

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**Cílená mutagenese fosforylačních míst
Forkhead transkripčního faktoru FoxO4**

Bakalářská práce

Tereza Šafránková

Školitel: RNDr. Tomáš Obšil, PhD.

Praha 2006

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Tomáše Obšila, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. 8. 2006

podpis Tereza Šafránková

Tereza Šafránková

Poděkování

Na tomto místě si dovoluji poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. za odbornou pomoc, trpělivost a všestrannou podporu v celém průběhu práce.

Současně bych také ráda poděkovala RNDr. Janu Šilhánovi za pomoc při experimentální práci a praktické připomínky.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
1. Úvod	7
2. Přehled literatury	9
2.1 FoxO transkripční faktory	9
2.2 Vliv FoxO proteinů na různé buněčné děje	10
2.3 14-3-3 proteiny	11
2.4 Význam fosforylace proteinkinasou B	12
2.5 Forkhead transkripční faktor FoxO4	13
2.6 Komplex 14-3-3 protein : FoxO4	15
3. Cíl práce	17
4. Materiál a metody	18
4.1 Cílená bodová mutagenese	18
4.2 Izolace plasmidové DNA	18
4.3 Restrikční analýza plasmidové DNA	19
4.4 Agarosová elektroforesa DNA	20
4.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
4.6 Dpn I štěpení	23
4.7 Transformace bakterií <i>E. Coli</i> plasmidovou DNA	24
4.8 Expres rekombinantního proteinu AFX11-213	25
4.9 SDS-PAGE	26
5. Výsledky	28
5.1 Restrikční analýza a agarosová elektroforesa plasmidové DNA	28
5.2 Mutagenezní PCR	28
5.3 Transformace kompetentních buněk <i>E. Coli</i> kmen DH5α (JM109)	29
5.4 Izolace plasmidové DNA	29
5.5 Sekvence mutantních forem DNA proteinu FoxO411-213	29
5.6 Test exprese rekombinantního proteinu FoxO411-213	31
5.6.1 Transformace bakterií <i>E. Coli</i> BL21(DE3)	31
5.6.2 SDS-PAGE analýza vzorků expresního testu	31
6. Diskuse	34
6.1 Hypotéza molekulové kovádky	34
6.2 Konstrukce fosforylačních mutant	36
7. Závěr	38
8. Seznam použité literatury	39
9. Přílohy	41

Seznam použitých zkratek

bp	base pair (pár bazí)
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
CK1	casein kinase 1 (kaseinkinasa 1)
DNA	DeoxyRibonucleotid Acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxyribonucleosid triphosphate (deoxyribonukleosid trifosfát)
DYRK1	dual-specificity regulated kinase
E. coli	Escherichia coli
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic Acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
FoxO	Forkhead box O
IGF	insulin growth factor (insulinový růstový faktor)
IGFR	insulin growth factor receptor (receptor insulinového růst.faktoru)
Ins	insulin
InsR	insulinový receptor
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
K_D	disociační konstanta
LB	kultivační medium dle Luria – Bertani
NES	nuclear export sequence (jaderná exportní sekvence)
NLS	nuclear localization sequence (jaderná lokalizační sekvence)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (nukleární magnetická rezonance)
p21kip1	cyclin-dependent kinase inhibitor
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIP ₂	fosfatidylinositol- 4,5 bisfosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5 trisfosfát
PKB	proteinkinasa B
rpm	rotation per minute (počet otáček za minutu)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecylsulfát sodný)

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (polyakrylamidová elektroforesa v prostředí dodecylsulfátu sodného)
TBE	Tris-Borate-EDTA (Tris-kyselina boritá-EDTA)
TEMED	N,N,N,N -tetramethyl-ethylenediamin
Tris-HCl	tris (hydroxymethyl) aminomethan hydrochloride

1 ÚVOD

Buněčný cyklus je velmi složitý děj, jehož časování a regulace jsou řízeny velmi důsledně. Seběmenší chyba či porucha, ať už jde o poškození DNA nebo o zablokování funkce jednoho z proteinů, může mít zhoubné následky a většinou vede ke smrti buňky, nebo ke zhoubnému bujení. Jednou z mnoha buněčných funkcí, které vykonávají proteiny, je eukaryotická regulace genové exprese. Kontrola syntézy proteinů probíhá na úrovni transkripce - kdy a jak často je gen přepisován, sestřihu a dalších úprav primárního transkriptu, translace a aktivace nebo inaktivace vzniklých proteinů [1]. Pro zahájení transkripce je nutná přítomnost *transkripčních faktorů*, což jsou regulační proteiny, které se vážou na regulační oblasti promotoru nebo zesilovače transkripce [2]. Transkripční faktor pak jinou částí své molekuly (tzv. transaktivační doménou) interaguje s komplexem RNA polymerasy a aktivuje, případně naopak inhibuje transkripci regulovaného genu. Indukce aktivity transkripčních faktorů se uskutečňuje přes jejich fosforylaci a defosforylaci, vazbu specifického ligandu, nebo uvolnění navázaného inhibitoru. Fosforylace je katalyzována enzymy proteinkinasami, které přenášejí záporně nabitou fosfátovou skupinu na postranní řetězce v proteinu, což vyvolá změnu jeho konformace. Mění se biochemické vlastnosti proteinu, jeho umístění uvnitř buňky, vazebné schopnosti či zvýšená citlivost k proteolyse. Defosforylací se navozuje původní stav. Regulace fosforylací se uplatňuje při zprostředkování hormonálních vlivů na buňku [3] (kapitola 2.4). Membránové receptory, které obsahují specifické vazebné místo pro signální molekulu - hormon nebo neurotransmitter, aktivují po vytvoření komplexu signální dráhy, v nichž dochází k cyklické fosforylaci a defosforylaci molekul proteinů, z nichž poslední fosforyluje transkripční faktor [4].

