

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Autoreferát doktorské práce

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

RNDr. Petr Vácha

Obsah

1	ABSTRAKT	3
2	ÚVOD	3
2.1	FOX TRANSKRIPČNÍ FAKTORY	4
2.2	PROTEINY 14-3-3	4
2.3	14-3-3 ζ A FOXO4.....	5
3	CÍLE PRÁCE	5
4	METODY	6
4.1	OBEČNÉ METODY	6
4.1.1	<i>Příprava cDNA pomocí restrikčního štěpení</i>	6
4.1.2	<i>Cílená bodová mutagenese pomocí metody PCR</i>	6
4.1.3	<i>Expresse proteinů v prokaryotické expresním systému</i>	6
4.1.4	<i>Purifikace proteinů různými typy chromatografií</i>	6
4.1.5	<i>Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF</i>	6
4.2	EXPERIMENTÁLNÍ METODY	6
4.2.1	<i>Rezonance povrchového plazmonu (SPR)</i>	6
4.2.2	<i>Měření stacionární fluorescence</i>	7
4.2.3	<i>Měření časově rozlišené fluorescence</i>	7
4.2.4	<i>CD spektroskopie</i>	7
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	7
5.1	PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH KONSTRUKTŮ	7
5.2	STUDIUM MOLEKULÁRNÍCH MECHANISMŮ INTERAKCE SLEDOVANÝCH KOMPLEXŮ	8
5.2.1	<i>Studium interakcí FOXO4-DBD s proteinem 14-3-3ζ</i>	8
5.2.2	<i>Studium mechanismu vazby FOXO4-DBD s DNA</i>	10
6	ZÁVĚR	12
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	12
8	CURRICULUM VITAE	13

1 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 dvěmi 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.

2 Úvod

Výzkum, na jehož základě vznikla tato práce, se zabývá mechanismem interakce trojice nitrobuněčných objektů eukaryotické buňky. Jsou jimi proteiny FOXO4 a 14-3-3 a molekula chromozomální DNA. Tyto tři objekty spolu vytváří soustavu navzájem se ovlivňujících elementů. Hlavním tématem tohoto výzkumu je detailní 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 účastnících regulace buněčného cyklu, odpovědi na buněčný stres a regulace řízené buněčné smrti - apoptózy.

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.

2.1 FOX 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, diferenciace, 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).

2.2 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.

2.3 14-3-3ζ a FOXO4

Regulační protein 14-3-3ζ je jedním z nejrozšířenějších typů izoform savčích proteinů 14-3-3. Transkripční faktor FOXO4 je jeden z jeho nejvýznamnějších vazebných partnerů. Společně se podílejí například 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) v místech aminokyselinových zbytků threoninu 28, serinu 193 a serinu 258 (Tran H et al., 2003; Woods YL et al., 2002; Obsil T et al., 2003).

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 se proteinem 14-3-3, ale též přítomnost, nebo spíše přístupnost, 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 (serin 193). Jak již bylo zmíněno dříve, fosforylace serinového zbytku 193 nacházejícího se mezi dvěma částmi této neklasické NLS FOXO transkripčních faktorů, 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 lyzinová rezidua, což odpovídá rozpoznávacímu motivu pro tzv. jaderný exportní systém (Brownawell AM et al., 2001). Dle těchto poznatků lze soudit, 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).

3 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.

4 Metody

4.1 Obecné metody

Metody označené zde jako obecné jsem využíval k přípravě a validaci konstruktů proteinů pro experimentální měření.

4.1.1 Příprava cDNA pomocí restričního štěpení

Příprava cDNA se sekvencí vybraných částí genů kódujících studované proteiny bylo prováděno pomocí amplifikace vybraných částí genů spojeným s introdukcí specifických štěpících míst do sekvence insertu pomocí metody PCR. Dále byl insert a cílový plazmid připraven štěpením v unikátních štěpících místech. Následně byly obě komponenty spojeny ligací a ověřeny restričním štěpením a sekvenací.

4.1.2 Cílená bodová mutagenese pomocí metody PCR

Bodové mutace byly do sekvence DNA kódující vybrané úseky studovaných proteinů introdukovány pomocí metody PCR s použitím primerů, kde v jinak komplementární sekvenci byla změněna 1 původní báze na námi požadovanou bázi.

