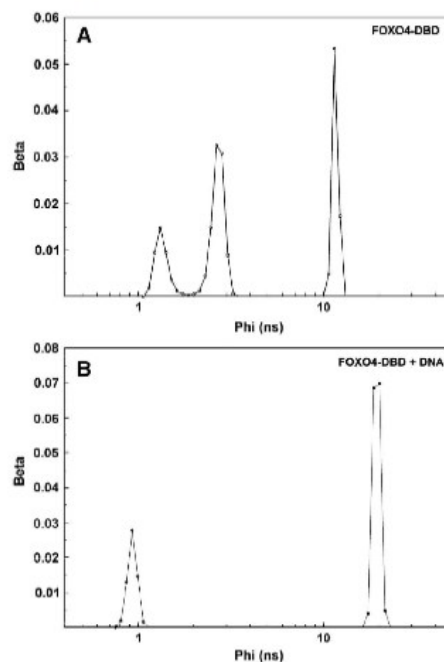
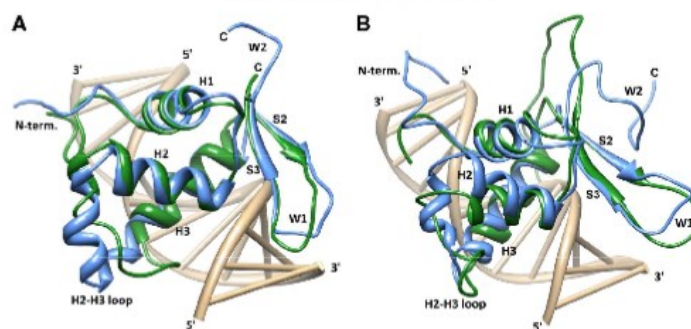


Fig. 5. Distributions of rotational correlation times of FOXO4-DBD in the absence (A) and the presence (B) of dsDNA.

Overall comparison of  $K_D$  values revealed significant decrease in the binding affinity (increase in  $K_D$ ) for several mutants from various regions of DBD. In the case of binding to the IRE element, the largest decrease in the binding affinity was observed for mutants Y102F, N148A and  $\Delta C$ , whereas in the case of binding to the DBE element the greatest affinity decrease were seen for mutants S101A, Y102F, N148A, H152A, K162A and  $\Delta C$ . The predominant mechanism that contributed to the decreased binding affinity of these mutants is the faster dissociation rate of the encounter complex (described by the dissociation rate constant  $k_{d1}$  from Eq. (2)) compared to the wild-type. On the other hand, for mutants S142A and K162A in binding to the IRE element, and for mutants S142A and S171A in binding to the DBE element we observed an opposite effect, a significant increase in their binding affinity. It seems that the predominant mechanism that contributes to the increased binding affinity of these cases was the slower reverse rate of the conformational change (described by the dissociation rate constant  $k_{d2}$  from Eq. (2)).

#### 3.4.1. N-terminal segment of FOXO4-DBD

Five residues from the N-terminal part of FOXO4-DBD (up to the helix H3) form either direct or water-mediated hydrogen bonds with the DNA: R95, N95, S101, Y102, and S142 (Table 1 and Fig. 1). The most significant decrease in the DNA binding affinity for IRE element was observed for mutant Y102F (Table 3), whereas in the case of DBE element for mutants S101A and Y102F (Table 4). The replacement of Y102 for Phe, which removes one hydrogen bond (non-specific contact



**Fig. 6.** Conformational changes of FOXO4-DBD induced by binding to the DNA. (A) Superimposition of the FOXO4-DBD-DNA structure (shown in green [12]) with the solution structure of apo FOXO4-DBD (shown in blue [13]). (B) The superimposition of FOXO3-DBD-DNA (shown in green [10]) with the solution structure of apo FOXO3-DBD (shown in blue [14]). Secondary-structure elements are labeled according to the nomenclature typical for the winged-helix motif. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to the phosphate group of the DNA backbone) by eliminating the phenolic hydroxyl group of Y102, resulted in one of the most profound increases in the dissociation rate constant for the encounter complex formation ( $k_{d1}$ ), and consequently also in  $K_D$ , among all studied mutants. This suggested the critical importance of this contact for the overall stability of the complex between FOXO4-DBD and the DNA.

#### 3.4.2. DNA-recognition helix H3

All direct base-specific contacts between FOXO4-DBD and the core motif are made by residues N148 and H152 (Fig. 1) and their replacement significantly reduced the FOXO4-DBD binding to both IRE and DBE, with the relative decrease in the binding affinity (increase in  $K_D$ ) for DBE being much higher than for IRE. Differences in the relative change in affinity for DBE and IRE were also observed upon the replacement of residue S155, which makes non-specific contact with the phosphate group of the DNA backbone. On the other hand, either no or relatively small change in  $K_D$  for both elements was observed upon the replacement of other contact residues from the helix H3: S149, R151, and N153. All these

three residues are involved in water-mediated contacts, either base-specific (R151) or non-specific with phosphate groups of the DNA backbone (S149 and N153), suggesting that these interactions are not an important factor for the binding specificity nor the stability of the FOXO4-DBD-DNA complexes.

#### 3.4.3. Flexible loops W1 and W2

Structural studies revealed that four residues from the wing W1 make either direct or water-mediated non-specific contacts with phosphate groups of the DNA backbone: K162, S171, S172 and W174 (Fig. 1). The K162A mutant exhibited somewhat decreased  $K_D$  for IRE element (change in  $K_D$  from 60 to 30 nM) but, on the other hand, significantly increased  $K_D$  for DBE element (change in  $K_D$  from 16 to 70 nM). The kinetic analysis revealed that in the case of binding to the IRE element this mutation decreased the reverse rate constant for the conformational change ( $k_{c12}$ ), while in the case of binding to the DBE element it increased the dissociation rate constant for the encounter complex formation ( $k_{d1}$ ). The diverse effect on binding to IRE versus DBE was

**Table 3**  
Kinetic and binding affinity constants for the interactions between FOXO4-DBD and DNA containing IRE element.

Protein	$k_{d1} \times 10^{-5}$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ] <sup>a</sup>	$k_{d1} \times 10^2$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{c12} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ (nM) <sup>b</sup>	$\Delta^{c,d}$
WT (82–207)	1.67 ± 0.18	2.42 ± 0.31	3.65 ± 0.33	2.63 ± 0.28	60 ± 10	
R94A	1.85 ± 0.19	4.88 ± 0.56	1.74 ± 0.41	3.17 ± 0.35	120 ± 30	+
N95A	1.14 ± 0.09	3.56 ± 0.52	1.31 ± 0.34	2.35 ± 0.27	130 ± 30	+
S101A	0.87 ± 0.12	2.63 ± 0.31	3.47 ± 0.41	2.12 ± 0.25	120 ± 30	+
Y102F	1.59 ± 0.18	7.72 ± 0.83	2.99 ± 0.3	2.46 ± 0.28	220 ± 50	++
S142A	2.09 ± 0.23	1.96 ± 0.21	3.89 ± 0.46	1.68 ± 0.21	28 ± 7	+
N148A	1.84 ± 0.14	6.52 ± 0.52	2.7 ± 0.32	3.26 ± 0.35	180 ± 40	++
S149A	1.7 ± 0.21	4.62 ± 0.64	2.65 ± 0.28	1.85 ± 0.21	110 ± 30	-
R151A	0.98 ± 0.09	2.63 ± 0.38	4.8 ± 0.53	1.89 ± 0.21	80 ± 20	-
H152A	1.38 ± 0.14	4.19 ± 0.53	3.11 ± 0.37	2.25 ± 0.24	130 ± 30	+
N153A	1.25 ± 0.92	5.19 ± 0.58	3.61 ± 0.38	1.24 ± 0.14	110 ± 80	-
S155A	1.4 ± 0.17	5.13 ± 0.67	3.6 ± 0.35	1.36 ± 0.15	100 ± 20	-
K162A	1.31 ± 0.15	3.41 ± 0.37	2.62 ± 0.31	0.38 ± 0.04	30 ± 7	*
S171A	0.93 ± 0.12	2.02 ± 0.27	3.04 ± 0.33	0.84 ± 0.09	50 ± 10	-
S172A	1.6 ± 0.13	3.79 ± 0.65	3.08 ± 0.35	2.01 ± 0.22	90 ± 20	-
ΔC (82–187)	2.52 ± 0.35	28.3 ± 4.1	3.9 ± 0.43	3.18 ± 0.37	500 ± 100	+++

<sup>a</sup> Results are means ± S.D. from the analysis of two independent measurements carried out in duplicate.  
<sup>b</sup> The equilibrium dissociation constant,  $K_D$ , was determined as  $1/(k_{d1}/k_{c12}) \times (1 + k_{d2}/k_{c12})$  assuming conformational change model. Error was calculated from the errors in determination of rate constants.  
<sup>c</sup> Relative increase in  $K_D$  with respect to WT: (-), <2×; (+), 2–3×; (++) , 3–4×; (+++) , >4×.  
<sup>d</sup> (\*) denotes a significant decrease in  $K_D$  with respect to WT.

**Table 4**  
Kinetic and binding affinity constants for the interactions between FOXO4-DBD and DNA containing DBE element.

Protein	$k_{a1} \times 10^{-5}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d1} \times 10^2$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{a2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{d2} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ (nM) <sup>b</sup>	$\Delta^{rel}$
WT (82–207)	2.02 ± 0.19	1 ± 0.13	2.05 ± 0.24	1.32 ± 0.09	16 ± 3	
R94A	2.01 ± 0.35	1.99 ± 0.26	3.65 ± 0.4	2.33 ± 0.26	29 ± 7	–
N95A	1.37 ± 0.14	2.27 ± 0.25	3.47 ± 0.36	1.55 ± 0.18	50 ± 10	+++
S101A	0.97 ± 0.11	2.04 ± 0.26	2.82 ± 0.31	1.42 ± 0.17	70 ± 20	+++
Y102F	2.14 ± 0.27	4.49 ± 0.58	3.49 ± 0.38	1.97 ± 0.21	80 ± 20	+++
S142A	2.6 ± 0.31	0.77 ± 0.09	2.68 ± 0.25	0.84 ± 0.1	7 ± 2	*
N148A	2.14 ± 0.23	4.59 ± 0.49	2.2 ± 0.24	3.79 ± 0.45	140 ± 30	+++
S149A	2.61 ± 0.35	2.06 ± 0.19	2.26 ± 0.27	0.77 ± 0.09	20 ± 5	–
R151A	1.11 ± 0.18	1.25 ± 0.1	3.61 ± 0.38	1.29 ± 0.16	30 ± 7	–
H152A	1.47 ± 0.19	3.6 ± 0.42	3.66 ± 0.39	1.61 ± 0.2	80 ± 20	+++
N153A	2.43 ± 0.29	3.36 ± 0.38	2.75 ± 0.31	0.97 ± 0.12	36 ± 8	+
S155A	1.44 ± 0.19	3.56 ± 0.48	4.79 ± 0.52	1.36 ± 0.17	60 ± 20	++
K160A	1.45 ± 0.17	2.55 ± 0.36	2.64 ± 0.29	1.51 ± 0.16	70 ± 20	+++
S171A	1.55 ± 0.19	1.07 ± 0.09	2.34 ± 0.25	0.14 ± 0.02	4 ± 1	*
S172A	2.04 ± 0.22	1.63 ± 0.18	3.14 ± 0.34	1.43 ± 0.15	25 ± 5	–
ΔC (82–183)	1.9 ± 0.28	25.2 ± 3.9	4.8 ± 0.52	3.41 ± 0.41	600 ± 100	+++

<sup>a</sup> Results are means ± S.D. from the analysis of two independent measurements carried out in duplicate.

<sup>b</sup> The equilibrium dissociation constant,  $K_D$ , was determined as  $1/(k_{a1}/k_{d1}) \times [1 + k_{a2}/k_{d2}]$  assuming conformational change model. Error was calculated from the errors in determination of rate constants.

<sup>c</sup> Relative increase in  $K_D$  with respect to WT: (–), <2×; (+), 2–3×; (++), 3–4×; (+++), >4×.

<sup>d</sup> (\*) denotes a significant decrease in  $K_D$  with respect to WT.

also observed for the S171A mutant that showed no change in binding affinity for the IRE element but significantly decreased  $K_D$  for the DBE element through the reduction of the rate constant  $k_{d2}$ . Mutation S172A had no effect on FOXO4-DBD binding to both tested elements. We were unable to test the role of W174 as its substitution to Phe caused aggregation of prepared FOXO4-DBD protein.

To assess the role of flexible wing W2 in the stability of the FOXO4-DBD-DNA complex we used the C-terminally truncated FOXO4-DBD (amino acids 82–183). The results from SPR measurements showed that the removal of wing W2 dramatically reduced the DNA-binding affinity of FOXO4-DBD for both IRE and DBE elements (Tables 3 and 4). In both cases the C-terminally truncated protein exhibited much faster dissociation rate of the encounter complex (described by the dissociation rate constant  $k_{d1}$ ) compared to the wild-type, thus confirming that the wing W2 region, although being very flexible, is very important for the stability of FOXO-DBD-DNA complexes, and especially for the formation of the encounter protein-DNA complexes.

#### 4. Discussion

FOXO proteins recognize both motifs through similar patterns of direct and water-mediated side chain-base contacts and numerous non-specific contacts to the DNA backbone. Brent et al. [11] by comparing crystal structures of FOXO1-DBD bound to IRE and DBE suggested that difference in the binding affinity for these two motifs results from different hydrogen-bonding patterns around side chains of N211 and H215 (N148 and H152 in FOXO4). Structural studies also revealed that non-specific contacts to the phosphate groups of the DNA backbone, mainly those contributed by flexible wing W2, are an important factor in the modulation of FOXO-DNA interactions. Since even small differences in DNA-binding affinity for different response elements might potentially influence gene regulations by these motifs (e.g. the timing of gene expression [5]), the detailed understanding of bases of protein-DNA recognition is of utmost importance. In this work, we studied the real-time kinetics of the interaction between FOXO4-DBD and the DNA as well as the role of polar contacts observed at the FOXO4-DBD-DNA interface (Table 1 and Fig. 1) for binding affinity and specificity using SPR analysis.

The comparison of apo- and DNA-bound structures indicates that both FOXO-DBD and the DNA undergo a structural transition during the complex formation [10–14]. The present real-time kinetics study shows that the interaction between FOXO4-DBD and the dsDNA

containing either the DBE or the IRE element is preferably described by using a conformational change binding kinetics that includes a structural change of FOXO4-DBD upon the binding to the DNA. Next, the time-resolved tryptophan fluorescence anisotropy decay measurements were used to provide a direct experimental evidence of suggested conformational change of FOXO4-DBD upon its binding to the DNA. These experiments showed a significant restriction of segmental motions of tryptophan residues upon the complex formation, thus confirming that FOXO4-DBD undergoes a structural change connected with significant loss of flexibility (Table 2 and Figs. 4 and 5). Our data, therefore, strongly suggest that the structural transition is an inherent part of the interaction between FOXO-DBD and the DNA.

Next, we performed alanine scanning mutagenesis of FOXO4-DBD amino acid residues engaged in polar contacts with the DNA to assess their contribution for both the binding affinity and the specificity. The SPR analysis revealed that the majority, but not all, of studied residues play an important role in the overall stability of FOXO4-DBD-DNA complexes. However, the contributions of individual contact residues, including those contributing non-specific contacts to the phosphate groups of the DNA backbone, significantly differ between two studied DNA motifs (Tables 3 and 4) suggesting that these non-specific contacts play a role in binding specificity of FOXO-DBD. The majority of generated FOXO4-DBD variants exhibits the faster dissociation rate of the encounter complex (described by the dissociation rate constant  $k_{d1}$  from Eq. (2)) compared to FOXO4-DBD WT. The most significant reduction in binding affinity was observed for the deletion mutant ΔC with the missing wing W2, mutants of residues involved in base-specific contacts (N148 and H152), and, interestingly, mutant of Y102 which is involved in non-specific contact with the phosphate group of the DNA backbone. Structural studies showed that residue Y102 is a part of a cluster of hydrophobic residues consisting of W97 from the N-terminal loop, Y102 from the helix H1, Y133 and F134 from the loop between helices H2 and H3, and W146 from the N-terminal part of helix H3 (Fig. 1). It has previously been shown that residues from these regions affect the DNA-binding properties of various FOX transcription factors, presumably through the repositioning of the recognition helix H3 [18,19,28,29]. Thus, we may speculate that the removal of hydrogen bond between Y102 and the DNA backbone affects the presentation of the helix H3 to the major groove of the DNA, thus significantly reducing the binding affinity for both tested motifs. In addition, our SPR data show that mutations within the N-terminal



segment (N95A, S101A and Y102F) have more distinct effect on interaction with DBE rather than IRE (Tables 3 and 4). These residues make non-specific contacts with the phosphate groups of the DNA backbone at the border of the core motif where sequences of IRE and DBE elements differ. This suggests that the N-terminal segment might play a role in DNA-binding specificity of FOXO proteins.

Compared with other FOX proteins, all members of FOXO subfamily contain between helices H2 and H3 a five-amino-acid insertion (sequence KGDSN) of unknown function. Structural studies revealed either no (for FOXO1-DBD and FOXO3-DBD) or very few (for FOXO4-DBD) contacts of this region with the DNA [10–12]. Fig. 1 shows the interaction observed in the FOXO4-DBD-DNA complex where one of these residues (S142) makes several non-specific contacts with the phosphate groups of the DNA. As can be noticed from Tables 3 and 4, the S142A mutation did affect (significantly increases) the binding affinity suggesting that this region plays some modulatory role in FOXO binding to the DNA.

Highly conserved residues from helix H3 make extensive contacts with bases of the core sequence via both direct and water-mediated hydrogen bonds as well as van der Waals contacts [10–12]. Since all direct base-specific contacts are made by residues N148 and H152 (Fig. 1) it is not surprising that replacement of both these residues significantly reduced the FOXO4-DBD binding to both IRE and DBE, with the effect being much higher for DBE than for IRE (Tables 3 and 4). It is likely that these differences reflect different pattern of hydrogen-bonding interactions between side-chains of these residues and the core sequences of DBE and IRE elements [11].

It has previously been suggested that the flexible loop W1 located between strands S2 and S3 (Fig. 1), which differs both in length and its amino acid composition among different FOX proteins, plays various roles in the mediation of DNA recognition and the stability of FOX-DBD-DNA complexes [10]. Observed differences in the binding kinetics of K162A and S171A mutants for IRE vs DBE cannot be explained by different patterns of contacts. Crystal structures of FOXO1-DBD-DNA complexes show exactly the same interactions between this region and the backbone of both IRE and DBE elements [11]. Therefore, it seems that observed differences rather reflect distinct physico-chemical properties of studied DNA elements resulting from sequence variation.