Většina eukaryotních transkripčních faktorů je však součástí komplexu regulačních proteinů, jehož všechny části jsou nezbytné pro expresi daného genu ve správný čas a v požadovaném množství jako odpověď na konkrétní podmínky. Molekulární mechanismy spolupráce všech regulačních proteinů při určení konečné úrovně exprese genu nejsou však zatím zcela objasněny [1].

Tato bakalářská práce je součástí projektu, týkající se zmapování molekulárního mechanismu funkce proteinů a proteinových komplexů. V rámci tohoto projektu je

studován mechanismus regulace forkhead transkripčního faktoru AFX (FoxO4). Hlavními cíli je charakterizace strukturních změn transkripčního faktoru AFX indukovaných vazbou 14-3-3 proteinu a dále studium vlivu fosforylace a vazby 14-3-3 proteinu na DNA-vazebné vlastnosti AFX.

2 PŘEHLED LITERATURY

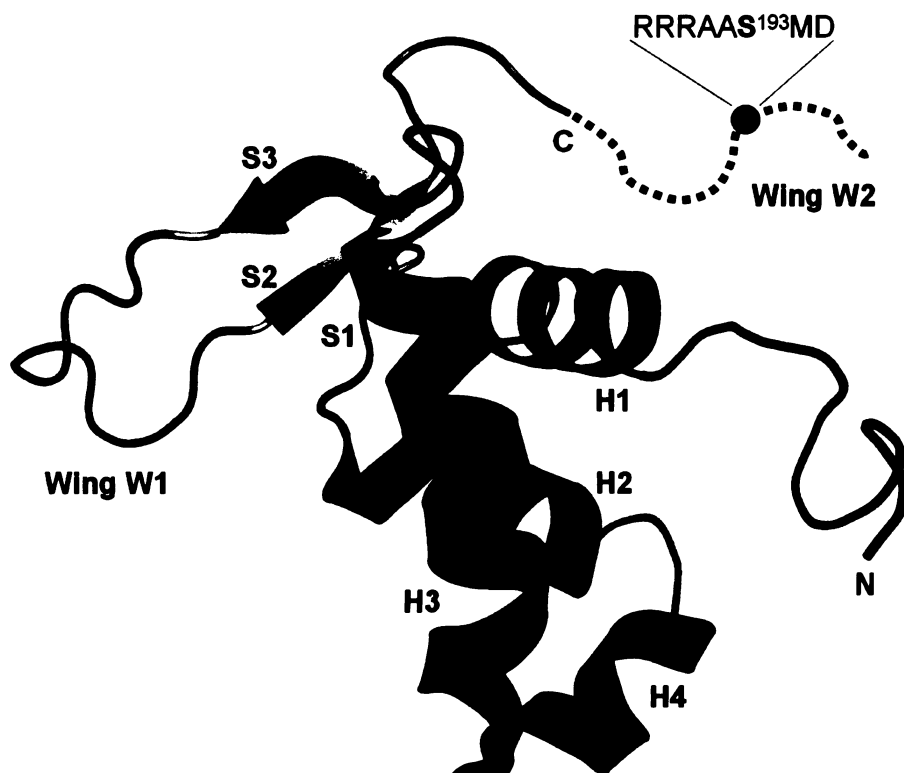
2.1 FoxO transkripční faktory

Forkhead box (Fox) je velká rodina strukturně příbuzných transkripčních faktorů zahrnující přibližně 90 členů rozmanitých druhů v rozsahu od kvasinky po člověka. Tyto proteiny slouží jako regulační elementy v řadě důležitých buněčných procesů např. v embryogenesi, regulaci metabolismu, kontrole buněčného cyklu, reakci na stres, ale i v tumorigenesi (iniciace a růst nádorů na mozku) [5, 6, 7].