4.1.3 Expres proteinů v prokaryotické expresním systému

Expres proteinů byla prováděna v expresním kmeni *E.coli* BL21(DE3). Indukce exprese bylo prováděna pomocí IPTG při OD kultury 0,6 - 0,8. Expres probíhala 15 - 20h při 20°C a otáčkám 200 rpm.

4.1.4 Purifikace proteinů různými typy chromatografií

Proteinové konstrukty byly purifikovány pomocí afinitní kotvy (His-tag, nebo GST) a dále na základě odlišných fyzikálně-chemických vlastností jako je pI (kationtová a aniontová výměna) nebo velikost (gelová permeační chromatografie). Různé typy chromatografie byly prováděny gravitačně nebo na přístroji HPLC ÄKTA (Amersham Biosciences).

4.1.5 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Pomocí této metody byla 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 na hmotnostním spektrometru BIFLEX (Bruker-Franzen).

4.2 Experimentální metody

Metody označené zde jako experimentální jsem používal k validaci proteinových konstruktů a k získání experimentální dat.

4.2.1 Rezonance povrchového plazmonu (SPR)

Metoda SPR byla použita ke sledování interakce alaninových mutantů FOXO4-DBD s DNA s motivem IRE a DBE v reálném čase. Přístroj ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System (Bio-rad, Hercules) měří změnu indexu lomu na tenké vrstvě zlateného povrchu (tzv. čipu). Tato změna indexu lomu je proporcionalní k okamžité koncentraci látek na povrchu čipu. Díky tomu, je možné sbírat data v reálném čase a získat údaje potřebné ke stanovení rovnovážné disociační konstanty (K_D), nebo kinetické disociačních (k_D) a asociační konstanty (k_A).

4.2.2 Měření stacionární fluorescence

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 Perkin Elmer LS50B změřena intenzita fluorescence po excitaci fluorescenční sondy vhodnou vlnovou délkou ve dvou navzájem kolmých rovinách. Ze změny poměru intenzity polarizovaného záření byla stanovena anizotropie fluorescence v různých bodech a vyhodnocena její změna.

4.2.3 Měření časově rozlišené fluorescence

Základem této metody, která byla použita pro sledování změn v oblasti fluorescenční sondy, je opakovaná pulzní excitace fluorescenční sondy, 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 " τ ", 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 polaritativy prostředí, pH, teploty, koncentrace iontů, či přítomnosti zhašedla. 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)

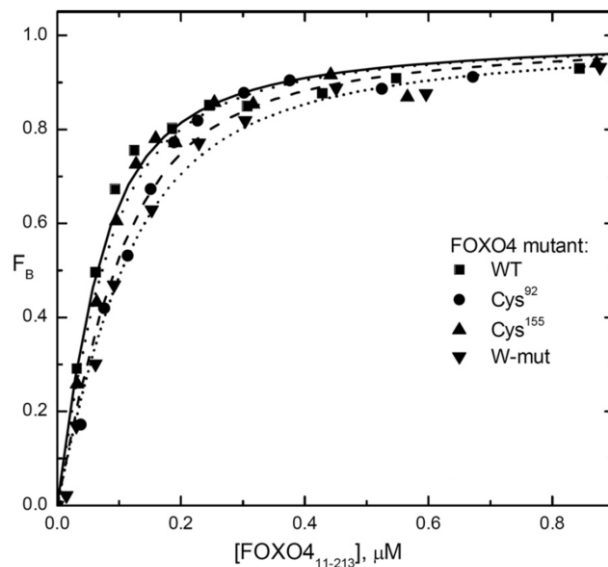
4.2.4 CD spektroskopie

Metoda CD spektroskopie je založena na poznatku, že 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 extinkčních koeficientech pro levo- a pravotočivou složku, hovoříme o tzv. cirkulárním dichroismu (CD). Analýza CD spekter byla použita pro validaci nativní sekundární struktury exemplárních proteinových konstruktů.