It is well established that the highly flexible loop wing W2 located at the C-terminus of FOXO-DBD plays an important, although not fully understood, role in FOXO binding to the DNA. This region contains several sites of post-translational modifications whose modification or mutagenesis have been shown to cause a moderate reduction in the FOXO DNA-binding affinity [10,11,15,16]. In the structure of FOXO3-DBD-DNA complex, the wing W2 adopts a coiled structure and its basic residues make ionic contacts with the phosphate groups in the major groove without any base-specific contacts [10]. However, high values of B-factors reported for its residues suggest high flexibility of this region. In all three reported FOXO1-DBD-DNA structures the wing W2 is completely disordered and, thus, its interaction with DNA is unclear [11]. Its removal, however, severely reduced the FOXO1-DBD binding to the DNA. Our data show that the removal of this segment dramatically increases the dissociation rate of the encounter complex (rate constant  $k_{d1}$ , from Eq. (2)) for both IRE and DBE. In the case of binding to DBE, the C-terminally truncated FOXO4-DBD  $\Delta$ C exhibits also changed kinetics of the structural transition between the encounter complex and the final docked structure (described by rate constants  $k_{d2}$  and  $k_{d3}$ ). Thus, this region might also be involved in fine-tuning of DNA-binding specificity of FOXO proteins.

Taken together, our data show that when binding to the DNA, FOXO4-DBD undergoes a structural change connected with the significant loss of flexibility. The interaction between FOXO4-DBD and DNA is preferably described by using a conformational change binding model and not only the base-specific but also non-specific polar contacts to the phosphate groups of the DNA backbone from

various regions of DBD are an important factor contributing to both the DNA-binding affinity and specificity of FOXO proteins.

## Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Research Project MSM0021620857); Czech Science Foundation (Projects P305/11/0708 and P207/11/0717); and Academy of Sciences of the Czech Republic (Research Projects RVO: 67985823 and RVO: 61388971). We wish to thank P. Novotná from the Department of Physics and Measurements, Institute of Chemical Technology, Prague for measuring the CD spectra.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2013.09.002>.

## References

- [1] D.R. Cahnan, A. Brunet, The FoxO code, *Oncogene* 27 (2008) 2276–2288.
- [2] D. Weigel, H. Jackle, The fork head domain—a novel DNA-binding motif of eukaryotic transcription factors, *Cell* 63 (1990) 455–466.
- [3] K.L. Clark, E.D. Halay, E. Lai, S.K. Burley, Co crystal structure of the HNF 3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5, *Nature* 364 (1993) 412–420.
- [4] A.B. Georges, B.A. Benayoun, S. Caburet, K.A. Veira, Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from? *FASEB J.* 24 (2010) 346–356.
- [5] J. Gaudet, S.E. Mango, Regulation of organogenesis by the *Caenorhabditis elegans* FoxA protein PHA-4, *Science* 295 (2002) 821–825.
- [6] W.H. Biggs 3rd, J. Meisenhelder, T. Hunter, W.K. Cavenee, K.C. Arden, Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FOXO1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7421–7426.
- [7] S. Guo, G. Kena, S. Ochiy, X. He, P. Cohen, T. Untermyer, Phosphorylation of serine 236 by protein kinase B disrupts transactivation by FOXO and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17184–17192.
- [8] T. Furuyama, T. Nakazawa, I. Nakano, N. Mori, Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues, *Biochem. J.* 349 (2000) 629–634.
- [9] W.H. Biggs 3rd, W.K. Cavenee, K.C. Arden, Identification and characterization of members of the FOXO (FOXO) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse, *Mamm. Genome* 12 (2001) 416–425.
- [10] K.L. Tsai, Y.J. Sun, C.Y. Huang, J.Y. Yang, M.C. Hung, C.D. Hsiao, Crystal structure of the human FOXO3a-DBD-DNA complex suggests the effects of post-translational modification, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 6984–6994.
- [11] M.M. Brent, R. Anand, R. Marmorstein, Structural basis for DNA recognition by FOXO1 and its regulation by posttranslational modification, *Structure* 16 (2008) 1407–1416.
- [12] E. Boura, L. Rezacikova, J. Brynda, V. Otsilova, T. Otsil, Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 1351–1357.
- [13] J. Weigelt, I. Climent, K. Dahlmann-Wright, M. Wikstrom, Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor FOXO4, *Biochemistry* 40 (2001) 5861–5869.
- [14] F. Wang, C.B. Marshall, K. Yamamoto, G.Y. Li, M.J. Plevin, H. You, T.W. Mak, M. Ikura, Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53, *J. Mol. Biol.* 384 (2008) 590–603.
- [15] E. Boura, J. Silhan, P. Herrman, J. Vrcer, M. Sule, J. Tetsinger, V. Otsilova, T. Otsil, Both the N-terminal loop and Wing W2 of the forkhead domain of transcription factor FOXO4 are important for DNA binding, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 8265–8275.
- [16] H. Matsuzaki, H. Daitoku, M. Hata, H. Aoyama, K. Yoshimochi, A. Fukami, Acetylation of FOXO1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 11278–11283.
- [17] J. Silhan, P. Vacha, P. Strnadlova, J. Vrcer, P. Herrman, M. Sule, J. Tetsinger, V. Otsilova, T. Otsil, 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 19349–19360.
- [18] S. Pierrou, M. Helkqvist, L. Samuelsson, S. Enerback, P. Carlsson, Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending, *EMBO J.* 13 (1994) 5002–5012.
- [19] D.C. Overdier, A. Porcella, R.J. Costa, The DNA binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3-forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 2755–2766.
- [20] T. Shiyatova, X. Liao, The dissociation rate of a winged helix protein-DNA complex is influenced by non-DNA contact residues, *Arch. Biochem. Biophys.* 362 (1999) 356–362.
- [21] M.J. van Dongen, A. Cederberg, P. Carlsson, S. Enerback, M. Wikstrom, Solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the adipocyte-transcription factor FHEAC-11, *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 351–359.

- [22] G. Krauss, D. Riesner, G. Maass, Mechanism of discrimination between cognate and non-cognate tRNAs by phenylalanyl-tRNA synthetase from yeast, *Eur. J. Biochem.* 68 (1976) 81–93.
- [23] D. Riesner, A. Pingoud, D. Boehme, F. Peters, G. Maass, Distinct steps in the specific binding of tRNA to aminoacyl-tRNA synthetase. Temperature-jump studies on the serine-specific system from yeast and the tyrosine-specific system from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 68 (1976) 71–80.
- [24] C.A. Lipschultz, Y. Li, S. Smith-Gill, Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance, *Methods* 20 (2000) 310–318.
- [25] I. Rezábková, M. Kacířová, M. Šulc, P. Herman, J. Vecer, M. Štěpánek, V. Obsilová, T. Obsil, Structural modulation of phosducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding, *Biophys. J.* 103 (2012) 1960–1969.
- [26] J. Vecer, P. Herman, Maximum entropy analysis of analytically simulated complex fluorescence decays, *J. Fluoresc.* 21 (2011) 873–881.
- [27] D. Veisová, I. Rezábková, M. Štěpánek, P. Novotná, P. Herman, J. Vecer, T. Obsil, V. Obsilová, The C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms, *Biochemistry* 49 (2010) 3853–3861.
- [28] I. Marsden, Y. Chen, C. Jin, X. Liao, Evidence that the DNA binding specificity of winged helix proteins is mediated by a structural change in the amino acid sequence adjacent to the principal DNA binding helix, *Biochemistry* 36 (1997) 13248–13255.
- [29] I. Marsden, C. Jin, X. Liao, Structural changes in the region directly adjacent to the DNA binding helix highlight a possible mechanism to explain the observed changes in the sequence specific binding of winged helix proteins, *J. Mol. Biol.* 278 (1998) 293–299.

## 14-3-3 Protein Masks the DNA Binding Interface of Forkhead Transcription Factor FOXO4\*

Received for publication, April 3, 2009, and in revised form, May 1, 2009. Published, JBC Papers in Press, May 3, 2009, DOI: 10.1074/jbc.M109.027723

Jan Šilhán<sup>1</sup>, Petr Vacha<sup>1,9</sup>, Pavla Strnadová<sup>1</sup>, Jaroslav Vecer<sup>1</sup>, Petr Herman<sup>1</sup>, Miroslav Sulc<sup>1,10</sup>, Jan Teisinger<sup>9</sup>, Veronika Obsilová<sup>9</sup>, and Tomas Obsil<sup>1,9,11</sup>

From the Departments of <sup>1</sup>Physical and Macromolecular Chemistry and <sup>11</sup>Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, 12843 Prague, the Institutes of <sup>9</sup>Physiology and <sup>10</sup>Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 14220 Prague, and the <sup>1</sup>Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Charles University, 12116 Prague, Czech Republic

The role of 14-3-3 proteins in the regulation of FOXO forkhead transcription factors is at least 2-fold. First, the 14-3-3 binding inhibits the interaction between the FOXO and the target DNA. Second, the 14-3-3 proteins prevent nuclear reimport of FOXO factors by masking their nuclear localization signal. The exact mechanisms of these processes are still unclear, mainly due to the lack of structural data. In this work, we used fluorescence spectroscopy to investigate the mechanism of the 14-3-3 protein-dependent inhibition of FOXO4 DNA-binding properties. Time-resolved fluorescence measurements revealed that the 14-3-3 binding affects fluorescence properties of 5-((acetylamino)ethyl)amino naphthalene-1-sulfonic acid moiety attached at four sites within the forkhead domain of FOXO4 that represent important parts of the DNA binding interface. Observed changes in 5-((acetylamino)ethyl)amino naphthalene-1-sulfonic acid fluorescence strongly suggest physical contacts between the 14-3-3 protein and labeled parts of the FOXO4 DNA binding interface. The 14-3-3 protein binding, however, does not cause any dramatic conformational change of FOXO4 as documented by the results of tryptophan fluorescence experiments. To build a realistic model of the FOXO4-14-3-3 complex, we measured six distances between 14-3-3 and FOXO4 using Förster resonance energy transfer time-resolved fluorescence experiments. The model of the complex suggests that the forkhead domain of FOXO4 is docked within the central channel of the 14-3-3 protein dimer, consistent with our hypothesis that 14-3-3 masks the DNA binding interface of FOXO4.

or FOX (Forkhead box) domain. The FOX proteins display large functional diversity and play a wide range of roles in a number of physiological and pathological processes (1–3). Among the forkhead family, the FOXO class consists of four members (FOXO1, FOXO3, FOXO4, and FOXO6) that play a central role in cell cycle control, differentiation, metabolism control, stress response, and apoptosis (4–6). Transcriptional activity of FOXO proteins is regulated through the insulin-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT/protein kinase B (PKB) signaling pathway. The AKT/PKB-mediated phosphorylation triggers phosphorylation of additional sites by casein kinase-1 and dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A and induces FOXO binding to the 14-3-3 protein. This in turn both promotes the nuclear export of the resulting complex and inhibits the nuclear import of FOXO, probably by interfering with the function of its nuclear localization signal (NLS) (7–11). In addition to phosphorylation, the function of FOXO proteins is further controlled by other types of posttranslational modifications, including acetylation and ubiquitination (12, 13).

The AKT/PKB-dependent phosphorylation of FOXO proteins generates two 14-3-3 binding sites. First motif is located close to the N terminus of FOXO molecule and the second one at the C terminus of DBD (Fig. 1A). It has been shown that simultaneous use of both 14-3-3 binding motifs is necessary for optimal FOXO binding to the 14-3-3 proteins (7, 10, 14). These two motifs border the DBD, raising the possibility that the 14-3-3 proteins could participate in the disruption of FOXO binding to the DNA. Such 14-3-3 protein-dependent inhibition of DNA binding has been suggested for DAF-16 (*Caenorhabditis elegans* FOXO homologue) and FOXO4 (9, 14). However, the exact mechanism of this 14-3-3-dependent inhibition of FOXO binding to DNA is still unclear. Since the second AKT/PKB motif is embedded in the C-terminal part of DBD, also known as the wing W2, the 14-3-3 protein can interfere with the binding of this region to DNA, mask other parts of the FOXO DNA binding interface, or change the conformation of the forkhead domain core.

To better understand the mechanism of 14-3-3-dependent regulation of FOXO function, we investigated which regions of FOXO4 DBD, apart from the C-terminal phosphorylated motif, physically interact with 14-3-3 protein. We labeled four different sites within the FOXO4 DBD (N-terminal region, C-termi-

The forkhead family of transcription factors shares a highly conserved 100-amino acid large DNA-binding domain (DBD)<sup>2</sup>

\*This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic Grant 204/06/0565; Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic Grant IAAS01110801; Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic Research Projects MSM0021620857 and MSM0021620835 and Centre of Neurosciences LC554; and Academy of Sciences of the Czech Republic Research Project AVOZ50110509.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: Faculty of Science, Charles University, 12843 Prague, Czech Republic. Tel.: 420-221951303; Fax: 420-224919752; E-mail: obsil@natur.cuni.cz.

<sup>2</sup>The abbreviations used are: DBD, DNA-binding domain; 1,5-IAEDANS, 5-((1-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid; AEDANS, 5-((acetylamino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid; PKB, protein kinase B; dpFOXO4-(11–213), doubly phosphorylated FOXO4-(11–213); pFOXO4-(82–207), phosphorylated FOXO4-(82–207); FRET, Förster resonance energy transfer; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MALDI-

TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; NLS, nuclear localization signal; dsDNA, double-stranded DNA.

### 14-3-3 Interacts with DNA Binding Interface of FOXO4

nal wing W2, and both sides of helix H3) with the extrinsic fluorophore 1,5-IAEDANS and used methods of time-resolved fluorescence spectroscopy to study the interaction between FOXO4 and the 14-3-3 $\zeta$  protein. Our results suggest that the 14-3-3 $\zeta$  protein physically interacts with all four tested regions of DBD that represent important parts of its DNA binding interface. Such interactions probably mask the DNA binding interface, thus blocking the FOXO4 binding to the target DNA. The 14-3-3 $\zeta$  protein binding, however, does not cause any dramatic conformational change of FOXO4, as documented by the results of tryptophan fluorescence experiments. To build a realistic model of the FOXO4-14-3-3 $\zeta$  complex, we measured six distances between 14-3-3 $\zeta$  and FOXO4 using Förster resonance energy transfer (FRET) time-resolved fluorescence experiments. The model of the complex suggests that the fork-head domain of FOXO4 is docked within the central channel of the 14-3-3 protein dimer, consistent with our hypothesis that the 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of FOXO4.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Expression, Purification, and Phosphorylation of FOXO4**—All mutants of FOXO4 (sequences 11–213 and 82–207) were generated using the QuikChange kit (Stratagene). All mutations were confirmed by sequencing. Both wild type and all mutants of FOXO4-(11–213) and FOXO4-(82–207) were expressed, purified, and phosphorylated as described previously (11, 15). The completeness of the phosphorylation reaction was checked using MALDI-TOF mass spectrometry.

**Mass Spectrometric Analysis of FOXO4**—Samples were first separated by 12% SDS-PAGE, and excised protein bands were digested with trypsin endoprotease (Promega) directly in gel with cysteine modification by iodoacetamide (16). The resulting peptide mixtures were extracted and loaded on a MALDI-TOF target with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid as matrix, and positively/negatively charged spectra were acquired on a BIFLEX mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) with internal calibration using the monoisotopic  $[M + H]^+$ / $[M - H]^-$  ions of the FOXO4 peptides with known sequence, as described previously (11).

**Labeling of FOXO4<sub>11–213</sub> and FOXO4<sub>82–207</sub> Mutants by 1,5-IAEDANS**—Covalent modification of FOXO4-(11–213) and FOXO4-(82–207) containing a single cysteine residue with the thiol-reactive probe 1,5-IAEDANS was carried out as described elsewhere (15, 17). Briefly, the protein (50–70  $\mu$ M) in 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (v/w) glycerol, and label were mixed at a molar ratio of 1:40 and incubated at 30 °C for 2 h and then at 4 °C overnight in the dark. The free unreacted label was removed by size exclusion chromatography on a Superdex 75 10/300 GL column in a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 10% (v/w) glycerol. The incorporation stoichiometry was determined by comparing the peak protein absorbance at 280 nm with the absorbance of bound AEDANS measured at 336 nm using the extinction coefficient of 5,700 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

**Expression and Purification of 14-3-3 Protein**—Human 14-3-3 protein ( $\zeta$ -isoform) was expressed and purified as described previously (18).

**Labeling of 14-3-3 Protein Mutants by 5-IAF**—To prepare the 14-3-3 protein suitable for FRET measurements, we constructed two mutants containing a single cysteine residue (either at position 25 or 189) of human monomeric 14-3-3 $\zeta$  protein (mutant S58D) (19). The protein (40  $\mu$ M) in 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and label 5-iodoacetamidofluorescein (Invitrogen) were mixed at a molar ratio of 1:40 and incubated at room temperature for 8 h and then at 4 °C overnight in the dark. The free unreacted label was removed by dialysis and size exclusion chromatography. The incorporation stoichiometry was determined by the absorbance at 492 nm using an extinction coefficient of 78,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Molecular Probes). The stoichiometry of fluorescein incorporation/mol of protein was found to be 99–100%.

**DNA-binding Studies**—Steady-state fluorescence measurements were performed on a PerkinElmer Life Sciences LS50B fluorescence spectrometer at 17 °C in a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA with 100 nM double-stranded DNA (dsDNA) labeled with fluorescein at the 5' terminus of one strand. The following oligonucleotides containing the consensus FOXO binding sequence were used to prepare the samples of dsDNA: 5'-fluorescein-GCGTTTGTTTACGC-3' and 5'-GCGTAAACAACGC-3' (15). Increasing amounts of the protein were titrated into the cuvette. At each FOXO4-(11–213) concentration, the steady-state fluorescence anisotropy of fluorescein was recorded (excitation at 494 nm and emission at 520 nm). Anisotropy was calculated from the fluorescence intensities according to the relationship,  $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$ . The fraction of the DNA bound ( $F_B$ ) was calculated from the formula,

$$F_B = (r_{\text{obs}} - r_{\text{min}}) / [(r_{\text{max}} - r_{\text{obs}})Q + (r_{\text{obs}} - r_{\text{min}})] \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $Q$  represents the quantum yield ratio of the bound to the free form, and it was estimated by the ratio of the intensities of the bound to the free fluorophore. Parameter  $r_{\text{max}}$  is the anisotropy at saturation,  $r_{\text{obs}}$  is the observed anisotropy for any FOXO4-(11–213) concentration, and  $r_{\text{min}}$  is the minimum observed anisotropy of the free DNA.  $F_B$  was plotted against the FOXO4-(11–213) protein concentration and fitted using Equation 2 (20) to determine  $K_D$  for the FOXO4-(11–213)-dsDNA complex formation,

$$F_B = \frac{K_D + [P_1] + [P_2] - \sqrt{(K_D + [P_1] + [P_2])^2 - 4[P_1][P_2]}}{2[P_1]} \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $K_D$  is the equilibrium dissociation constant,  $[P_1]$  is the dsDNA-fluorescein concentration, and  $[P_2]$  is the FOXO4-(11–213) concentration. Nonlinear data fitting was performed using the Origin version 6.0 package (Microcal Software Inc.).

**14-3-3 Protein Binding Studies**—Steady-state fluorescence measurements were performed with 0.5  $\mu$ M FOXO4-(11–213) labeled with 1,5-IAEDANS in a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA. Increasing amounts of the 14-3-3 $\zeta$  protein were titrated into the cuvette. At each 14-3-3 $\zeta$  concentration, the steady-state fluorescence anisotropy of AEDANS was measured (excitation at 336 nm and

emission at 490 nm). Data were analyzed as described above in the case of the DNA-binding studies.