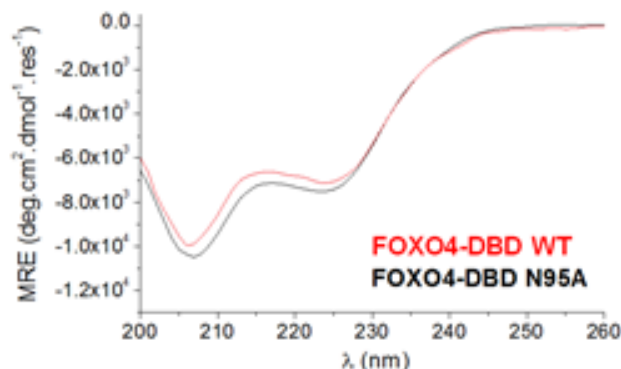
5 Výsledky a diskuse

5.1 Příprava pracovních konstruktů

Pomocí výše zmíněných metod byly připraveny a validovány proteinové konstrukty specificky designované pro plánované experimenty. Výsledkem purifikace proteinových konstruktů bylo obvykle množství 5 - 10 mg čistého proteinu o koncentraci 2 - 4 mg/ml. Ověření nativních vlastností proteinů (strukturní integrita a vazebné vlastnosti) pomocí vazebných esejí, či CD spektroskopie bylo pro exemplární proteinové konstrukty vyhodnoceno pozitivně, jak ukazují například obrázky 1 a 2.



Obr. 1 Příklad vazebných izoterm pro ověření DNA vazebných vlastností konstruktů FOXO4₁₁₋₂₁₃. Při vynesení parametru F_B (frakce navázané DNA) oproti koncentraci titrovaného FOXO4₁₁₋₂₁₃ se vazebné izotermy jednotlivých konstruktů FOXO4₁₁₋₂₁₃ téměř překrývají s vazebnou izotermou FOXO4₁₁₋₂₁₃ WT, což ukazuje na jejich nezměněné vazebné vlastnosti.

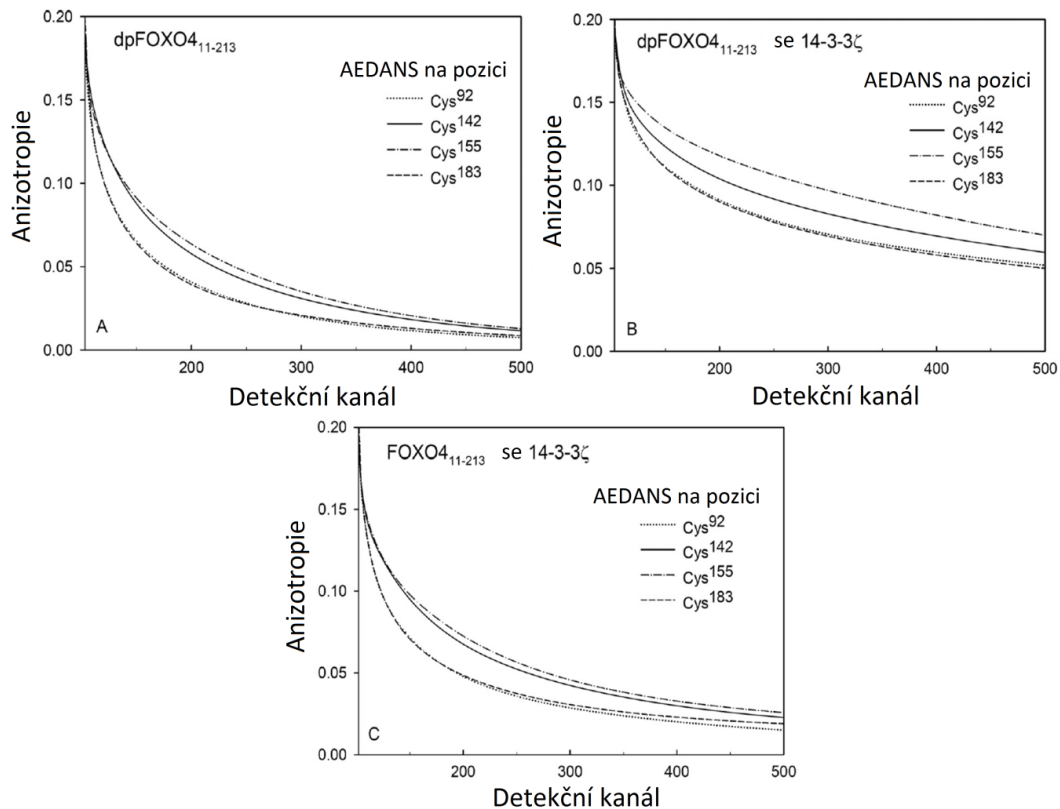


Obr. 2 Srovnání CD spektra vybraného proteinového konstruktů FOXO4-DBD s CD spektrem s FOXO4-DBD WT. Grafické vyjádření výsledků CD spektroskopie vybraného proteinového konstruktů FOXO4-DBD (mutant N95A) (černá křivka) ukazuje srovnání a shodu s CD spektrem FOXO4-DBD WT (červená křivka). Ze shrnutí je patrné, že charakter křivky se nemění, což ukazuje na nezměněnou strukturu mutantních forem FOXO4-DBD.