**Time-resolved Fluorescence Measurements**—Fluorescence intensity and anisotropy decays were measured on a time-correlated single photon counting apparatus, as described previously (17, 21). The fluorescence decays have been acquired under the “magic angle” conditions when the measured intensity decay,  $I(t)$ , is independent of the rotational diffusion of the chromophore and provides unbiased information about lifetimes. The apparatus response function was measured with a diluted Ludox (colloidal silica) solution. Samples were placed in a thermostatic holder, and all experiments were performed at 22 °C in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA. The FOXO4-(11–213) concentration was 15  $\mu$ M; the 14-3-3 protein concentration was 30  $\mu$ M. Dansyl fluorescence was excited at 315 nm by an actively mode-locked picosecond dye laser (Spectra Physics). Fluorescence was collected at 480 nm using a monochromator with a 400 nm cut-off filter placed in front of its input slit. Tryptophan emission was excited at 297 nm by a pulsed UV-LED with a 500-ps pulse width (PLS 295-10; PicoQuant). Tryptophan emission was collected at 355 nm through a monochromator complemented by a UG1 glass filter (Zeiss) in front of the input slit. The fluorescence decays were processed as described previously (17, 21), using the singular value decomposition maximum entropy method (22).

Fluorescence was assumed to decay multiexponentially according to the formula,

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Eq. 3})$$

where  $\tau_i$  and  $\alpha_i$  are the fluorescence lifetimes and the corresponding amplitudes, respectively.  $I(t)$  was analyzed by the singular value decomposition maximum entropy method coded according to Bryan (22). The program yields a set of amplitudes  $\alpha_i$  that represents the lifetime distribution in the decay. We have chosen 100 lifetimes covering the range from 20 ps to 20 ns. The lifetimes were equidistantly spaced in the logarithmic scale. Not having prior information about the number of lifetime classes (peaks) in the lifetime distribution and about the distribution shape, the data analysis started from the flat initial guess, where all lifetimes have the same prior probability. The mean lifetime  $\bar{\tau}$  was calculated as follows,

$$\bar{\tau} = \sum_i f_i \tau_i \quad (\text{Eq. 4})$$

where  $f_i$  represents the fractional intensity of the  $i$ th lifetime component.

$$f_i = \alpha_i \tau_i / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (\text{Eq. 5})$$

The fluorescence anisotropy decays,  $r(t)$ , were obtained from the parallel  $I_{\parallel}(t)$  and perpendicular  $I_{\perp}(t)$  decay components. Data were analyzed by a method similar to the one published by Brochon (23), using a program developed at the Institute of Physics, Charles University (Prague, Czech Republic). We used a model-independent singular value decomposition maximum

entropy method approach that does not set prior limits on the shape of the distribution. The anisotropies were analyzed for a series of exponentials,

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Eq. 6})$$

where the amplitudes  $\beta_i$  represent the distribution of the correlation times  $\tau_i$ .  $\beta_i$  values are related to the initial anisotropy  $r_0$  by the formula,

$$\sum_i \beta_i = r_0 \quad (\text{Eq. 7})$$

We used 100 correlation times  $\tau_i$  equidistantly spaced in the logarithmic scale and ranging from 100 ps to 500 ns.

**Fluorescence Quenching**—AEDANS fluorescence was quenched by acrylamide. The fluorescence decays were collected at 480 nm in the presence of different quencher concentrations  $[Q]$ . The time-resolved quenching data were analyzed by the Stern-Volmer equation,

$$\tau_0/\bar{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \bar{\tau}_0 \cdot [Q] \quad (\text{Eq. 8})$$

where  $\bar{\tau}_0$  and  $\bar{\tau}$  represent the mean fluorescence lifetime in the absence and in the presence of acrylamide, respectively.  $K_{SV}$  and  $k_q$  represent the phenomenological Stern-Volmer constant and the bimolecular quenching constant that reflects the collisional quenching efficiency of AEDANS by the quencher, respectively.

**Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis**—The average efficiency of fluorescence energy transfer  $E$  was calculated from the mean donor (AEDANS) lifetime in the presence ( $\tau_{DA}$ ) and absence of the acceptor ( $\tau_D$ ),

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{Eq. 9})$$

The average distance between the donor-acceptor pair  $R$  was calculated from Equation 10,

$$R = R_0 \sqrt{E^{-1} - 1} \quad (\text{Eq. 10})$$

where  $R_0$  is the Förster critical distance.  $R_0$  is given by Ref. 24,

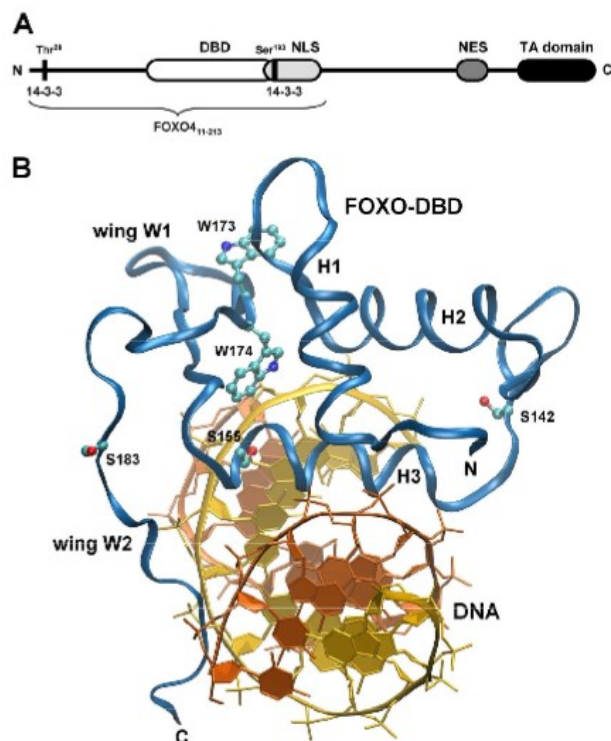
$$R_0 = (8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \text{ \AA} \quad (\text{Eq. 11})$$

where  $n$  is the refractive index of the medium,  $Q_D$  is the emission quantum yield of the donor in the absence of the acceptor, and  $\kappa^2$  is the orientation factor. The spectral overlap integral  $J(\lambda)$  of donor fluorescence and acceptor absorption was calculated from Equation 12 (24),

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1} \quad (\text{Eq. 12})$$

where  $F_D(\lambda)$  and  $\epsilon_a(\lambda)$  represent the fluorescence intensity of the donor and the molar extinction coefficient of the acceptor, respectively, at the wavelength  $\lambda$  expressed in cm. The orientation factor  $\kappa^2$  was assumed to be equal to  $2/3$ , which corresponds to randomly oriented dipole moments of the donor-acceptor pairs. The value of 1.31 was used for the refractive index of the aqueous solution. The quantum yields of the donor, which is

### 14-3-3 Interacts with DNA Binding Interface of FOXO4



**FIGURE 1. Structure of the FOXO4 transcription factor.** *A*, schematic representation of primary structure of FOXO4 protein. *TA domain*, transactivation domain; *NES*, nuclear export sequence. *Black vertical bars* denote locations of 14-3-3 protein binding sites. *B*, locations of AEDANS attachment sites (serines that were replaced by cysteines) and tryptophan residues within the structure of FOXO DBD. The serine residue at position 92 is missing. The crystal structure of the FOXO3a DBD-DNA complex was used to create this figure (27). Residues are numbered according to FOXO4 sequence.

the AEDANS moiety attached at three different positions within the pFOXO4-(82–207) molecule, were calculated relative to the  $Q_D$  value of quinine sulfate in 0.1 M  $H_2SO_4$  (25).

#### RESULTS

**Preparation and Characterization of Single-Cys Mutants of FOXO4**—The main goal of this work was to characterize interactions between the 14-3-3 protein and the forkhead domain of transcription factor FOXO4 and, above all, to answer the question of how the 14-3-3 protein inhibits FOXO4 binding to the target DNA. The AKT/PKB-induced phosphorylation of FOXO factors, followed by their association with the 14-3-3 proteins, takes place in the nucleus. This interaction in turn inhibits the FOXO binding to DNA and promotes nuclear export of the resulting complex (7–11). Since the 14-3-3 protein binding motifs border the DBD, it is reasonable to speculate that the 14-3-3 protein can either sterically block the DNA

binding interface or change its structure. To test the former possibility, we prepared four mutants of FOXO4-(11–213) (human FOXO4, sequence 11–213) suitable for site-specific labeling of DBD with thiol-specific fluorescence dye. The sequence of FOXO4-(11–213) covers the N-terminal half of the FOXO4 protein and contains the DBD flanked by two AKT/PKB phosphorylation/14-3-3 protein binding sites and NLS (Fig. 1A) (11, 14).

The amino acid sequence of FOXO4-(11–213) contains only one cysteine residue at position 27. To specifically label the selected sites within the FOXO4 DBD with a fluorescence probe, we mutated Cys<sup>27</sup> to Ala and introduced new Cys residues at four different positions within the DBD. The sequence of DBD does not contain any cysteine residue; thus, serines located at four different positions were replaced with cysteines (Cys<sup>32</sup>, Cys<sup>142</sup>, Cys<sup>155</sup>, and Cys<sup>183</sup>) (Fig. 1B). Next, the fluorescence anisotropy-based binding assay was used to check the DNA-binding affinity of FOXO4-(11–213) single-Cys mutants. These experiments showed that FOXO4-(11–213) single-Cys mutants bind dsDNA, containing consensus FOXO binding sequence, with  $K_D$  ranging from 28 to 42 nM (Fig. 2A). This is fully comparable with the DNA-binding affinity of FOXO4-(11–213) wild type, which binds DNA with a  $K_D$  value of 34 ± 6 nM.

The single-Cys mutants of FOXO4-(11–213) were then labeled with the extrinsic fluorophore 1,5-IAEDANS, and the stoichiometry of AEDANS incorporation/mol of the protein was found to be 96–100%. The AEDANS-labeled mutants of FOXO4-(11–213) were phosphorylated using AKT/PKB, which is known to stoichiometrically phosphorylate FOXO4-(11–213) *in vitro* at two sites, Thr<sup>28</sup> and Ser<sup>193</sup> (11, 14). Both the modification by AEDANS and the completeness of phosphorylation were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. The comparison of the mass spectra of digested sample with theoretically generated tryptic peptides clearly demonstrated the presence of two phosphorylated peptides having a protonated mass of 3163.4 ( $m/z$ ), corresponding to the phosphorylated peptide SAPTWPLRPELANQPSEPPEVEPDI.GEK, and 1345.6 ( $m/z$ ), matched to the phosphorylated peptide AAPSMIDSSSKLLR (where pS and pT denote phosphorylated serine and threonine residues, respectively). The tandem mass spectrometry fragmentation in postsource decay

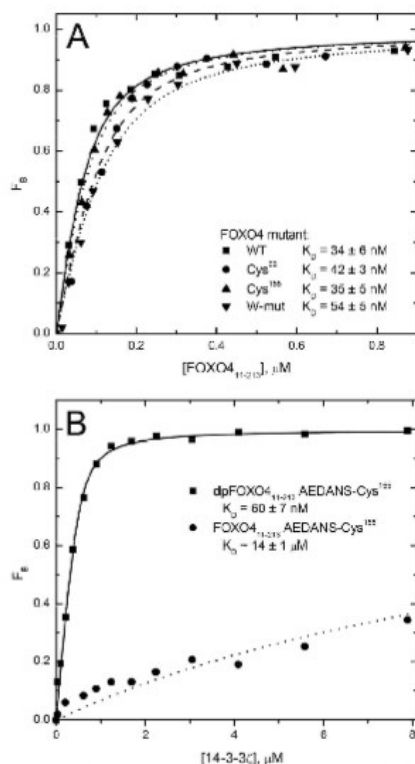


FIGURE 2. Binding properties of selected mutants of FOXO4(11-213). **A**, examples of fluorescence anisotropy DNA-binding assays performed using a dsDNA probe labeled at the 5'-end of one strand with fluorescein. Binding isotherms of wild-type FOXO4(11-213) (WT), FOXO4(11-213) S92C mutant (Cys<sup>122</sup>), FOXO4(11-213) S155C mutant (Cys<sup>155</sup>), and FOXO4(11-213)W-mutant are shown. **B**, examples of 14-3-3 protein-binding isotherms for AEDANS-labeled phosphorylated dpFOXO4(11-213)-Cys<sup>122</sup> and unphosphorylated FOXO4(11-213)-Cys<sup>155</sup>.

experiment confirmed the structure and phosphorylated amino acid of these peptides. The negative MALDI-TOF mass spectra of digested samples were also used to corroborate an AEDANS moiety at the cysteine residue of all single cysteine constructs. As one example of these results, the signal at 1983.9 (*m/z*) of the modified peptide SSWWMLNPEGGKC\*GK by AEDANS was observed (where C\* denotes a modified cysteine residue). On the other hand, the nonphosphorylated or unmodified protein mass spectra provided no peaks with the same values of *m/z* there; only the signals corresponding to the nonphosphorylated or unmodified peptides were detected (data not shown).

A fluorescence anisotropy-based binding assay was used to check the binding of the 14-3-3 $\zeta$  protein to the AEDANS-la-

beled phosphorylated mutants of FOXO4(11-213) (Fig. 2B). These experiments confirmed that the replacement of serines with cysteines and subsequent modification by 1,5-IAEDANS do not affect the FOXO4(11-213) interaction with the 14-3-3 $\zeta$  protein. The analysis of the binding curves yielded dissociation constants ranging from 60 to 120 nM (considering the FOXO4(11-213)-14-3-3 complex with the 1:2 molar stoichiometry) (11, 14).

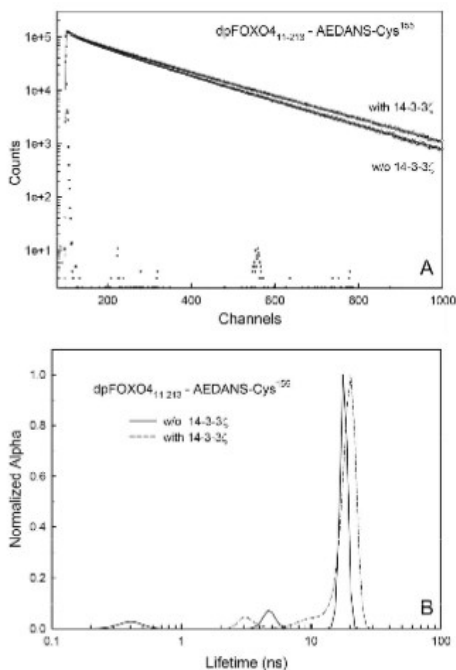
**Time-resolved Fluorescence Intensity Decay Measurements**—One possible mechanism of the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the FOXO binding to the target DNA is the steric occlusion of the DNA binding interface by the 14-3-3 protein. To map the interaction of FOXO4 DBD with the 14-3-3 $\zeta$  protein, time-resolved fluorescence intensity and anisotropy decay measurements of all four AEDANS-Cys mutants of FOXO4(11-213) were performed.

Since AEDANS is an environmentally sensitive fluorophore that changes the fluorescence lifetime according to its local interactions, a variation of the mean excited state lifetime,  $\bar{\tau}$ , sensitively reflects changes in polarity around the AEDANS moiety induced by the binding of the 14-3-3 $\zeta$  protein. We have found that all AEDANS-labeled FOXO4(11-213) mutants exhibited complex emission decays with multimodal lifetime distributions (e.g. see Fig. 3). The results of the emission decay analysis for all mutants are summarized in Table 1. It is seen that although AKT/PKB-induced phosphorylation itself has only a marginal effect on  $\bar{\tau}$ , the mean lifetime of all phosphorylated dpFOXO4(11-213) mutants significantly increases upon the binding of the 14-3-3 $\zeta$  protein. Since we did not record any changes in  $\bar{\tau}$  for unphosphorylated FOXO4(11-213) mutants, where binding of 14-3-3 $\zeta$  is weak, we suggest that the observed increase in  $\bar{\tau}$  reflects a binding-induced decrease in polarity around the AEDANS moieties. AEDANS is an extrinsic fluorophore covalently attached to a single cysteine residue that in different mutants samples different places of the DBD. Cysteines Cys<sup>122</sup> and Cys<sup>155</sup> are located within the N-terminal and the C-terminal flexible loops, respectively, whereas Cys<sup>143</sup> and Cys<sup>158</sup> border the main DNA recognition helix H3 (Fig. 1B) (26, 27). Considering these locations and the size and the charge of AEDANS moiety, it is unlikely that the probe in any of the studied mutants would be deeply buried in the protein structure. Therefore, the observed lifetime/polarity changes are the effect of the steric shielding of the fluorophore caused by 14-3-3 $\zeta$  binding rather than the result of binding-induced conformational change of the dpFOXO4(11-213) protein.

**Time-resolved Fluorescence Anisotropy Decay Measurements**—Since polarized time-resolved emission measurements carry a wealth of information about fluorophore movements (24), we used them to examine the effect of 14-3-3 $\zeta$  binding on segmental dynamics of the AEDANS-labeled FOXO4(11-213) mutants. It is easy to envision that proximity of AEDANS and 14-3-3 $\zeta$  should restrict AEDANS mobility upon the binding of 14-3-3 $\zeta$  to FOXO4(11-213). The extent of the fast mobility decrease should depend both on the level of the steric hindrance and the initial rotational freedom of the AEDANS moiety.

Results of the fluorescence anisotropy measurements are summarized in Table 2 and in Figs. 4–6. First, we examined the

### 14-3-3 Interacts with DNA Binding Interface of FOXO4



**FIGURE 3. Example of time-resolved fluorescence of AEDANS-labeled FOXO4(11-213).** A, fluorescence intensity decay of dpFOXO4(11-213) labeled with AEDANS at Cys<sup>155</sup>. B, excited state lifetime distribution of dpFOXO4(11-213) labeled with AEDANS at Cys<sup>155</sup>. Solid and dashed lines represent the distribution in the absence and in the presence of phosphorylated 14-3-3 $\zeta$ , respectively.

**TABLE 1**  
Mean excited state lifetimes of AEDANS-labeled single-Cys mutants of FOXO4(11-213)

Single-Cys mutant	Mean excited state lifetime $\tau^{ex}$			
	FOXO4-(11-213)	FOXO4-(11-213) + 14-3-3 $\zeta$	dpFOXO4-(11-213)	dpFOXO4-(11-213) + 14-3-3 $\zeta$
AEDANS-Cys <sup>92</sup>	15.7	15.9	15.8	17.6
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	15.8	16.0	15.9	17.2
AEDANS-Cys <sup>155</sup>	17.3	17.4	17.5	18.7
AEDANS-Cys <sup>183</sup>	15.4	15.6	15.4	16.8

\* S.D. value is  $\pm 0.1$  ns.

effect of the AKT/PKB-induced phosphorylation itself on the anisotropy decays. We found that double phosphorylation at Thr<sup>26</sup> and Ser<sup>153</sup> does not affect AEDANS movement for any of the FOXO4(11-213) single-Cys mutants. The fluorescence anisotropy decays of the phosphorylated and the unphosphorylated forms were identical within the experimental accuracy (e.g. see Fig. 4A). Fig. 4B demonstrates changes in the raw fluorescence anisotropy decays of the FOXO4(11-213)-Cys<sup>155</sup> mutant resulting from the interaction with 14-3-3 $\zeta$ . Visual

inspection of Fig. 4B reveals that although binding of 14-3-3 $\zeta$  to the phosphorylated dpFOXO4(11-213) results in a highly significant change of the decay data, weak interaction with unphosphorylated FOXO4(11-213) causes only minor decay changes. This data pattern was found to be the same for all examined mutants (Fig. 5). Fig. 5, A-C, represents a graphic summary of data analysis results. The curves represent the best fits, and experimental points are omitted for clarity. It is clearly seen that the 14-3-3 $\zeta$  binding to any of the dpFOXO4(11-213) mutants changes the mode of AEDANS motion, which results in a significant fluorescence anisotropy increase. Only minor changes can be registered for the unphosphorylated mutants that were used for control (Fig. 4C). Interestingly, both in the presence and in the absence of 14-3-3 $\zeta$ , the FOXO4(11-213)-Cys<sup>92</sup> and -Cys<sup>183</sup> mutants exhibit highly similar rotational freedom of AEDANS that can be deduced from the overlapping anisotropy curves. As expected, in these DBD-bordering mutants, the motional freedom of the fluorophore is higher (anisotropy is lower) than for Cys<sup>142</sup> and Cys<sup>155</sup> with the AEDANS moiety located in the more rigid DBD structure.

Quantitative singular value decomposition maximum entropy method data analysis yielded the complex anisotropy decays with multimodal correlation time distributions (Table 2 and Fig. 6). Due to the complex AEDANS motion, it is difficult to interpret the detailed meaning of each anisotropy decay component. However, it seems safe to assign the longest correlation time to the slow overall rotation of the labeled protein and shorter components to fast depolarization caused by AEDANS wobbling combined with slower segmental and domain motions. Table 2 reveals that the longest correlation time of about 20 ns, representing rotation of the FOXO4(11-213) molecule, increases more than 3 times upon binding of the 14-3-3 $\zeta$  dimer. Since, for globular proteins, this correlation time scales linearly with the protein volume (24), this change adequately reflects the increase in the molecular mass caused by dpFOXO4(11-213)-14-3-3 $\zeta$  complex formation.

Information about the fast AEDANS dynamics is contained in the amplitudes associated with the short correlation times. For AEDANS completely immobilized within the protein structure, the sum  $\beta_{fast}$  of these amplitudes (i.e.  $\beta_{fast} = \beta_1 + \beta_2$ , and  $\beta_{fast} = \beta_1 + \beta_3 + \beta_5$  for dpFOXO4(11-213) and the dpFOXO4(11-213)-14-3-3 $\zeta$  complex, respectively) should be close to zero. The higher the protein flexibility and the motional freedom of the fluorophore, the higher should be  $\beta_{fast}$ . The values of  $\beta_{fast}$  (Table 2) confirm that the AEDANS motional freedom is larger for the Cys<sup>92</sup> and Cys<sup>183</sup> mutants than for the Cys<sup>142</sup> and Cys<sup>155</sup> ones. From the last column of Table 2, it is seen that for all mutants,  $\beta_{fast}$  decreases upon the formation of the dpFOXO4(11-213)-14-3-3 $\zeta$  complex. Although in the case of more dynamic AEDANS attached to the Cys<sup>92</sup> and Cys<sup>183</sup> residues, the decrease in the fluorophore motional freedom was found to be highly significant, in the case of less movable AEDANS attached to the Cys<sup>142</sup> and Cys<sup>155</sup> residues, the decrease seems to be insignificant. These differences probably reflect different flexibility of the labeled regions, where the unstructured loop N and C termini are more flexible, compared with the region containing the helix H3 (26, 27). Moreover, for all mutants, the correlation time distributions became

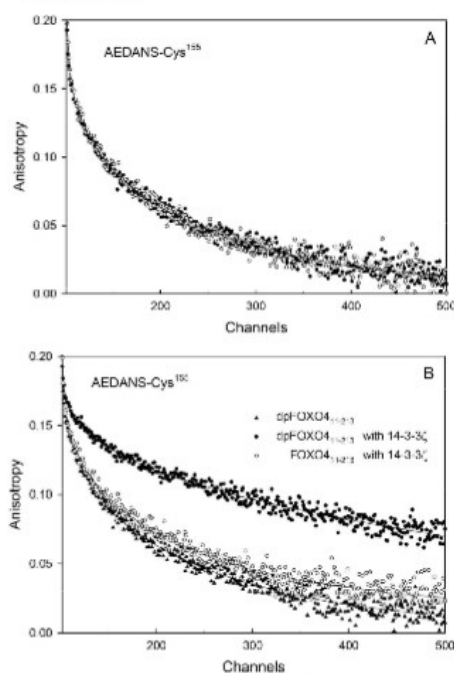
Downloaded from www.jbc.org by guest on January 2, 2013



**TABLE 2**  
Anisotropy decay parameters of AEDANS-labeled single-Cys mutants of FOXO4-(11-213)

Single-Cys mutant	dpFOXO4-(11-213)									
	$\beta_1$	$\phi_1$	$\beta_2$	$\phi_2$	$\beta_3$	$\phi_3$	$\beta_4$	$\phi_4$	$\beta_1 + \beta_4^a$	
AEDANS-Cys <sup>92</sup>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	0.070	0.7	0.075	5.2	0.046	24			0.145	
AEDANS-Cys <sup>155</sup>	0.024	0.3	0.067	2.8	0.099	19			0.091	
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	0.033	0.3	0.045	2.7	0.112	18			0.078	
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	0.071	0.7	0.074	4.9	0.046	23			0.145	
Single-Cys mutant	dpFOXO4-(11-213) + 14-3-3 $\zeta$									
	$\beta_1$	$\phi_1$	$\beta_2$	$\phi_2$	$\beta_3$	$\phi_3$	$\beta_4$	$\phi_4$	$\beta_1 + \beta_2 + \beta_4^a$	
AEDANS-Cys <sup>92</sup>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>		
AEDANS-Cys <sup>142</sup>	0.021	0.4	0.047	0.9	0.058	7.6	0.085	80	0.105	
AEDANS-Cys <sup>155</sup>	0.018	0.3	0.020	2.1	0.024	8.2	0.128	67	0.062	
AEDANS-Cys <sup>142</sup>			0.053	1.6	0.053	8.3	0.084	77	0.106	

<sup>a</sup> S.D. value is  $\pm 0.005$ .



**FIGURE 4.** Fluorescence anisotropy decays of AEDANS attached to FOXO4-(11-213)-Cys<sup>155</sup> mutant. *A*, effect of phosphorylation. *B*, effect of 14-3-3 $\zeta$  binding. Closed and open symbols represent phosphorylated and unphosphorylated FOXO4-(11-213), respectively. The solid lines represent the best fit.

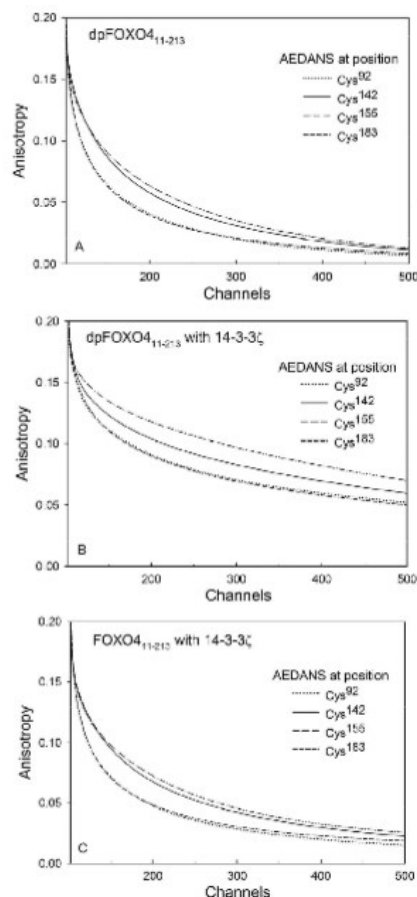
significantly narrower in the presence of 14-3-3 $\zeta$  (data not shown). In conclusion, fluorescence anisotropy experiments strongly indicate that the interaction of dpFOXO4-(11-213) with 14-3-3 $\zeta$  causes the restriction of the AEDANS motion, especially in flexible regions containing residues Cys<sup>92</sup> and Cys<sup>142</sup> (N-terminal region and C-terminal wing W2). These

effects are probably caused by the combination of the steric hindrance and the binding-induced decrease of the protein segmental mobility.

**AEDANS Fluorescence Quenching**—Since fluorescence anisotropy experiments revealed an insignificant effect of 14-3-3 $\zeta$  binding on the rotational freedom of AEDANS attached to the Cys<sup>142</sup> and Cys<sup>155</sup> residues (Table 2), we decided to perform acrylamide quenching experiments with these two mutants to further support the conclusions drawn from the fluorescence lifetime data. The suggested steric shielding caused by the 14-3-3 $\zeta$  binding should change the accessibility of AEDANS to the solute quencher. In order to examine a dynamic, diffusion-controlled, contribution, we employed the time-resolved approach that eliminates possible static effects caused by formation of nonfluorescent ground state AEDANS-acrylamide complexes. Results of the quenching experiments are shown in Fig. 7. It is seen that all Stern-Volmer plots exhibit a downward curvature. The observed departure from linearity should not be surprising for fluorophores with multiple lifetime components (28), although the existence of some conformational heterogeneity of the protein in solution cannot be ruled out. From Fig. 7 it is also seen that acrylamide quenching in the presence of 14-3-3 $\zeta$  is less efficient. To examine more rigorously the binding-induced changes, we extracted the bimolecular quenching constants  $k_q$  from slopes of the Stern-Volmer plots at low acrylamide concentrations (Fig. 7, dashed lines). Data analysis according to Equation 8 revealed that for the FOXO4-(11-213)-Cys<sup>155</sup> mutant,  $k_q$  decreased almost twice from  $1.24 \times 10^8$  to  $6.52 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  upon the 14-3-3 $\zeta$  binding. A similar significant decrease was observed for FOXO4-(11-213)-Cys<sup>142</sup>, where  $k_q$  decreased from  $1.88 \times 10^8$  to  $1.24 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . In accord with the fluorescence lifetime data, the quenching experiments indicate for both mutants much lower accessibility of the AEDANS moiety in the presence of 14-3-3 $\zeta$ , thus supporting the steric shielding model.

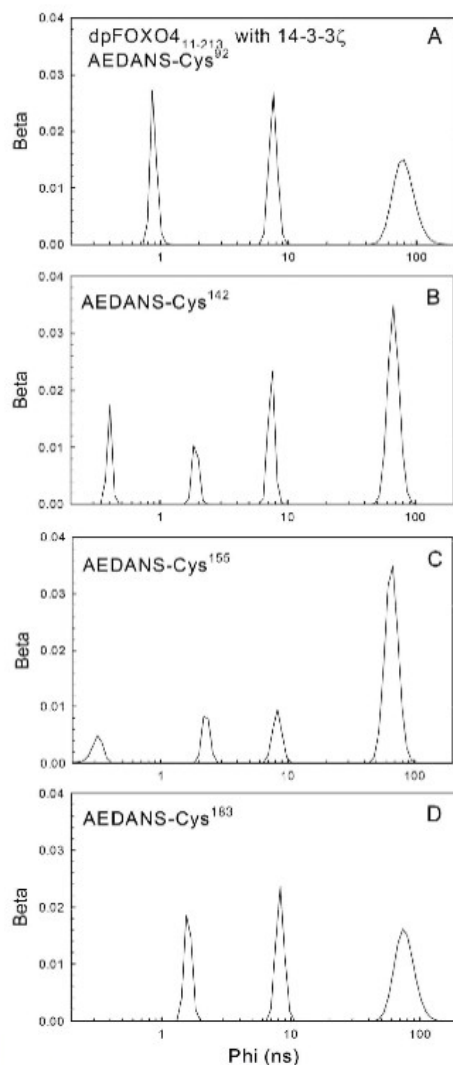
**Preparation and Characterization of Tryptophan Mutants of FOXO4**—The 14-3-3 proteins are known to affect the conformation of their binding partners (29, 30). Therefore, the second hypothesis we tested was whether the 14-3-3 binding changes the structure of FOXO4DBD. To investigate this possibility, we prepared a mutant of FOXO4-(11-213) containing only two

### 14-3-3 Interacts with DNA Binding Interface of FOXO4



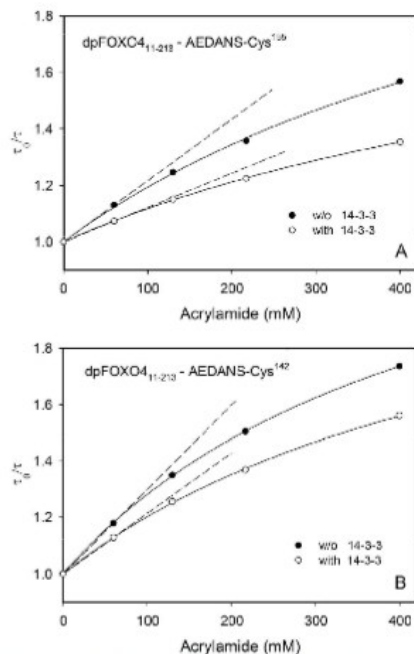
**FIGURE 5. Fluorescence anisotropy decays of AEDANS attached to different single-Cys FOXO4(11-213) mutants.** Shown are phosphorylated dpFOXO4(11-213) mutants in the absence (A) and in the presence (B) of 14-3-3 $\zeta$ . Binding of 14-3-3 $\zeta$  to unphosphorylated FOXO4(11-213) is shown for comparison (C). Experimental points are omitted for clarity; lines represent the best fit of the experimental data.

tryptophan residues (Trp<sup>173</sup> and Trp<sup>174</sup>) within the forkhead domain (denoted as FOXO4(11-213)W-mutant) (Fig. 1). All other tryptophans (Trp<sup>39</sup>, Trp<sup>97</sup>, Trp<sup>126</sup>, and Trp<sup>186</sup>) were mutated to phenylalanines. Residues Trp<sup>173</sup> and Trp<sup>174</sup> are completely conserved and cannot be mutated without a significant loss of the FOXO4 DNA-binding affinity (data not shown). They are both located at the C terminus of  $\beta$ -strand S3; residue Trp<sup>174</sup>, which participates in the DNA binding, interacts with Leu<sup>154</sup> from the main DNA recognition helix H3, whereas residue Trp<sup>173</sup> is oriented in the opposite direction



**FIGURE 6. Rotation correlation time distributions of AEDANS attached to dpFOXO4(11-213) mutants.** Shown is dpFOXO4(11-213) labeled with AEDANS at Cys<sup>92</sup> (A), at Cys<sup>142</sup> (B), at Cys<sup>155</sup> (C), and at Cys<sup>183</sup> (D).

toward the loop between helices H1 and H2 (Fig. 1B). Considering this location, we decided to use the intrinsic fluorescence of these two tryptophans to probe structural changes within the DNA binding interface of FOXO4-DBD.



**FIGURE 7. Time-resolved acrylamide quenching of AEDANS fluorescence.** A, dpFOXO4-(11–213) labeled with AEDANS at Cys<sup>10b</sup>. B, dpFOXO4-(11–213) labeled with AEDANS at Cys<sup>142</sup>. Solid and open circles denote dpFOXO4-(11–213) in the absence and in the presence of phosphorylated 14-3-3 $\zeta$ , respectively.

Circular dichroism measurements were used to check the secondary structure of FOXO4-(11–213)W-mutant, and no significant changes compared with FOXO4-(11–213) wild type were found (data not shown). The steady-state fluorescence anisotropy-based DNA-binding assay showed that FOXO4-(11–213)W-mutant binds DNA containing the consensus FOXO binding sequence with a  $K_D$  value of  $54 \pm 5$  nM. This is fully comparable with the DNA-binding affinity of FOXO4-(11–213) wild type (Fig. 2A).

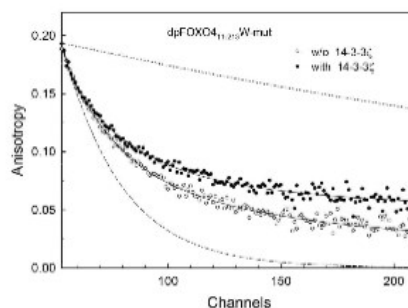
**14-3-3 Protein Binding Does Not Affect the Structure of FOXO4-DBD in the Region of Trp<sup>173</sup> and Trp<sup>174</sup>**—Time-resolved measurements of the tryptophan fluorescence decays revealed that neither the phosphorylation by AKT/PKB nor the binding of 14-3-3 $\zeta$  protein change the mean fluorescence lifetime ( $\tau$ ) of FOXO4-(11–213)W-mutant (Table 3). This indicates that neither direct interaction of the 14-3-3 protein with the tryptophan residues nor significant binding-induced conformational change of DBD that would affect the tryptophan microenvironment takes place. Similar results were observed also for mutants containing only one AKT/PKB phosphorylation site (data not shown).

**TABLE 3**  
Summary of tryptophan fluorescence anisotropy measurements

Sample	$\tau$ <sup>a</sup>	$\beta_1$ <sup>a</sup>	$\phi_1$	$\beta_2$	$\phi_2$
FOXO4-(11–213)W-mutant	4.9	0.12	2.4	0.07	1.8
dpFOXO4-(11–213)W-mutant	4.9	0.12	2.5	0.07	20
dpFOXO4-(11–213)W-mutant + 14-3-3	4.9	0.11	2.6	0.08	>45

<sup>a</sup> S.D. value is  $\pm 0.1$  ns.

<sup>b</sup> S.D. value is  $\pm 0.007$ .



**FIGURE 8. Time-resolved tryptophan fluorescence anisotropy (Trp<sup>173</sup> and Trp<sup>174</sup>) decays.** Shown are fluorescence anisotropy decays of dpFOXO4-(11–213)W-mutant in the presence (closed circles) and in the absence (open circles) of 14-3-3 $\zeta$ .

All tryptophan emission anisotropy decays were well fitted by the bimodal lifetime distribution. Consistently with the AEDANS experiments, the interaction of FOXO4-(11–213)W-mutant with the 14-3-3 $\zeta$  protein is reflected by the increase of the longest rotational correlation time  $\phi_2$  (Table 3). The interaction is clearly seen in Fig. 8, where higher anisotropy at long times indicates lower rotational depolarization caused mainly by the increase of the molecular weight of the FOXO4-(11–213)W-mutant-14-3-3 $\zeta$  complex. The correlation time  $\phi_2$ , close to 20 ns, characterizing the overall rotational diffusion rate of free FOXO4-(11–213)W-mutant, corresponds well to the values obtained from the AEDANS fluorescence. Depending on noise in the data, the relatively short Trp lifetime (4.9 ns) prevents accurate recovery of very long correlation times. As a consequence, the confidence interval of the longest correlation time is highly asymmetrical and stretched to large values. This could be a reason for mismatch between the overall rotational diffusion rates of the dpFOXO4-(11–213)-14-3-3 $\zeta$  complex obtained from the Trp and AEDANS fluorescence anisotropies.