5.2 Studium molekulárních mechanismů interakce sledovaných komplexů

5.2.1 Studium interakcí FOXO4-DBD s proteinem 14-3-3ζ

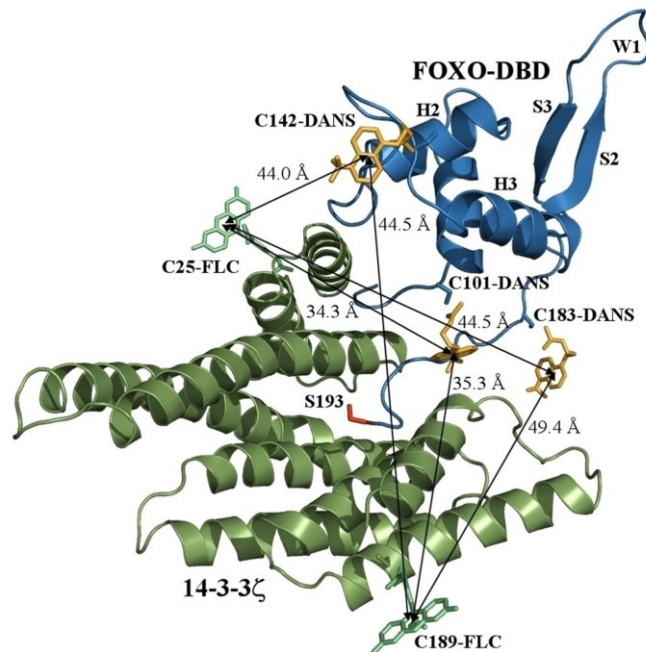
Sledování časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ukázalo, že navázání proteinu 14-3-3 ovlivňuje fluorescenční vlastnosti sondy AEDANS navázané na čtyřech různých místech ve struktuře FOXO4-DBD, která reprezentující zajímavé oblasti DNA vazebného rozhraní proteinu FOXO4. Z těchto pozorování je patrné, že změny ve fluorescenčních vlastnostech sondy AEDANS jsou způsobeny sterickým stíněním fluoroforu po navázání 14-3-3ζ proteinu, což ukazuje na přítomnost fyzického kontaktu mezi 14-3-3ζ proteinem a označenými regiony FOXO4-DBD. Tato pozorování jsou dále konzistentní s výsledky měření časově rozlišené anizotropie fluorescence (Obr. 3), které vypovídají o zamezení pohybu označených segmentů FOXO4-DBD při vazbě dpFOXO4 (fosforylovaný FOXO4) a proteinu 14-3-3.



Obr. 3 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.

Výsledky z pozorování časově rozlišené fluorescence tryptofanů ve struktuře FOXO4-DBD, ukazují na to, že při vazbě 14-3-3ζ nedochází k výraznějším konformačním změnám v oblasti Trp173 a Trp174, které by mohly být možnou příčinou změněné DNA vazebné afinity.