The interaction of FOXO4-(11–213)W-mutant with the 14-3-3 $\zeta$  protein does not seem to significantly restrict segmental motion of the forkhead domain, which contains both Trp<sup>173</sup> and Trp<sup>174</sup>. The segmental motion is characterized by the shorter correlation time,  $\phi_1$ , and amplitudes of this motion are reflected in the value of  $\beta_1$ . If the segment containing Trp<sup>173</sup> and Trp<sup>174</sup> was completely immobilized after the binding ( $\beta_1 = 0$ ),  $r(t)$  would decay with a single correlation time of about 45 ns belonging to a rotor with the molecular weight of the FOXO4-(11–213)W-mutant-14-3-3 $\zeta$  complex. Depolarization processes other than the rotation of the complex as a whole are absent in this case. This situation is represented by the upper

## 14-3-3 Interacts with DNA Binding Interface of FOXO4

**TABLE 4**  
Summary of energy transfer measurements

pFOXO4 donor site	14-3-3 $\zeta$ acceptor site	Label	$\tau$ (ns) <sup>a</sup>	$E$ (%)	$f(\lambda)$ <sup>d</sup>	$R_0$ (Å) <sup>c</sup>	$R$ (Å)
Cys <sup>161</sup>	Cys <sup>21</sup>	Donor only	16.8	51.8	$1.508 \times 10^{-12}$	34.7	34.3
		Donor + acceptor	8.1				
Cys <sup>181</sup>	Cys <sup>189</sup>	Donor only	16.9	47.3			35.3
		Donor + acceptor	8.9				
Cys <sup>182</sup>	Cys <sup>21</sup>	Donor only	16.5	32.7	$1.554 \times 10^{-13}$	39.0	44.0
		Donor + acceptor	11.1				
Cys <sup>182</sup>	Cys <sup>189</sup>	Donor only	16.6	31.3			44.5
		Donor + acceptor	11.4				
Cys <sup>183</sup>	Cys <sup>21</sup>	Donor only	16.6	42.2	$1.578 \times 10^{-13}$	42.3	44.5
		Donor + acceptor	9.6				
Cys <sup>183</sup>	Cys <sup>189</sup>	Donor only	16.7	28.1			49.4
		Donor + acceptor	12.0				

<sup>a</sup> Mean lifetimes were calculated as  $\tau_{\text{mean}} = \sum_i f_i \tau_i$ , where  $f_i$  is an intensity fraction of the  $i$ th lifetime component  $\tau_i$ .

<sup>b</sup> S.D. value is  $\pm 0.1$  ns.

<sup>c</sup> Energy transfer.

<sup>d</sup> Spectral overlap integral of the donor fluorescence and acceptor absorption.

<sup>e</sup> Förster critical distance represents the distance between energy donor and energy acceptor where the FRET efficiency is 50%.

reference line in Fig. 8. The lower reference line in Fig. 8 represents an opposite hypothetical situation when the motion of the tryptophan-containing DBD is completely unrestricted by the rest of the macromolecule or the complex. In this case,  $\beta_2 = 0$ , because all depolarization is caused by the fast movement of the domain with a single correlation time of about 2.5 ns. Similar results were also observed for mutants containing only one AKT/PKB phosphorylation site, suggesting that one 14-3-3 binding motif is sufficient for stable association of FOXO4-(11–213)W-mutant with the 14-3-3 $\zeta$  protein (data not shown).

**Mapping of the Interaction between 14-3-3 $\zeta$  and pFOXO4 DBD Using FRET Time-resolved Fluorescence Measurements—**To build a realistic model of the FOXO4-14-3-3 $\zeta$  complex, we measured six distances between AEDANS-labeled FOXO4 DBD and fluorescein-labeled 14-3-3 $\zeta$  using FRET time-resolved fluorescence experiments. To prepare well defined pFOXO4-14-3-3 $\zeta$  complexes containing only one donor-acceptor pair of fluorophores, we constructed two versions of the monomeric form of 14-3-3 $\zeta$  (mutation S58D) containing a single cysteine residue either at position 25 or 189, respectively (17, 19). To specifically label FOXO4 DBD, we prepared three mutants of FOXO4-(82–207) containing a single cysteine residue (either at position 101, 142, or 183, respectively). The construct FOXO4-(82–207) interacts with the monomeric 14-3-3 $\zeta$  in a uniform manner, because it contains only one AKT/PKB phosphorylation site/14-3-3 binding motif at Ser<sup>193</sup> within the wing W2. Both the modification by fluorescence dyes and the completeness of phosphorylation were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry.

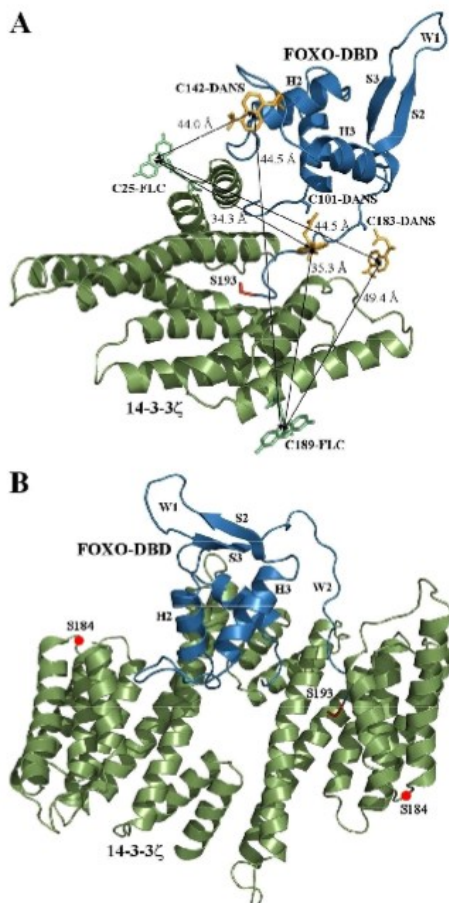
The Förster critical distance,  $R_0$ , of the AEDANS-fluorescein pair was determined from Equations 11 and 12. The calculated values of the spectral overlap  $f(\lambda)$  between AEDANS and fluorescein are listed in Table 4. The quantum yields of AEDANS-labeled pFOXO4-(82–207) fluorescence at 22 °C in the presence of unlabeled 14-3-3 $\zeta$  were determined to be 0.058 for Cys<sup>101</sup>-AEDANS, 0.114 for Cys<sup>142</sup>-AEDANS, and 0.181 for Cys<sup>183</sup>-AEDANS, respectively. The mean excited state lifetimes ( $\tau$ ) of AEDANS in the absence and presence of the acceptor (fluorescein), the efficiency of the energy transfer, and the calculated average distances are presented in Table 4. These distances enabled us to build a

model of the pFOXO4-14-3-3 $\zeta$  complex (Fig. 9, A and B). This model suggests that FOXO4 DBD is bound within the central channel of the 14-3-3 protein dimer similarly as has been observed for the 14-3-3 $\zeta$ -serotonin N-acetyltransferase complex (18). The FOXO4 DBD is oriented with the helix H1 facing the bottom of the 14-3-3 central channel, whereas the loop between the helices H2 and H3 interacts with the ninth helix of the second 14-3-3 monomer (Fig. 9B). This model is consistent with our hypothesis that the 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of FOXO4 DBD. In addition, the wing W1 containing Trp<sup>171</sup> and Trp<sup>174</sup> at the C terminus of  $\beta$ -strand S3 has no interaction with 14-3-3, consistent with our tryptophan fluorescence data.

### DISCUSSION

The 14-3-3 protein family is a group of highly conserved dimeric proteins found in all eukaryotes (31, 32). To date, several hundred distinct proteins have been found to interact with 14-3-3s, including proteins involved in metabolism control, cell cycle regulation, apoptosis, and control of gene transcription (33, 34). Although the interaction between the 14-3-3 proteins and their ligands are usually controlled through phosphorylation of the binding partner (35–37), a number of unphosphorylated 14-3-3 binding motifs has also been characterized (32). The 14-3-3 proteins are molecular scaffolds that regulate function of their binding partners by a number of different mechanisms (31, 38). It is still relatively unknown how the 14-3-3 proteins exhibit such promiscuity toward the binding and regulation of such a diverse group of binding partners; however, it is increasingly clear in the literature that many interactions are quite specific for a certain isoform or isoforms.

The role of the 14-3-3 proteins in the regulation of FOXO transcription factors is at least 2-fold. First, the 14-3-3 binding inhibits the interaction between the FOXO and the target DNA (9, 14). Second, the 14-3-3 proteins prevent nuclear reimport of FOXO factors by masking their NLS (7, 8, 39). The exact mechanisms of these processes are still unclear, mainly due to the lack of structural data. In this work, we have used various techniques of fluorescence spectroscopy to investigate the mechanism of 14-3-3 protein-dependent inhibition of FOXO4 DNA-binding properties. FOXO factors possess two 14-3-3 protein



**FIGURE 9. Model of the pFOXO4-14-3-3 $\zeta$  complex.** *A*, model of the FOXO4 DBD-14-3-3 $\zeta$  complex with the AEDANS moiety attached at Cys<sup>142</sup>, Cys<sup>101</sup>, and Cys<sup>183</sup> of FOXO4 DBD and the fluorescein moiety attached at Cys<sup>25</sup> and Cys<sup>189</sup> of 14-3-3 $\zeta$ . This model was built using the average distances calculated from FRET measurements. The crystal structure of FOXO3 $\alpha$  DBD was used to create this model (27). The conformation of the wing W2 was changed to allow its fit into the ligand binding groove of 14-3-3 $\zeta$ . The AKT/PKB phosphorylation site Ser<sup>193</sup> is shown in red. *B*, model of the FOXO4 DBD-14-3-3 $\zeta$  dimer complex. The structure of the 14-3-3 $\zeta$  dimer from the crystal structure of the 14-3-3 $\zeta$  serotonin N-acetyltransferase complex was used to create this model (18). The red circles indicate the position of Ser<sup>184</sup>, which is known to be phosphorylated by JNK kinase (40, 41).

binding motifs, and both of them are required for optimal FOXO binding to the 14-3-3 proteins (7, 10, 14). These two motifs border the forkhead domain, thus raising the possibility that the 14-3-3 protein can either sterically block the DNA

binding interface or change the structure of the forkhead domain.

Time-resolved fluorescence intensity decay measurements revealed that the 14-3-3 $\zeta$  protein binding affects fluorescence properties of the AEDANS moiety attached at four sites within the FOXO4 DBD, representing important parts of the DNA binding interface (Table 1 and Fig. 3). It is likely that observed changes in fluorescence properties of AEDANS are caused by the steric shielding of the fluorophore upon the 14-3-3 $\zeta$  protein binding, thus indicating physical contact between the 14-3-3 $\zeta$  and labeled regions of FOXO4. This is also consistent with the results of time-resolved fluorescence anisotropy experiments that indicated restriction of segmental motions of labeled regions of DBD upon dpFOXO4 binding to 14-3-3 $\zeta$  protein (Table 2 and Figs. 4–6). In addition, it seems that interaction with 14-3-3 does not cause any dramatic conformational change of FOXO4 DBD, as documented by the results of tryptophan fluorescence experiments (Table 3 and Fig. 8).

To map the interaction between FOXO4 and 14-3-3 $\zeta$ , we measured, using FRET time-resolved fluorescence experiments, six distances between AEDANS-labeled FOXO4 DBD and fluorescein-labeled 14-3-3 $\zeta$ . This enabled us to build a model of the pFOXO4-14-3-3 $\zeta$  complex (Fig. 9, *A* and *B*). This model suggests that FOXO4 DBD is docked into the central channel of the 14-3-3 $\zeta$  dimer in a similar manner as observed previously for the serotonin N-acetyltransferase-14-3-3 $\zeta$  complex (18). This position allows for efficient masking of the whole DNA binding interface of FOXO4, consistent with the results of our fluorescence measurements.

Our fluorescence data, together with results published previously (11), also suggest that FOXO4 DBD remains relatively mobile upon the 14-3-3 $\zeta$  protein binding. The correlation component with  $\phi$  ranging from 3 to 8 ns probably reflects movement of a rigid domain within the FOXO4-(11–213) construct (Table 2,  $\phi_2$  and  $\phi_3$  in the absence and the presence of the 14-3-3 $\zeta$  protein, respectively). We assume that this could be compact and about 11-kDa large DBD. Thus the model presented in Fig. 9, *A* and *B*, should represent the average position of FOXO4 DBD with respect to the 14-3-3 molecule.

It is now generally accepted that the phosphorylation of 14-3-3 isoforms on specific residues plays an important regulatory role (32). The c-Jun N-terminal kinase (JNK) belongs to the group of mitogen-activated protein kinases that are activated when cells are exposed to environmental stresses. It has been shown that the phosphorylation of 14-3-3 by JNK at Ser<sup>184</sup> ( $\zeta$ -isoform) induces dissociation of proapoptotic proteins Bad and FOXO3 from 14-3-3, thus reversing the effect of Akt/PKB signaling (40, 41). Residue Ser<sup>184</sup> is located within the loop between helices  $\alpha 7$  and  $\alpha 8$  in the vicinity of the ligand binding groove (Fig. 9*B*). Our previous work has suggested that the 14-3-3 $\zeta$  protein physically interacts with the whole region of FOXO4 NLS (11). Therefore, the interaction between the NLS of FOXO proteins and the  $\alpha 7$ - $\alpha 8$  loop of the 14-3-3 molecule cannot be ruled out. In such a case, the JNK-induced phosphorylation of Ser<sup>184</sup> could interfere with FOXO binding to 14-3-3. However, our model cannot predict this interaction, because the crystal structure of FOXO3, which was used to create our model, does not contain any residues beyond the Akt/PKB

### 14-3-3 Interacts with DNA Binding Interface of FOXO4

phosphorylation site (27). Considering both the location of Ser<sup>163</sup> and the fact that the JNK-induced phosphorylation inhibits the interaction between 14-3-3 and Bad, it is also entirely possible that the phosphorylation of the  $\alpha$ 7- $\alpha$ 8 loop affects the structure of the 14-3-3 ligand binding groove and inhibits the 14-3-3 binding properties.

In conclusion, our data strongly suggest that the 14-3-3 $\zeta$  protein physically interacts with the DNA binding interface of phosphorylated FOXO4. The FOXO4 DBD is docked into the central channel of the 14-3-3 protein dimer but remains relatively mobile upon the complex formation. Moreover, intrinsic tryptophan fluorescence indicates no significant binding-induced conformational change of DBD. Thus, the 14-3-3 $\zeta$  protein functions as a molecular hood that covers the DNA binding interface of FOXO4 and blocks its interaction with the target DNA.

**Acknowledgments** We thank Dr. Ondřej Julínek for helping with the measurements of circular dichroism spectra. We also thank Dr. Eva Muchova for proofreading of the manuscript.

#### REFERENCES

- Weigel, D., and Jackle, H. (1990) *Cell* **63**, 455–456
- Kaesler, K. H., Knochel, W., and Martínez, D. E. (2000) *Genes Dev.* **14**, 142–146
- Mazet, F., Yu, J. K., Liberles, D. A., Holland, L. Z., and Shimel, S. M. (2003) *Genes* **316**, 79–89
- Cainan, D. R., and Brunet, A. (2008) *Oncogene* **27**, 2276–2288
- Fu, Z., and Tindall, D. J. (2008) *Oncogene* **27**, 2312–2319
- Gross, D. N., van den Heuvel, A. P. J., and Birnbaum, M. J. (2008) *Oncogene* **27**, 2320–2336
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999) *Cell* **96**, 857–868
- Brownawell, A. M., Kops, G. J., Macara, I. G., and Burginger, B. M. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 3534–3546
- Cahil, C. M., Tzivion, G., Nasrin, N., Ogg, S., Dore, J., Ruvkun, G., and Alexander-Bridges, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13402–13410
- Zhan, X., Gan, L., Pan, H., Kan, D., Majeski, M., Adam, S. A., and Untermyer, I. G. (2004) *Biochem. J.* **378**, 839–849
- Obsil, V., Vecer, J., Herman, P., Pahlavanova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., and Obsil, T. (2005) *Biochemistry* **44**, 11608–11617
- van der Horst, A., and Burginger, B. M. T. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 440–450
- Obsil, T., and Obsilova, V. (2008) *Oncogene* **27**, 2263–2275
- Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D. E., Hickman, A. B., and Dyda, F. (2003) *Biochemistry* **42**, 15264–15272
- Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., and Obsil, T. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 8363–8375
- Sadilova, L., Ostic, R., Sulc, M., Linhartova, I., Novak, P., and Sebo, P. (2008) *Protein Sci.* **17**, 1834–1843
- Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., and Obsil, T. (2006) *J. Biol. Chem.* **279**, 49113–49119
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S., and Dyda, F. (2001) *Cell* **105**, 257–267
- Woodcock, J. M., Murphy, J., Stomski, F. C., Berndt, M. C., and Lopez, A. T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 36323–36327
- Kohler, J. I., and Schepartz, A. (2001) *Biochemistry* **40**, 130–142
- Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., and Obsil, T. (2009) *J. Biol. Chem.* **279**, 4531–4540
- Bryan, R. K. (1990) *Eur. Biophys. J.* **18**, 165–174
- Brouha, J. C. (1994) *Methods Enzymol.* **240**, 262–311
- Lakowicz, J. R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 305–315, Plenum Press, New York
- Melhuish, W. H. (1961) *J. Phys. Chem.* **65**, 229–235
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., and Burley, S. K. (1993) *Nature* **364**, 412–420
- Tsai, K. L., Sun, Y. J., Huang, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., and Hsiao, C. D. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, 6984–6994
- Eftink, M. R. (1991) in *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (Lakowicz, J. R., ed) Vol. 2, pp. 55–91, Plenum Press, New York
- Yaffe, M. B. (2002) *FEBS Lett.* **513**, 53–57
- Obsilova, V., Nedalkova, E., Silhan, J., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Dyda, F., and Obsil, T. (2008) *Biochemistry* **47**, 1768–1777
- Fu, H., Subramanian, R. R., and Masters, S. C. (2000) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617–647
- Aitken, A. (2006) *Semin. Cancer Biol.* **16**, 162–172
- Mackintosh, C. (2004) *Biochem. J.* **381**, 329–343
- Milne, F. C., Moorhead, G., Pozuelo Rubio, M., Wong, B., Kulma, A., Harthill, J. E., Villadsen, D., Cotelle, V., and MacKintosh, C. (2002) *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 379–381
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (1996) *Cell* **84**, 889–897
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aiken, A., Loeffers, H., Gambin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. (1997) *Cell* **91**, 961–971
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gambin, S. J., and Yaffe, M. B. (1999) *Mol. Cell* **4**, 153–166
- Bridges, D., and Moorhead, G. B. (2004) *Sci. STKE* **2004**, re10
- Rena, G., Prescott, A. R., Gao, S., Cohen, P., and Untermyer, T. G. (2001) *Biochem. J.* **354**, 603–612
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tajimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004) *EMBO J.* **23**, 1889–1899
- Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2005) *J. Cell Biol.* **170**, 295–304

## Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1

Dana VEISOVÁ\*, Eva MACAKOVA\*, Lenka REZABKOVA\*†, Miroslav SULC‡§, Petr VACHA\*†, Hana SYCHROVA\*, Tomas OBSIL\*‡ and Veronika OBSILOVA\*†

\*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic, †Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 12843 Prague 2, Czech Republic, ‡Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 12843 Prague 2, Czech Republic, and §Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

Trehalases are important highly conserved enzymes found in a wide variety of organisms and are responsible for the hydrolysis of trehalose that serves as a carbon and energy source as well as a universal stress protectant. Emerging evidence indicates that the enzymatic activity of the neutral trehalase Nth1 in yeast is enhanced by 14-3-3 protein binding in a phosphorylation-dependent manner through an unknown mechanism. In the present study, we investigated in detail the interaction between *Saccharomyces cerevisiae* Nth1 and 14-3-3 protein isoforms Bmh1 and Bmh2. We determined four residues that are phosphorylated by PKA (protein kinase A) *in vitro* within the disordered N-terminal segment of Nth1. Sedimentation analysis and enzyme kinetics measurements show that both yeast

14-3-3 isoforms form a stable complex with phosphorylated Nth1 and significantly enhance its enzymatic activity. The 14-3-3-dependent activation of Nth1 is significantly more potent compared with Ca<sup>2+</sup>-dependent activation. Limited proteolysis confirmed that the 14-3-3 proteins interact with the N-terminal segment of Nth1 where all phosphorylation sites are located. Site-directed mutagenesis in conjunction with the enzyme activity measurements *in vitro* and the activation studies of mutant forms *in vivo* suggest that Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>62</sup> are sites primarily responsible for PKA-dependent and 14-3-3-mediated activation of Nth1.

**Key words:** 14-3-3 protein, Bmh, enzymatic activity, neutral trehalase (Nth1), phosphorylation, *Saccharomyces cerevisiae*.

### INTRODUCTION

Glycoside hydrolase family 37 (EC 3.2.1.28) of O-glycosyl hydrolases (EC 3.2.1.-) comprises enzymes which share common trehalase activity that is responsible for the hydrolysis of trehalose [ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside], yielding two glucose molecules. Trehalases are important enzymes found in a wide variety of organisms and whose sequences have been highly conserved throughout evolution [1–3]. Trehalose, a naturally occurring non-reducing disaccharide, serves as a carbon and energy source as well as a universal protectant from various stress conditions such as dehydration, temperature extremes, oxidative stress and desiccation in a wide variety of organisms ranging from bacteria to invertebrates and higher plants [4,5]. In yeast and plants, it may also serve as a regulatory or signalling molecule to control certain metabolic pathways or even to affect growth.

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, hydrolysis of trehalose can be carried out by three enzymes: neutral trehalases Nth1 and Nth2, and acid trehalase Ath1. Nth1 is localized in the cytosol and possesses maximal activity at pH 7.0. The trehalase activity of Nth1 is necessary for yeast cells to recover efficiently from heat shock [6]. Neutral trehalase Nth2 shares 77% sequence homology with Nth1 [7] and its activity was described in the presence of extracellular trehalose [8]. Ath1, named for its lower optimum pH, displays no sequence homology with Nth1 and is important for growth on media containing trehalose as a carbon source [9].

The comparison of trehalase sequences from various organisms reveals that yeast enzymes (Nth1 and Nth2 from *S. cerevisiae* and Nth1 from *Kluyveromyces lactis*) possess a significantly longer N-terminal region compared with those from other organisms

[3]. This N-terminal extension seems to be an important feature governing the regulation of yeast neutral trehalases by the cAMP-dependent phosphorylation process as it contains several putative PKA (protein kinase A) phosphorylation sites [10–12]. Indeed, PKA was shown to increase trehalase activity in yeast cell extracts and the phosphorylated amino acid residue was identified as phosphoserine [10,13]. The biochemical study by Wera et al. [6] showed that the activation of Nth1 from *S. cerevisiae*, whose sequence contains 17 potential PKA phosphorylation sites, is mediated by the phosphorylation of more than one site and suggested that residues Ser<sup>21</sup>, Ser<sup>23</sup> and Ser<sup>33</sup> are the actual PKA sites responsible for Nth1 activation. A phosphoproteomic analysis of whole-cell lysate from *S. cerevisiae* indicated Ser<sup>21</sup>, Ser<sup>23</sup> and Ser<sup>60</sup> as Nth1 sites phosphorylated *in vivo*, suggesting that Ser<sup>21</sup> might be a target of a protein kinase other than PKA [14]. Panni et al. [15] have suggested that phosphorylated Nth1 is regulated in a 14-3-3-protein-dependent manner, further extending the complexity of the regulation of neutral trehalase activity in yeast. In that study, it has been shown that the 14-3-3 proteins enhance the Nth1 activity and bind short synthetic phosphopeptides derived from motifs containing the PKA phosphorylation sites Ser<sup>21</sup> and Ser<sup>23</sup>, but not Ser<sup>33</sup>. In addition, the enzymatic activity of yeast neutral trehalase is also regulated in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. Franco et al. [16] have shown that activation of *Schizosaccharomyces pombe* Nth1 depends on Ca<sup>2+</sup> binding through the conserved Ca<sup>2+</sup>-binding motif that is also present in *S. cerevisiae* Nth1. The mechanism of both 14-3-3-protein- and Ca<sup>2+</sup>-dependent Nth1 activation remains to be determined.

The yeast *S. cerevisiae* possesses two 14-3-3 genes, *BMH1* and *BMH2*, which share a great degree of homology and are essential in most laboratory strains [17,18]. Members of the

Abbreviations used: Ath1, acid trehalase 1; AUC, analytical ultracentrifugation; DTT, dithiothreitol; MALDI, matrix-assisted laser-desorption/ionization; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 1; Nth, neutral trehalase; PKA, protein kinase A; pNth1, phosphorylated Nth1; PSD, post-source decay; SV, sedimentation velocity; TBE, Tris/borate/EDTA; TOF, time-of-flight; WT, wild-type.

† To whom correspondence should be addressed (obsilovs@oicmed.cas.cz).

14-3-3 protein family serve as molecular chaperones by modulating the structure, the subcellular localization or the activity of hundreds of other proteins in all eukaryotes [19,20]. They recognize specific phosphoserine/phosphothreonine-containing as well as unphosphorylated motifs (reviewed in [21,22]) and through these binding interactions, they play important roles in the regulation of signal transduction, apoptosis, cell-cycle control and nutrient-sensing pathways. If the bound partner is an enzyme, then 14-3-3 protein can regulate its enzymatic activity. It has been, for example, shown that the enzymatic activity of tryptophan and tyrosine hydroxylases [23,24] and serotonin N-acetyltransferase [25] is enhanced, whereas the activity of Ask1 [26] and Yak1 [27] kinases is suppressed upon 14-3-3 protein binding. The mechanisms behind these regulations are still unclear, but can involve either the direct structural change of bound enzyme, as has been demonstrated in the case of serotonin N-acetyltransferase [28], or protection against dephosphorylation, as has been suggested in the case of tyrosine hydroxylase [29]. Another important and common feature of the 14-3-3-binding partners is the presence of multiple phosphorylation/14-3-3-binding sites, very often within disordered regions and/or bordering the functional domain, that are simultaneously used not only for the binding, but also to achieve the required function [30,31].

To better understand the mechanism of the *S. cerevisiae* Nth1 regulation, we investigated its interaction with yeast 14-3-3 protein isoforms in detail. The mass spectrometric analysis revealed that four residues within the disordered N-terminal segment of recombinant full-length Nth1 (Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>21</sup>, Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>61</sup>) are phosphorylated by PKA *in vitro*. Sedimentation analysis and enzyme kinetics measurements show that both yeast 14-3-3 isoforms form a stable complex with phosphorylated Nth1 and significantly enhance its enzymatic activity. The 14-3-3-dependent activation of Nth1 is significantly more potent than Ca<sup>2+</sup>-dependent activation. Limited proteolysis confirmed that the 14-3-3 proteins interact with the N-terminal segment of Nth1 where all phosphorylation sites are located. Site-directed mutagenesis was used to decipher the importance of found phosphorylation sites for Nth1 activation. Both the enzyme activity measurements *in vitro* and the activation studies of mutant forms *in vivo* suggest that Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>61</sup> are sites primarily responsible for PKA-dependent and 14-3-3-mediated activation of Nth1.

## EXPERIMENTAL

### Heterologous expression, purification and phosphorylation of Nth1

The Nth1 coding sequence was PCR-amplified from the *S. cerevisiae* BY4741 genomic DNA. The PCR product was ligated using NcoI and BamHI sites into a modified pET-32b vector (Novagen) where 81 residues after the sequence H<sub>6</sub>SSGLVPRGS were deleted (a gift from Dr Donald Ronning, Department of Chemistry, University of Toledo, Toledo, OH, U.S.A.). The entire coding region was verified by sequencing. The Nth1 was expressed as a fusion protein, with the thioredoxin and His<sub>6</sub> tags at the N-terminus, by IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) induction for 18 h at 25 °C and purified from *Escherichia coli* Rosetta™(DE3) cells using Chelating Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare) using the standard protocol. The thioredoxin and His<sub>6</sub> tags were cleaved by incubation at 4 °C for 12 h with 5 units of thrombin per mg of protein. After the cleavage, Nth1 was dialysed against buffer containing 50 mM sodium citrate (pH 6), 1 mM EDTA, 2 mM DTT (dithiothreitol) and purified by cation-exchange chromatography on a HiTrap SP column (GE Healthcare). The protein was eluted using a linear gradient of NaCl (50–1000 mM). Fractions containing Nth1 were concentrated

to ~2 mg/ml and purified using size-exclusion chromatography on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) in buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 10% (w/v) glycerol.

Purified Nth1 [both WT (wild-type) and mutants] was phosphorylated by incubation at 30 °C for 2 h and then overnight at 4 °C with 80 units of PKA (Promega) per mg of protein in the presence of 0.75 mM ATP and 20 mM MgCl<sub>2</sub>. The completeness of the phosphorylation reaction was checked using MALDI (matrix-assisted laser-desorption/ionization)-TOF (time-of-flight)-MS.

Mutants of Nth1 containing different numbers of PKA phosphorylation sites (at positions 20, 21, 60 or 83) were created by mutating other sites to alanine using the QuikChange™ approach (Stratagene). All mutations were confirmed by sequencing.

### Heterologous expression and purification of yeast 14-3-3 protein isoforms

Both *S. cerevisiae* 14-3-3 protein isoforms (Bmh1 and Bmh2) were expressed and purified as described previously [32,33].

### AUC (analytical ultracentrifugation)

SV (sedimentation velocity) experiments were performed using a ProteomLab™ XL-1, Beckman Coulter analytical ultracentrifuge. SV experiments of the Bmh1, Bmh2 and Nth1 WT and Nth1 mutants were conducted at loading concentrations of 0.5–10 μM, 20 °C and 42 000 or 48 000 rev./min rotor speed (An-50 Ti rotor, Beckman Coulter). All data were collected at 280 nm. Samples were dialysed against the buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2 mM 2-mercaptoethanol before analysis. Data were analysed using the SEDFIT and SEDPHAT packages [34,35].

### Mass spectrometric analysis of Nth1

Samples were first separated by SDS/PAGE (8% gels), and excised protein bands were digested with trypsin endoprotease (Promega) directly in-gel with cysteine modification by iodoacetamide [36]. Resulting peptide mixtures were extracted by 30% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and subjected to MALDI-TOF-MS using an UltraFLEX III instrument (Bruker-Daltonics) equipped with a nitrogen laser (337 nm). Positively or negatively charged spectra were acquired with 2,5-dihydrobenzoic acid as the MALDI matrix and calibrated externally using the monoisotopic [M + H]<sup>+</sup> or [M – H]<sup>–</sup> ions of PepMix1I calibrant (Bruker-Daltonics) or internally using the corresponding monoisotopic ions of recombinant protein peptides with known sequence. Phosphorylated peptides from the peptide mixtures were enriched as described previously [37].

### Limited proteolysis

Samples containing 50 μg of purified Nth1 or pNth1 (phosphorylated Nth1) (as thioredoxin-fusion protein) and 30 μg of Bmh1 (molar ratio of Nth1/Bmh was 1:2) were incubated at 25 °C with 50 ng of trypsin or chymotrypsin (protease/protein ratio was approximately 1:1000, w/w) in buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT and 10% (w/v) glycerol, and were stopped by boiling in the presence of SDS/PAGE loading buffer at times ranging from 0 to 30 min. The resulting polypeptides were separated by SDS/PAGE (10% gels) and visualized by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. The resulting Nth1 and pNth1 peptides were analysed using MALDI-TOF-MS.



### Trehalase activity assay

The enzyme kinetics of the hydrolysis of trehalose by Nth1 was measured using a stopped assay [5]. The production of glucose was detected using the Amplex<sup>®</sup> Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit (Invitrogen). The assay was performed at 30°C in buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol and 0–30 mM trehalose. The final concentrations of Nth1 and Bmh in *in vitro* experiments were 80 nM and 12  $\mu$ M respectively. Aliquots of 50  $\mu$ l of the reaction mixtures were taken at intervals and the reaction was stopped by boiling the aliquots for 3 min. Then, 50  $\mu$ l of the Amplex<sup>®</sup> Red reagent/peroxidase/glucose oxidase solution was added, and the concentration of glucose was determined following the manufacturer's instructions. The reaction rates were determined and the data were fitted to the Michaelis–Menten equation using Origin 8.0 (OriginLab) and are given as means  $\pm$  S.E.M. for three experiments.

### Yeast strains and plasmid construction

All *in vivo* experiments were carried out using the BY4741-derived deletion strain ydr001c (nth1D); genotype MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$  met15 $\Delta$  ura3 $\Delta$  ydr001c::kanMX4 [EUROSCARF European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (Institut für Mikrobiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany)]. DNA fragments encoding the Nth1 WT and mutant forms of trehalase were cloned into the multicopy expression vector YEp352 behind the weak constitutive *NHAI* (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 1) promoter by homologous recombination [38]. The vectors were constructed by replacing the *S. cerevisiae* *NHAI* gene with the *S. cerevisiae* *NTH1* genes in the pNHA1-985 plasmid [39]. The trehalase-coding WT and mutant regions (2253 bp) were amplified from pET-32b plasmids (using primers YEpN-NTH1-F and YEpN-NTH1-R; see Supplementary Table S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/443/bj4430663add.htm>) and the PCR products were inserted by homologous recombination into the pNHA1-985 plasmid (with the *URA3* marker gene) linearized with the restriction endonuclease PstI in the *NHA1* coding sequence. Yeast cells were transformed by linearized plasmid and PCR-amplified DNA fragments. The exchange of *NHAI* by *NTH1* in plasmids isolated from ura<sup>+</sup> colonies was verified by restriction analysis and diagnostic PCR, and the trehalase-coding regions were sequenced.

### Activation of trehalase *in vivo*

The activation of trehalase *in vivo* was carried out as described previously [40]. Briefly, yeast cells overexpressing the Nth1 WT or its mutant forms were grown to exponential phase ( $D_{600}$  of 1.5–2) in minimal YNB (yeast nitrogen base) medium with Brent supplemental mixture containing 2% (w/v) glycerol. Cells were harvested by centrifugation at 1620 g for 3 min, washed in ice-cold water and resuspended at a cell density of 25 mg/ml in a buffer containing 100 mM Mes/KOH (pH 7) and 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. The cells were pre-incubated at 30°C for 10 min before the first sample was taken. The activation of trehalase was triggered by the addition of 4% (w/v) glucose (final concentration). Aliquots (750  $\mu$ l) were taken before the glucose addition and, at 10 min after the glucose addition, samples were quickly mixed with 40 ml of ice-cold water. The cells were collected by centrifugation at 1620 g for 3 min at 4°C. The pellet was resuspended in 500  $\mu$ l of ice-cold buffer containing 50 mM Mes/KOH (pH 7) and 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> and broken up by vigorous mixing with glass beads. Protein

concentration was determined using the Bradford procedure. Trehalase activity was determined as described previously [40]. The specific activity of trehalase is expressed as nmol of glucose liberated per min per mg of protein.

## RESULTS

### Preparation and characterization of phosphorylated Nth1 *in vitro*

The main goal of the present study was to investigate in detail the 14-3-3-protein-dependent regulation of Nth1 from *S. cerevisiae*. Since it has been suggested that this interaction is mediated through PKA-induced phosphorylation, we first focused on the identification of phosphorylation sites essential for the interaction between Nth1 and yeast 14-3-3 isoforms Bmh1 and Bmh2. The N-terminal region of yeast Nth1 contains several putative PKA phosphorylation sites that have been implicated in the cAMP-dependent activation of this enzyme [10–12]. Furthermore, it has been suggested that 14-3-3 proteins play an important role in the regulation of Nth1 activity through binding to its phosphorylated N-terminal segment [15]. To investigate the interaction between Nth1 and 14-3-3 proteins, we first prepared a recombinant full-length *S. cerevisiae* Nth1 (sequence 1–751). Purified Nth1 was then phosphorylated by PKA *in vitro* and the positive- or negative-ion MALDI–TOF mass spectra of the tryptic peptide mixture of pNth1 were measured in the reflection mode to confirm the amino acid sequences of phosphorylation sites and their modification. The mass spectrum of WT pNth1 revealed signals of four stoichiometrically phosphorylated serine residues: Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>21</sup>, Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> (Supplementary Table S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/443/bj4430663add.htm>). The identity structure of all phosphorylated peptides was confirmed further by analysis of their PSD (post-source decay) spectra to authenticate all serine residues presented as phosphorylated amino acids (results not shown). As a control experiment, we prepared the Nth1 mutant where all four serine residues (at positions 20, 21, 60 and 83) were mutated to alanine. This mutant protein (denoted as pNth1-noS) was phosphorylated as Nth1 WT and no additional phosphorylated residues were found using MALDI–TOF mass spectrometric analysis.

In agreement with previous reports, all phosphorylation sites found are located within the N-terminal region of Nth1 [6,10–12,14] (Figure 1A). Although phosphorylation sites Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>21</sup> and Ser<sup>83</sup> have been suggested previously to be involved in PKA-dependent regulation of Nth1 [6,14], the PKA-mediated phosphorylation of Ser<sup>60</sup> was not observed previously. Bioinformatics analysis using the PONDR program indicates that the N-terminal region of Nth1, where all phosphorylation sites detected are located, is disordered [41] (Figure 1B). The protein domain features of Nth1 were analysed using the SMART program [42], which predicted the presence of two conserved domains upstream of the disordered N-terminal region: the trehalase domain (sequence 163–721) and the Ca<sup>2+</sup>-binding motif (sequence 114–125) similar to the EF hand domain [16,43] (Figure 1A).

### Yeast 14-3-3 protein isoforms (Bmh1 and Bmh2) form stable complexes with phosphorylated pNth1 and enhance its enzymatic activity *in vitro*

Next, we investigated whether the pNth1 forms a stable complex with the 14-3-3 proteins using AUC. SV measurements revealed that pNth1 alone exists in solution as monomers of molecular mass 86 kDa, whereas Bmh proteins form stable dimers, as has

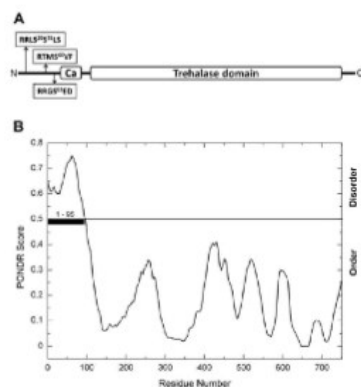


Figure 1 Primary structure of Nth1

(A) Diagram of *S. cerevisiae* Nth1 primary structure. Relative positions of sites phosphorylated by PKA *in vivo* are shown. The protein domain features of Nth1 were analysed using the SMART program [42], which predicted the presence of two conserved domains upstream of the disordered N-terminal region: the trehalase domain (sequence 163–727) and the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif (denoted as 'Ca', sequence 114–125) similar to the EF hand domain [16,43]. (B) Bioinformatics analysis using PONDR program (VLS predictor) indicates that the N-terminal region (residues 1–95, marked by a thick black line) of Nth1, where all of the phosphorylation sites detected are located, is disordered [41].