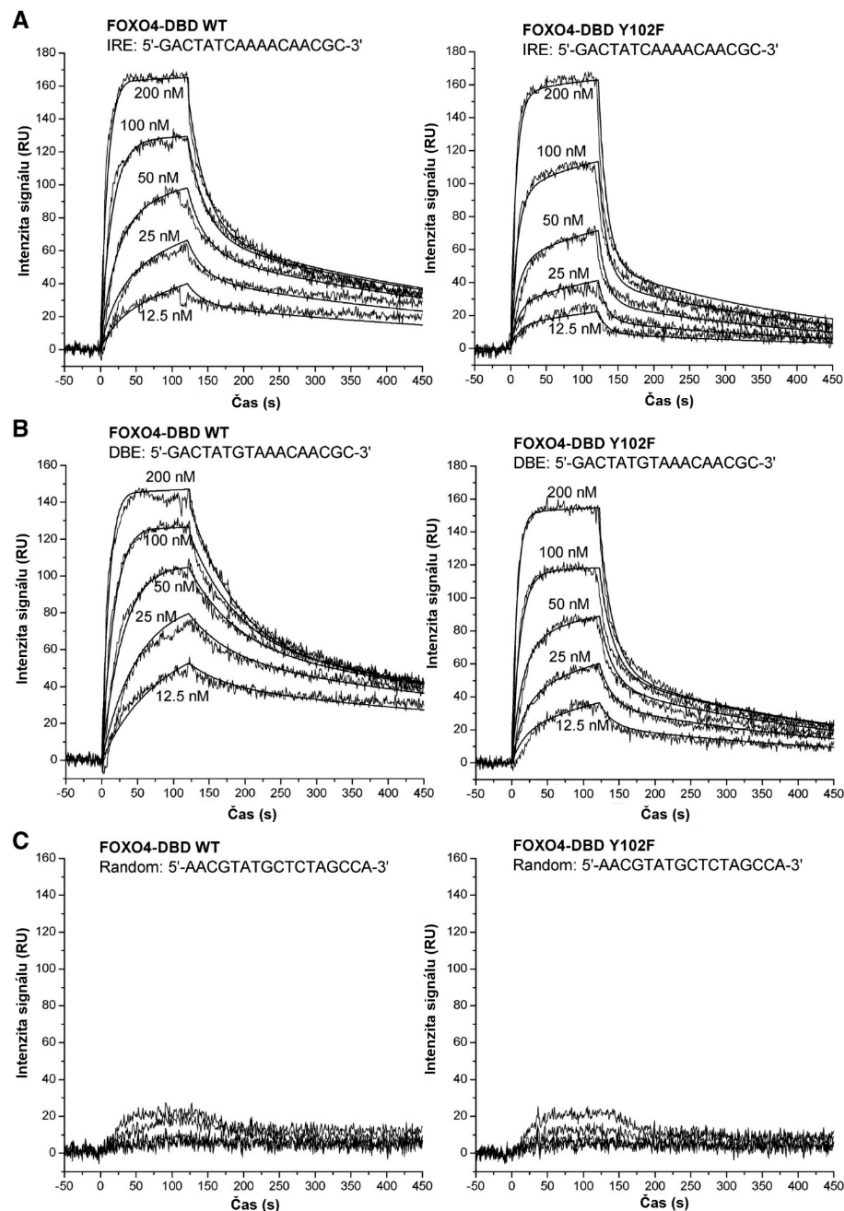
Dalším záměrem výzkumu bylo vytvoření strukturního modelu komplexu FOXO4:14-3-3ζ a zmapování interakcí mezi FOXO4 a 14-3-3ζ. Za tímto účelem bylo pomocí metody FRET stanoveno šest intermolekulárních vzdáleností v komplexu FOXO4-DBD:14-3-3ζ. Model tohoto komplexu, pFOXO4:14-3-3ζ (Obr. 4), ukazuje, že FOXO4-DBD je zakotven v centrální kanálku dimerního proteinu 14-3-3ζ stejným způsobem jaký byl publikován v předchozích studiích zabývajících se komplexem 14-3-3ζ se Serotoninovou N-acetyltransferázou (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 pozorování. Dalším aspektem vazby, který je plně v souladu jak s našimi výsledky pozorování fluorescence, tak s výsledky publikovanými dříve (Obsilova V et al., 2005) je mobilita DNA vazebné domény FOXO4 při vazbě se 14-3-3ζ, která podle všeho zůstává téměř nezměněná.



Obr. 4 Strukturní model komplexu FOXO4-DBD:14-3-3 ζ s vyznačenými intermolekulárními vzdálenostmi. Strukturní model komplexu FOXO4-DBD:14-3-3 ζ nabízí lepší představu vzájemné pozice studovaných proteinů, čímž umožňuje přehlednější interpretaci výsledků dalších měření. V modelu jsou šipkami vyznačeny intermolekulární vzdálenosti získané pomocí FRET.