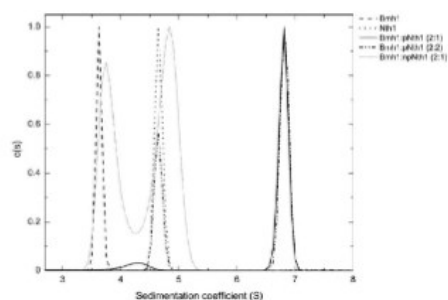


Figure 2 SV analysis

Continuous distribution of sedimentation coefficients,  $s$ (s), for Bmh1 alone (black dashed line), Nth1 alone (black dotted line), Bmh1 and pNth1 mixed in the molar ratio 2:1 (black continuous line), Bmh1 and pNth1 mixed in the molar ratio 2:2 (black dashed-dotted line) and Bmh1 and unphosphorylated Nth1 mixed in the molar ratio 2:1 (grey dotted line).

been shown previously [32]. Both unphosphorylated Nth1 WT and pNth1-noS mutant showed no significant interaction with Bmh1 or Bmh2, whereas phosphorylated pNth1 WT formed a stable complex with both Bmh isoforms (Figure 2, only data for Bmh1 are shown). Analysis of SV data revealed that the binding stoichiometries of pNth1–Bmh complexes are 1:2 (a dimer of Bmh protein binds one molecule of pNth1). The apparent equilibrium dissociation constants ( $K_d$ ) for pNth1 binding to Bmh1 and Bmh2 were determined to be  $0.15 \times 10^{-6}$  and  $0.25 \times 10^{-6}$  M respectively (Table 1).

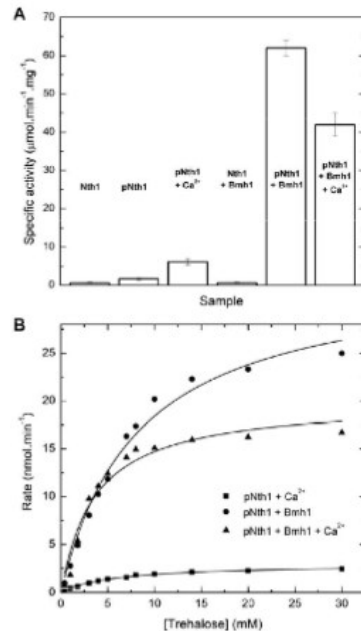
Table 1 Dissociation constant values for pNth1–14-3-3 complexes calculated from the SV experiments

Calculated using non-linear least-squares analysis. Uncertainties are the standard errors from least-square fit.

Nth1 variant	Number of phosphosites	$K_d$ ( $\times 10^6$ M)	
		Bmh1	Bmh2
pWT	Four	$0.15 \pm 0.1$	$0.25 \pm 0.1$
pS20	One	$10 \pm 3$	$10 \pm 3$
pS21	One	$10 \pm 4$	$10 \pm 3$
pS60	One	$0.2 \pm 0.15$	$0.25 \pm 0.2$
pS85	One	$0.2 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$
pS20 + 21	Two	$10 \pm 3$	$10 \pm 4$
pS20 + 60	Two	$0.25 \pm 0.1$	$0.25 \pm 0.15$
pS20 + 83	Two	$0.2 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$
pS21 + 60	Two	$0.3 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.2$
pS21 + 83	Two	$0.3 \pm 0.2$	$0.25 \pm 0.15$
pS60 + 83	Two	$0.3 \pm 0.15$	$0.25 \pm 0.15$

To investigate the effect of phosphorylation and 14-3-3 binding on the enzymatic activity of Nth1, we measured the trehalase activity of pNth1 and Nth1 both in the presence and in the absence of Bmh proteins. The trehalase activity was measured by estimating the glucose produced by hydrolysis of trehalose. In agreement with a previous study by Panni et al. [15], both Nth1 and pNth1 show very low enzymatic activity in the absence of 14-3-3 proteins (Figure 3A). The presence of 14-3-3 proteins dramatically enhances only the activity of phosphorylated pNth1, whereas the enzymatic activity of unphosphorylated Nth1 remains unchanged. We did not observe any significant difference between the two yeast 14-3-3 isoforms in their abilities to activate pNth1, thus only the data for Bmh1 are presented. In addition, Franco et al. [16] has shown that the enzymatic activity of Nth1 from *S. pombe* is significantly enhanced upon  $\text{Ca}^{2+}$  binding through the conserved  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif and suggested that  $\text{Ca}^{2+}$  binding affects the oligomeric state of the enzyme. The  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site is conserved among yeast neutral trehalases and, in the sequence of Nth1 from *S. cerevisiae*, is located between residues 114 and 125 (sequence D<sup>114</sup>TDKNYQTIED<sup>125</sup>) [16,43]. This sequence closely resembles the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site present in the EF hand motif of numerous  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins [44]. Therefore we also measured the Nth1 activity in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  that has been shown to enhance Nth1 activity [16]. The presence of 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  somewhat increased the activity of pNth1, but the 14-3-3-dependent activation is significantly more potent. Interestingly, in the presence of both  $\text{Ca}^{2+}$  and 14-3-3, the activity of pNth1 is significantly lower compared with the sample without  $\text{Ca}^{2+}$ .

The Michaelis–Menten kinetics for the hydrolysis of trehalose by pNth1 in the presence of Bmh1 and/or 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  are shown in Figure 3(B). At pH 7.5 and 30 °C, the full-length pNth1 in the presence of Bmh1 has a Michaelis constant,  $K_m$ , of  $8 \pm 1$  mM and a turnover number,  $k_{cat}$ , of  $71 \pm 4$  s<sup>-1</sup> ( $k_{cat}/K_m$  of  $8.9$  s<sup>-1</sup>·mM<sup>-1</sup>). These values are comparable with those published in the literature, as several authors have reported  $K_m$  values of 5–10 mM [45–47]. In the presence of 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (in the absence of Bmh1) pNth1 has a  $K_m$  value of  $6.0 \pm 0.4$  mM and a  $k_{cat}$  value of  $6.2 \pm 0.1$  s<sup>-1</sup> ( $k_{cat}/K_m$  of  $1.0$  s<sup>-1</sup>·mM<sup>-1</sup>), whereas, in the presence of both Bmh1 and 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , we obtained for pNth1 a  $K_m$  value of  $3.6 \pm 0.7$  mM and a  $k_{cat}$  value of  $42 \pm 2$  s<sup>-1</sup> ( $k_{cat}/K_m$  of  $11.7$  s<sup>-1</sup>·mM<sup>-1</sup>). These data show that the 14-3-3 protein binding significantly increases (~11-fold) turnover number of pNth1 compared with the  $\text{Ca}^{2+}$  only-induced activation. We were unable to compare these data with the kinetic parameters of pNth1 or Nth1



**Figure 3** Activation of Nth1 *in vitro* and enzyme kinetics of activated Nth1

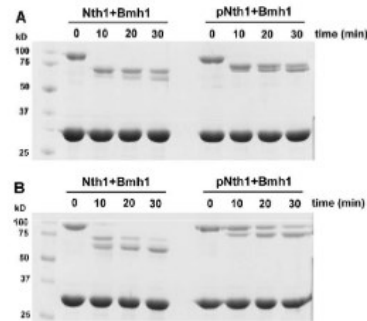
(A) Specific trehalase activity of pNth1 and Nth1 both in the presence and in the absence of Bmh1 protein and/or  $5\text{ mM Ca}^{2+}$ . The concentration of trehalose was  $30\text{ mM}$ . Specific activity of trehalase is expressed as  $\mu\text{mol}$  of glucose liberated per  $\text{min}$  per  $\text{mg}$  of protein. Results are means  $\pm$  S.D. for three experiments. (B) Michaelis-Menten kinetics for the hydrolysis of trehalose by pNth1 in the presence of  $5\text{ mM Ca}^{2+}$  (■), Bmh1 (●) and both  $5\text{ mM Ca}^{2+}$  and Bmh1 (▲). The reaction rates (means for three experiments) are plotted against trehalose concentration. The trehalase activity was measured by calibrating the glucose produced by hydrolysis of trehalose.

alone as in the absence of the 14-3-3 protein binding or  $\text{Ca}^{2+}$  their enzymatic activities are very low for any analysis.

Furthermore, AUC was used to study the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the oligomeric state of Nth1 from *S. cerevisiae*. These experiments revealed that Nth1 exists in all three solutions tested containing 5, 10 and 15 mM  $\text{Ca}^{2+}$  as monomers of molecular mass 86 kDa (Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/443/bj4430663add.htm>), and hence the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation does not result from the change of the oligomeric state of Nth1.

#### Yeast 14-3-3 protein isoforms interact with the N-terminal part of phosphorylated pNth1

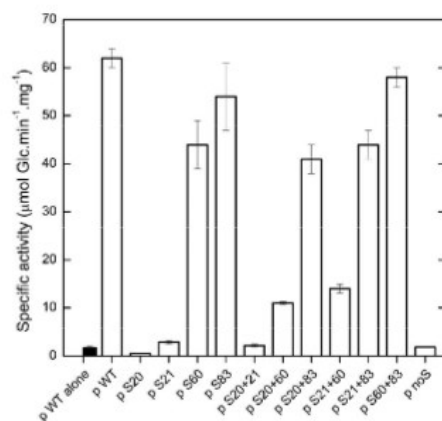
Both AUC and native TBE (Tris/borate/EDTA)/PAGE revealed that Bmh proteins interact with phosphorylated pNth1 (Figure 2 and Table 1, and Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/443/bj4430663add.htm>). Since all PKA phosphorylation sites are located within the N-terminal region of pNth1, it is reasonable to assume that Bmh proteins make



**Figure 4** Limited proteolysis of Nth1

Limited proteolysis of Nth1 and pNth1 in the presence of Bmh1 protein by trypsin (A) and chymotrypsin (B). The Nth1/Bmh1 molar ratio was 1:2. The protease/Nth1 ratio was 1:1000 (w/w). Samples of protein mixtures were incubated with protease for 10, 20 or 30 min at  $25^\circ\text{C}$  in buffer containing  $20\text{ mM Tris-HCl}$  (pH 7.5),  $150\text{ mM NaCl}$ ,  $1\text{ mM DTT}$  and  $10\%$  (v/v) glycerol and were stopped by boiling in the presence of SDS/PAGE loading buffer at the times indicated. The resulting polypeptides were separated by SDS/PAGE (10% gels) and visualized by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. The resulting Nth1 and pNth1 peptides were analysed using MALDI-TOF-MS. Molecular masses are indicated in kDa.

extensive contacts with this part of pNth1. In order to verify this hypothesis, the limited proteolysis was used to check whether 14-3-3 protein binding protects the N-terminal region of pNth1 against the proteolytic degradation. The results of limited proteolysis of Nth1, pNth1 and Bmh1 alone and in mixtures by low levels of trypsin or chymotrypsin (the protease/protein ratio was 1:1000, w/w) are presented in Figure 4 and Supplementary Figure S3 (at <http://www.BiochemJ.org/bj/443/bj4430663add.htm>). It can be noticed that Bmh1 protein alone was resistant to trypsin or chymotrypsin within the time course of this experiment (Supplementary Figure S3). Mass spectrometric analysis of protein bands formed after 30 min chymotrypsin or trypsin partial digestions of Nth1 and pNth1 both in the absence and in the presence of Bmh1 revealed clear 14-3-3-mediated protection of the N-terminal sequence containing all PKA phosphorylation sites. No proteolytic degradation from the C-terminus of either Nth1 or pNth1 was observed under the conditions of partial proteolysis used as the analysis of Nth1 alone, pNth1 alone and Nth1 + Bmh1 revealed the sequence coverage of Nth1 protein from His<sup>168</sup> to the C-terminal Leu<sup>751</sup> using both trypsin or chymotrypsin protease (the first peptide found from the N-terminal segment was *m/z* signal 1128.56 corresponding to the amino acid sequence 168–176). On the other hand, the N-terminal segment of pNth1 was, in the presence of Bmh1, protected against the chymotrypsin partial proteolysis as confirmed by the determination of pNth1 protein sequence coverage from Ala<sup>-1</sup> to Leu<sup>751</sup>. A signal at *m/z* 1630.78 that corresponds to pNth1 N-terminal peptide from Ala<sup>-1</sup> to Arg<sup>15</sup> was detected and its peptide sequence was confirmed using PSD analysis. All phosphorylated serine residues (at positions 20, 21, 60 and 83) were detected in the pNth1 protein bands obtained. Similarly, the use of trypsin for 30 min of partial proteolysis of pNth1 in the presence of Bmh1 generated peptides with sequence coverage determined from Thr<sup>56</sup> to Leu<sup>751</sup> and the first peptide found from the N-terminus was *m/z* signal 1579.70 corresponding to amino acid sequence Thr<sup>58</sup>–Leu<sup>70</sup> with confirmed phosphorylation on Ser<sup>66</sup>



**Figure 5** The role of individual phosphorylation sites of pNth1 for its interaction with 14-3-3 proteins *in vitro*

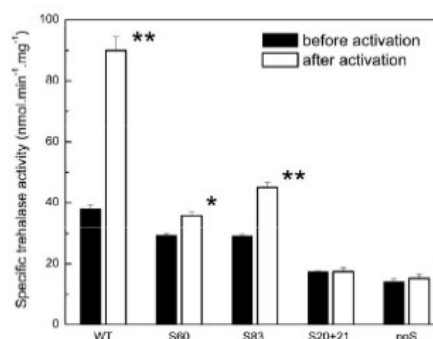
Specific trehalase activity of pNth1 WT alone (black bar) and pNth1 WT and mutants in the presence of Bmh1 (white bars). Only data in the presence of 30 mM trehalase are shown. Specific activity of trehalase is expressed as  $\mu\text{mol}$  of glucose (Glc) liberated per min per mg of protein. Results are means  $\pm$  S.D. for these experiments.

using PSD analysis. Taken together, these data confirm that the 14-3-3 proteins interact with the N-terminal segment of pNth1.

#### The importance of individual phosphorylation sites of pNth1 for its interaction with 14-3-3 proteins *in vitro*

Mass spectrometric analysis of pNth1 revealed that PKA stoichiometrically phosphorylates four serine residues (at positions 20, 21, 60 and 83) located within the N-terminal segment of the enzyme (Supplementary Table S2). Our data also show that the yeast 14-3-3 proteins bind pNth1 with high affinity, interact with its phosphorylated N-terminal segment and significantly enhance its enzymatic activity (Figures 2–4). To identify which phosphorylation sites are responsible for the interaction between pNth1 and the 14-3-3 proteins, we prepared four mutants containing a single phosphorylation site (denoted as S20, S21, S60 and S83) by mutating other serine residues to alanine. We also prepared six mutants containing all possible combinations of two phosphorylation sites (S20 + 21, S20 + 60, S20 + 83, S21 + 60, S21 + 83 and S60 + 83).

The differences in the 14-3-3-protein-binding affinity among all prepared singly and doubly phosphorylated pNth1 mutants were tested using both SV measurements and native TBE/PAGE analysis (Table 1, and Supplementary Figures S2 and S4 at <http://www.BiochemJ.org/bj/443/bj4430663add.htm>). The binding affinities of singly and doubly phosphorylated pNth1 mutants containing either Ser<sup>60</sup> or Ser<sup>83</sup> for both Bmh isoforms (with  $K_d$  values ranging from  $0.2 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-6}$  M) were found to be fully comparable with the binding affinity of pNth1 WT, which binds Bmh1 and Bmh2 with  $K_d$  values of  $0.15 \times 10^{-6}$  and  $0.25 \times 10^{-6}$  M respectively (Table 1). On the other hand, pNth1 mutants containing phosphorylation sites pSer<sup>20</sup> and pSer<sup>21</sup> only (pS20, pS21 and pS20 + 21) exhibited very weak binding with  $K_d$  values of  $10 \times 10^{-6}$  M. This suggests



**Figure 6** Activation of Nth1 mutants *in vivo*

Activation of trehalase was triggered by the addition of glucose to glycerol-grown *S. cerevisiae* *nth1Δ* cells expressing Nth1 WT, S60 (containing only Ser<sup>60</sup>), S83 (containing only Ser<sup>83</sup>), S20 + 21 (containing Ser<sup>20</sup> and Ser<sup>21</sup>) and Nth1-noS (all PKA sites were removed) from a multi-copy vector [38,40]. Specific trehalase activity was assayed before (black bars) and after (white bars) the activation by the addition of glucose. Specific activity of trehalase is expressed as nmol of glucose liberated per min per mg of protein. Results are means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ , \* $P < 0.02$ , \*\* $P < 0.01$ ) and are representative from a single experiment. Similar results were obtained in two additional experiments.

that phosphorylation sites Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> are essential for pNth1 binding to yeast 14-3-3 proteins.

Next, we studied the ability of both yeast 14-3-3 protein isoforms to enhance the enzymatic activity of all pNth1 mutants prepared (Figure 5). Trehalase activity was measured as glucose production in the presence of either 14 or 30 mM trehalose (data for 30 mM trehalose only are shown). These measurements revealed results similar to those of binding experiments. The activities of mutants containing only phosphorylation sites Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>21</sup> (pS20, pS21 and pS20 + 21) are very low and comparable with activities of unphosphorylated Nth1, pNth1-noS mutant and pNth1 WT in the absence of 14-3-3 proteins. On the other hand, mutants containing phosphorylation sites Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> show significantly higher levels of activation. Singly phosphorylated pS60 and pS83 as well as doubly phosphorylated mutants pS60 + 83, pS20 + 83 and pS21 + 83 exhibit activities comparable with the activity of pNth1 WT. Surprisingly, doubly phosphorylated mutants pS20 + 60 and pS21 + 60 show significantly reduced activities although possessing comparable binding affinities for 14-3-3 proteins as pNth1 WT or pS60 (Table 1). We may speculate that, in these two cases, the 14-3-3 protein binding affects the conformation of trehalase differently compared with other active complexes containing either phosphorylated Ser<sup>60</sup> alone or phosphorylated Ser<sup>83</sup> (both alone or in combination with the second phosphorylation site). In addition, no significant differences between Bmh1 and Bmh2 were observed for most samples, in good agreement with our binding experiments.

#### Activation of Nth1 mutants *in vivo*

To evaluate further the role of Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> in the activation of Nth1, we performed the activation studies *in vivo*. Five *nth1Δ* transformants expressing Nth1 WT, S60 (containing only one phosphorylation site, Ser<sup>60</sup>), S83 (containing only one phosphorylation site, Ser<sup>83</sup>), S20 + 21 (containing two

phosphorylation sites, Ser<sup>20</sup> and Ser<sup>21</sup>) and Nth1-noS (where all PKA sites were removed) trehalases were prepared. *S. cerevisiae* cells were grown in glycerol-containing medium and the activation of trehalase was triggered by the addition of glucose to a final concentration of 4% (w/v) [40]. The specific trehalase activities of extracts prepared from yeast cells before and after the activation are shown in Figure 6. The statistically significant activation of trehalase activity was observed only in cells expressing Nth1 WT, S60 and S83. The highest level of activation was observed for Nth1 WT (2.4-fold), whereas S60 and S83 mutants containing a single phosphorylation site were activated moderately (1.2-fold and 1.5-fold respectively). Cells expressing Nth1-noS and S20+21 showed no significant change in the specific trehalase activity upon the incubation with glucose. The level of trehalase activation observed in these experiments, however, is lower compared with our *in vitro* measurements (Figures 3 and 5). We assume that this difference might reflect an incomplete phosphorylation of Nth1 *in vivo* and/or a low concentration of Bmh proteins, whereas *in vitro* experiments were performed with stoichiometrically phosphorylated Nth1 and with an excess of Bmh proteins. In addition, all samples taken before the activation possessed a significant trehalase activity that probably reflects the Ca<sup>2+</sup>-dependent activity and/or the 14-3-3-dependent activity of Nth1 that was partially phosphorylated before activation. Taken together, the activation experiments *in vivo*, in agreement with *in vitro* data, suggest that Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup>, but not Ser<sup>20</sup> and Ser<sup>21</sup>, are important for the activation of Nth1.

## DISCUSSION

In the present study, our main aim was to investigate further so far unresolved details governing the 14-3-3 protein binding and activation of Nth1. We identified four residues of Nth1 that are phosphorylated by PKA *in vitro* (serine residues at positions 20, 21, 60 and 83), of which just Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> are important for the 14-3-3-protein-dependent activation of Nth1 (Table 1 and Figure 5). Both the binding and the enzymatic activity measurements revealed that the phosphorylation of either of these two sites is sufficient for high-affinity binding to 14-3-3 and full activation of pNth1 *in vitro*. In addition, limited proteolysis in conjunction with MS analysis confirmed that the 14-3-3 proteins interact with the N-terminal segment of pNth1 where these sites are located (Figure 4). Panni et al. [15] suggested that the interaction between yeast Nth1 and 14-3-3 proteins is mediated through phosphorylated Ser<sup>21</sup> and Ser<sup>23</sup>. The possible reason for the phosphorylation sites Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> not being detected could be the different methodological approach. In the present study, the singly (or doubly) phosphorylated mutants of full-length recombinant pNth1 were used to study the interaction with the 14-3-3 proteins, whereas Panni et al. [15] used short synthetic phosphopeptides to identify the 14-3-3-protein-binding sites of Nth1.

It is now well established that the dimeric nature of the 14-3-3 proteins with its two ligand-binding grooves arranged in an antiparallel fashion is very important for 14-3-3 protein functions as it allows simultaneous binding of two motifs [31,48]. Many 14-3-3-protein-binding partners contain two or more 14-3-3-protein-binding motifs, and our data strongly suggest that *S. cerevisiae* Nth1 is such an example. It has been shown that a minimal linker sequence of approximately ten residues is required between the two motifs to generate a tandem 14-3-3-protein-binding motif [31]. Therefore it is entirely possible that Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> of Nth1 form such a doubly phosphorylated 14-3-3-binding motif. On the other hand, it is very likely that Ser<sup>20</sup> and Ser<sup>21</sup>, the other two Nth1 sites phosphorylated by PKA

*in vitro* (Table 1 and Figure 1A), do not form the 14-3-3-protein-binding motif as it has never been observed so far that the 14-3-3 proteins would recognize the peptide containing two subsequent or very closely located phosphorylated residues [19]. Consistently, neither singly phosphorylated pS20 and pS21 nor doubly phosphorylated pS20+21 bind the yeast 14-3-3 isoforms with high affinity (Table 1). At the same time, all three mutants show very low enzymatic activities in the presence of 14-3-3 proteins (Figure 5). Similar results were obtained from the activation studies of Nth1 mutant forms *in vivo* that revealed significant activation only for Nth1 WT, S60 and S83, but not for S20+21 (Figure 6).

The 14-3-3 proteins have been shown to regulate the activity of a number of various enzymes from both yeasts and higher eukaryotes, including serotonin N-acetyltransferase, tyrosine and tryptophan hydroxylases, Raf kinases, Ask1 kinase and Yak1 kinase (reviewed in [17,18,21,22]). The mechanisms behind these regulations are mostly elusive, but can involve the direct structural change of bound enzyme, as has been demonstrated in the case of serotonin N-acetyltransferase [28]. Since all PKA phosphorylation sites/14-3-3-protein-binding motifs are located within the presumably disordered N-terminal segment outside the catalytic domain of Nth1 and the PKA-induced phosphorylation does not increase the enzyme activity of Nth1 by itself, it is reasonable to speculate that the 14-3-3 protein binding directly affects the structure of Nth1, probably of its catalytic trehalase domain, and hence increases its enzymatic activity.

Franco et al. [16] suggested that Ca<sup>2+</sup> ions are likely to be an integral part of active trehalase. We did observe a moderate activation of pNth1 in the presence of Ca<sup>2+</sup>; however, its effect was significantly weaker compared with the Bmh-induced activation (Figure 3B). A simultaneous presence of Ca<sup>2+</sup> and Bmh1 led to a suppression of both  $k_{cat}$  and  $K_m$  values for the hydrolysis of trehalose by pNth1 compared with the presence of Bmh1 only. As a result, the catalytic efficiency, defined as the  $k_{cat}/K_m$  ratio, remained relatively unchanged. However, it suggests that the mechanism of pNth1 activation by Ca<sup>2+</sup> differs from the 14-3-3-protein-dependent activation. The Ca<sup>2+</sup>-binding EF-hand-like motif is located between the segment containing all sites phosphorylated by PKA and the catalytic domain (Figure 1A), implying that Ca<sup>2+</sup> binding might also affect the interaction between pNth1 and the 14-3-3 protein and thus its effect on the enzymatic activity of pNth1.

In conclusion, our results show that *S. cerevisiae* Nth1 is phosphorylated by PKA at multiple sites, of which Ser<sup>60</sup> and Ser<sup>83</sup> are important for the 14-3-3-protein-mediated activation of Nth1. In addition, the 14-3-3-protein-dependent activation of phosphorylated Nth1 is significantly more potent compared with Ca<sup>2+</sup>-only-dependent activation.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Dana Velsova carried out the cDNA cloning, prepared recombinant proteins, performed all enzyme kinetics experiments and performed *in vivo* expression experiments. Eva Macakova performed limited proteolysis. Eva Macakova and Petr Vachy prepared recombinant proteins. Lenka Rezakova carried out the SV analysis. Miralaya Sulic generated and interpreted N/S data. Hana Sychrova supervised the preparation of constructs for *in vivo* expression experiments. Veronika Obsilova conceived the study. Veronika Obsilova and Tomas Obsil designed experiments, analysed the data and wrote the paper. All authors have approved the final paper.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pavla Heryzkova for help with the construction of Nth1 transformants used for *in vivo* experiments.

## FUNDING

This work was supported by the Czech Science Foundation [grant number P207/11/0455], Grant Agency of the Charles University [grant number 352111], Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic [grant number IAA501/108/01], Academy of Sciences of the Czech Republic [research project AV0220110509 of the Institute of Physiology and AV0250200510 of the Institute of Microbiology] and Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic [research project MSM0021820057].

## REFERENCES

- Kopp, M., Muller, H. and Holzer, H. (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 4769–4774.
- Kopp, M., Neaka, S. and Holzer, H. (1994) Corrected sequence of the yeast neutral trehalase-encoding gene (*NTH2*). *Biological Inventions*. *Gene* **150**, 403–404.
- Neaka, S. and Holzer, H. (1998) Molecular biology of trehalase and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**, 187–237.
- Croce, J. H., Crowe, L. M. and Chapman, D. (1994) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalase. *Science* **223**, 701–703.
- Goson, P., P. Glosar, I. M., Roberts, S., Wilson, R. A., Slonon de Graia, I., Garcia, A., Chiara, J. L. and Davies, G. J. (2007) Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4115–4119.
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Neaka, S. and Thevelein, J. M. (1999) Opposite roles of trehalase activity in heat shock recovery and heat shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **343**, 621–626.
- Neaka, S., Wechler, B., Destruelle, M. and Holzer, H. (1995) Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett.* **360**, 295–299.
- Jules, M., Bellon, G., Francois, J. and Parou, J. L. (2008) New insights into trehalase metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of *HPS1* reveals Atf1p-dependent trehalase mobilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 605–614.
- Neaka, S., Wechler, B. and Holzer, H. (1996) Deletion of the *NTH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEMS Lett.* **306**, 235–238.
- Uno, I., Matsumoto, K., Aochi, K. and Ishikawa, T. (1993) Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. *J. Biol. Chem.* **268**, 10667–10672.
- Ortiz, C. H., Miall, J. C., Tenas, M. N., Rozo-Padrino, G. R., Mitton, J. B. and Parok, A. D. (1983) Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. *J. Bacteriol.* **153**, 644–651.
- van der Blaz, J. B. (1974) Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalase degradation in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 583–587.
- Aop, H. and Holzer, H. (1989) Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast *BY951* mutant. *J. Biol. Chem.* **264**, 17583–17589.
- Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and White, J. M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* **20**, 301–305.
- Panni, S., Lanzoni, C., Volkmer-Unger, R., Cecconi, G. and Castagnoli, L. (2008) Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 33–63.
- Franco, A., Sora, T., Vicario-Soler, J., Panatos, V., Madrid, M., Garcia, M. and Cansado, J. (2003) A role for calcium in the regulation of neutral trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* **376**, 203–217.
- van Heusden, G. P. and Steensma, H. Y. (2006) Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast* **23**, 169–171.
- van Heusden, G. P. (2003) 14-3-3 proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* **84**, 287–298.
- Hu, H., Subramanian, H. R. and Masters, S. C. (2003) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 613–647.
- van Heusden, M. J., Steensma, H. Y. and van Heusden, G. P. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays* **23**, 636–646.
- MacKintosh, C. (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* **381**, 323–342.
- Bridges, D. and Morrison, G. B. (2005) 14-3-3 proteins: a number of functions for a numerical protein. *Soc. STKE* **2005**, W110.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamachi, T. and Fujisawa, H. (1987) Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tyrosyl-*l*-tryptophan 5-hydroxylase and tyrosine 3-monoxygenase in the presence of  $Ca^{2+}$ , calmodulin-dependent protein kinase II. *FEMS Lett.* **219**, 79–82.
- Khaja, P., Teske, K. and Haerik, J. (2001) Interaction of phosphorylated tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins: evidence for a phosphoserine 40-dependent association. *J. Neurochem.* **77**, 1087–1107.
- Ganguly, S., Munnahani, P., Steirbach, P. J., Klein, D. C. and Coon, S. L. (2001) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the melanin rhythm enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.67). *J. Biol. Chem.* **276**, 47739–47747.
- Zhang, L., Chen, J. and Hu, H. (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 8514–8515.
- Lae, P., Peik, S. M., Shin, C. S., Huh, W. K. and Hann, J. S. (2011) Regulation of yeast Ynf1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding. *Mol. Microbiol.* **79**, 633–645.
- Obšil, T., Gihrlendo, R., Klein, D. C., Ganguly, S. and Dyde, F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3 $\sigma$ /serotonin N-acetyltransferase complex: a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**, 267–267.
- Obšilová, Y., Nedbalová, E., Šillan, J., Bura, E., Herman, P., Vezor, J., Sule, M., Teisinger, J., Dyde, F. and Obšil, T. (2008) The 14-3-3 protein affects the conformation of the regulatory domain of human tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **47**, 1766–1777.
- Yaffe, M. B. (2002) How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *Trends Cell Biol.* **12**, 53–57.
- Kostelec, B., Sturm, A. T., Purkis, A., Parker, P. J. and McDonald, N. O. (2008) Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKG $\beta$ . *EMBO Rep.* **10**, 983–989.
- Velsova, D., Pezabkova, L., Štopanek, M., Nevotha, P., Herman, P., Vezor, J., Obšil, T. and Obšilová, Y. (2010) The C-terminal segment of yeast 5MH protein exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms. *Biochemistry* **49**, 3853–3861.
- Boura, F., Rezabkova, L., Brynda, J., Obšilová, Y. and Obšil, T. (2010) Structure of the human FOXO4-DBD DNA complex at 1.8 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 1351–1357.
- Houtman, J. C., Brown, P. H., Bowden, B., Yamaguchi, H., Appels, E., Smelson, L. E. and Schuck, P. (2007) Silencing multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Protein Sci.* **16**, 3C–42.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and laser light scattering. *Biophys. J.* **78**, 1606–1619.
- Sackliva, L., Ciska, R., Sule, M., Lihartova, I., Novak, P. and Šebo, P. (2009) Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-cleaving module from *Neisseria meningitidis* FpC. *Protein Sci.* **17**, 1934–1943.
- Larsen, M. R., Thirgholm, T. L., Jensen, O. N., Heppasari, P. and Jorgensen, I. J. (2005) Highly sensitive enrichment of phosphorylated peptides from peptic mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 873–886.
- Kraldova, L., Van Zeebroeck, B., Van Dielt, P. and Synyriova, H. (2011) The *Gardula arabica* GAP gene family encodes peroxisomes involved in general and specific amino acid uptake and sensing. *Eukaryotic Cell* **10**, 1218–1229.
- Kraldova, C., Ramos, J., Priller, S. and Synyriova, H. (2011) Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nth1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* **40**, 659–669.
- Pernambuco, M. B., Winderickx, J., Crauwels, M., Griffioen, G., Mager, W. H. and Thevelein, J. M. (1986) Glucose-triggered signalling in *Saccharomyces cerevisiae*: different requirements for sugar phosphorylation between cells grown on glucose and those grown on non-fermentable carbon sources. *Microbiology* **142**, 1775–1782.
- Ratovijacic, P., Dorazovic, Z., Brown, C. J. and Dunker, A. K. (2003) Prediction of boundaries between intrinsically ordered and disordered protein regions. *Proc. Symp. Biochemot.* **33**, 216–227.
- Schultz, J., Miloszi, F., Bork, P. and Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5887–5894.
- Amers, F. C., Van Dijk, P., Nicoli, J. B. and Thevelein, J. M. (1987) Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces fragilis* and the distinction between neutral and acidic trehalases. *Arch. Microbiol.* **167**, 202–209.
- Raschli, H. H., Bauer, M., Pfaller, J. and Sprinz, D. W. (1999) Sequences motifs determine structure and  $Ca^{2+}$ -binding by EF-hand proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 175–182.
- Lorcesborough, J. and Varino, K. (1984) Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* **219**, 511–516.
- Avigad, G., Yu, O. and Meilid, F. (1986) Intracellular trehalase of a hybrid yeast. *Biochem. J.* **97**, 715–722.
- Dall'asta-Ortiz, G. M., Ortiz, C. H., Miall, J. C. and Parok, A. D. (1986) Partial purification and characterization of the interconvertible forms of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 205–214.
- Johnson, C., Crowther, S., Stafford, M. J., Carpaio, D. G., Toth, R. and MacKintosh, C. (2010) Bioinformatics and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem. J.* **427**, 69–79.

Received 7 September 2011/5 February 2012; accepted 9 February 2012  
Published as BJ Immediate Publication 9 February 2012; doi:10.1042/BJP20111615

## **Příloha 4 - Primární sekvence pracovních konstruktů ve formátu FASTA**

### **Sekvence proteinového konstruktů 14-3-3ζ WT**

**>14-3-3ζ WT**

GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELS  
NEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEEKQQMAREYREKIETELRDICN  
DVLSSLLEKFLIPNASQAESKVFYLMKGDYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQEA  
FEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKD  
STLIMQLLRDNLTLWTSDTQGDEAEAGEGGEN

### **Sekvence proteinového konstruktů FOXO4<sub>11-213</sub> WT**

**> FOXO4<sub>11-213</sub> WT**

GSIIDLDPDFEPQSRPRSCWPLPRPEIANQPSEPPEVEPDLGEKVHTEGRSEPILLPSRLPE  
PAGGPQPILGAVTGPRKGGSRRNAWGNQSYAELISQAIESAPEKRLTLAQIYEWVVR  
TVPYFKDKGDSNSSAGWKNHSIRHNLSLHSKFIKVHNEATGKSSWWMLNPEGGKSGKA  
PRRRAASMDSSSKLLRGRSKAPKKKPS

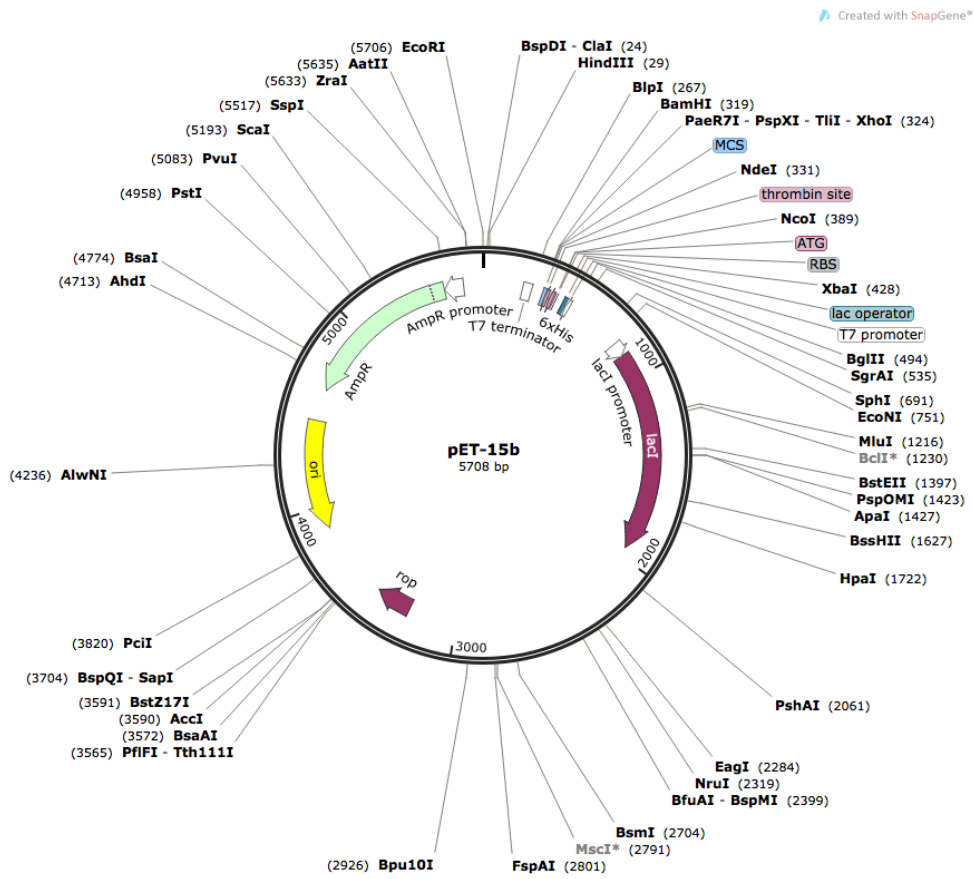
### **Sekvence proteinového konstruktů FOXO4<sub>82-207</sub> WT**

**> FOXO4<sub>82-207</sub> WT**

GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPGAVTGPRKGGSRRNAWGNQSYAELISQAIESAPE  
KRLTLAQIYEWVVRTVPYFKDKGDSNSSAGWKNHSIRHNLSLHSKFIKVHNEATGKSSW  
WMLNPEGGKSGKAPRRAASMDSSSKLLRGRSKA

# Příloha 5 - Bakteriální expresní vektory

## Vektor pET-15b



## Vektor pGEX-4T-1