5.2.2 Studium mechanismu vazby FOXO4-DBD s DNA

Kinetické parametry interakce alaninových mutantů FOXO4-DBD s dsDNA (s motivem IRE, DBE) byly spočítány z celkového proložení koncentračně závislých vazebných křivek získaných metodou SPR (Obr. 5). Pro získání asociačních a disociačních rychlostních konstant byla data konfrontována jednoduchým Langmuirovým 1:1 modelem a dvou-stavovým modelem zohledňujícím konformační změny. Dvou-stavový model byl na základě lepšího parametru redukovaného χ^2 vyhodnocen jako model, který lépe popisuje průběh asociace a disociace komplexu FOXO4-DBD:dsDNA. Zjištěné hodnoty asociační (k_{a1} , k_{a2}) a disociační (k_{d1} , k_{d2}) rychlostní konstanty pro oba vazebné motivy dsDNA DBE a IRE ukazují, že FOXO4-DBD WT váže oba typy dsDNA s K_D v nanomolárním rozpětí s vazebnou afinitou pro dsDNAs 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 ΔC , zatímco při vazbě na dsDNA s motivem DBE došlo k největšímu poklesu u mutantů S101A, Y102F, N148A, H152A, K162A a ΔC . V souladu s předchozími studiemi jsme pozorovali významné rozdíly v oblastech N-koncové části proteinu FOXO4, v oblasti smyčky mezi helixy H2 a H3 a v oblasti křídel W1 a W2 (Tsai KL et al., 2007; Boura E et al., 2010; Weigelt J et al., 2001; Wang F et al., 2008).



Obr. 4 Senzogramy získané pomocí SPR při měření kinetiky interakce FOXO4-DBD s DNA. Uvedené senzogramy představují srovnání dat pro různé koncentrace vybraného mutantu ve srovnání s formou WT. 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. Část A 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 nezávislým náhodným (Random) motivem DNA.

Konformační změny pozorované metodou SPR byly potvrzeny měřením dohasínání časově rozlišené anizotropie fluorescence na tryptofanových zbytcích FOXO-DBD. Výrazná změna v hodnotě součtu amplitud odpovídajících rychlým pohybům $\beta_1 + \beta_2$ a absence rotačně korelačního času ϕ_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.

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 strukturní 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 strukturního 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 strukturní 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
- 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, 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
- 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
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. *Nature* 1993 Jul 364(6436):412-20
- Davis RJ, D’Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. *Cancer Res* 1994 Jun 54:2869–2872
- 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
- Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. *Blood* 1997 Nov 90(9):3714-9
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. *Genes Dev* 2000 Jan 14:142–146
- Mazet F, Yu JK, Liberles DA, Holland LZ, Shimeld SM. *Gene* 2003 Oct 316:79–89
- Moore BW, Perez VJ, Carlson FD. *The Marine Biological Laboratory* 1967 pp343–359
- 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
- Obsilova V, Vecer J, Herman P, Pabianova A, Sulc M, Teisinger J, Boura E, Obsil T. *Biochemistry* 2005 Aug 44(34):11608-17

- Parry P, Wei Y, Evans G *Genes Chromosomes. Cancer* 1994 Oct 11(2):79-84
- 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
- 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
- Woods YL, Rena G. *Biochem Soc Trans* 2002 Aug 30(4):391-7

8 Curriculum vitae

PETR VÁCHA RNDr. (*4. 6. 1981)

Vzdělání	2000 – 2006	Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta Magisterské studium, obor Učitelství biologie a chemie, titul Mgr.
	2008 – 2013	Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta Postgraduální studium, obor Fyzikální a Makromolekulární chemie, titul RNDr.
Profesionální praxe	2006 – 2008	APRONEX s.r.o. Odborný pracovník v laboratoři Příprava rekombinantních proteinů v prokaryotických a eukaryotických expresních systémech.
	2003 – 2012	FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČR Studentská vědecká síla a odborný pracovník VŠ Studium proteinových komplexů
	2013 - nyní	SEQme s.r.o. Seq & qPCR Company Odborný pracovník v laboratoři Provádění sekvenačních analýz metodami 1. a 2. generace

Publikace a přednášky

- Vacha P.**, Silhan J., Vecer J., Herman P., Sulc M., Obsilova V., Obsil T. Study of the interactions between 14-3-3 protein and DNA-binding domain of forkhead transcription factor FOXO4
FEBS Journal (2009) **276** (Suppl. 1) 95–356
- 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.
- 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
- 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.

Odborné kurzy a stáže

RNA-seq Bioinformatics Workshop 2014 (kurz)

16. - 17.10 2014 / ecSeq Bioinformatics / Leipzig / Germany

(analýza sekvenačních dat z přístrojů pro NGS)

2015 Workshop on genomics (kurz)

11. - 23.1 2015 / Evomics / Český Krumlov / ČR

(analýza sekvenačních dat z přístrojů pro NGS)

Roy J. Carver Biotechnology Center University of illinois (stáž)

2.- 3.4. 2015 / Dna service lab - Alvaro Hernandez Ph. D./Champaign-Urbana/Illinois

(příprava sekvenačních knihoven pro sekvenátory HiSeq2500 a MiSeq)