Společnou charakteristickou vlastností všech Fox tříd transkripčních faktorů je přítomnost vysoce homologní sekvence „forkhead“ (fork – vidlička, rozvětvení; head – hlava) *DNA vazebné domény*, angl. DNA-binding domain (dále pouze DBD). Strukturně tato doména obsahuje okolo 100 aminokyselinových zbytků uspořádaných do tří α -helixů shluknutých proti sobě navzájem a tří antiparalelních krátkých úseků β -struktury, z kterých vyčnívají dva charakteristické ohyby zvané též „křídla“ [8, 9] (*obr. 2.1*). Analogický transkripční faktor byl také nalezen u octomilky *Drosophila melanogaster* [8]. Tento protein se nazývá dFoxO.

FoxO proteiny patří do malé „O“ podskupiny rodiny Forkhead transkripčních aktivátorů. Doposud byly identifikovány čtyři savčí transkripční faktory: lidské FoxO4 (AFX), FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHR-L1) a myší FoxO6 [7, 9].

Homologem savčích FoxO proteinů je DAF-16, identifikovaný v hlístici *Caenorhabditis elegans*, řízený stejně jako proteiny FoxO obdobou signální dráhy PI3K-PKB [10].



Obr. 2.1 Sekundární struktura DNA-vazebné domény transkripčního faktoru **FoxO4**. Červeně jsou znázorněny α -helixy, žlutě β -struktury a zeleně charakteristické ohyby (křídla).

2.2 Vliv FoxO proteinů na různé buněčné děje

Důležitost funkce FoxO transkripčních faktorů vyplývá z jejich účasti v několika signálních kaskádách, ať už jde o regulaci buněčného cyklu, apoptosu (programovaná buněčná smrt) nebo kontrolu metabolismu [9]. Funkce nebo lépe řečeno dysfunkce FoxO transkripčních faktorů zasahuje do nejrůznějších patologických dějů, od rakoviny, přes diabetes, po stárnutí organismu [10, 11].

Regulace buněčného cyklu FoxO transkripčními faktory spočívá v pozastavení progresu nebo až uvěznění buňky v G_1 nebo i v G_2 fázi buněčného cyklu. V M fázi naopak TF regulují expresi genů, které jsou nezbytné pro správné rozdělení buňky během mitosy [12, 13]. Některé FoxO proteiny se ukázaly být spojeny se vznikem nádorů, což je naznačeno objevem, že sekvence kódující AFX proteiny je součástí chromozomální translokace u akutní leukemie [14]. Bylo prokázáno, že špatná regulace metabolických drah, jejichž součástí jsou i FoxO transkripční faktory, a nebo samotná dysfunkce FoxO, může mít podíl na vzniku nádorů, jelikož např. produkt FoxO regulovaného genu

p27kip1 potlačuje vznik nádorů [15]. FoxO proteiny regulují i geny oxidativních enzymů, které podporují odolnost buňky vůči volným radikálům a tak vlastně zpomalují stárnutí buňky [11, 16] Důležitá je i regulace apoptosy, kdy FoxO proteiny indukují buněčnou smrt regulací transkripce řady genů [7, 10].

Všechny FoxO proteiny účinkují jako aktivátory transkripce přímou vazbou na DNA sekvenci o různé délce (11-15 nukleotidů) obsahující hlavní konzervativní rozpoznávací motiv 5' -TTGTTTAC-3') [9]. FoxO proteiny interagují s DNA jako monomery, přičemž hlavní kontaktní rozhraní představuje jeden ze tří alfa helixů. FoxO proteiny ovlivňují transkripce genů i nepřímým způsobem skrze interakci s jadernými receptory, na které se váží různé druhy ligandů [10].

2.3 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou rodina regulačních proteinů vyskytujících se ve všech eukaryotních organismech. Tyto signální molekuly zasahují do mnoha biologicky důležitých procesů od přenosu signálu, přes kontrolu buněčného cyklu až po apoptosu [9, 17]. Doposud bylo identifikováno sedm isoform (variant) 14-3-3 proteinů v savčích buňkách označovaných β , γ , ϵ , η , σ , τ (θ) a ζ a více než patnáct v rostlinách [18]. Všechny 14-3-3 isoformy tvoří velmi stabilní homo a heterodimery a sdílí velmi podobnou trojrozměrnou strukturu. Dva monomery, každý sestávající z devíti antiparalelních α -helixů, vytvářejí miskovitý tvar dimeru s centrálním „U“ kanálem širokým cca 40 nm. Po obou stranách „U“ kanálu se nachází jeden vazebný žlábek. Hlavním rysem 14-3-3 proteinů je jejich schopnost vázat jiné proteiny nebo peptidy. Podmínkou efektivní interakce mezi 14-3-3 proteinem a jeho vazebným partnerem je fosforylace specifického motivu v molekule vazebného partnera. 14-3-3 proteiny rozpoznávají motiv obsahující buď fosforylovaný serin (pS) nebo fosforylovaný threonin (pT) - dva optimální (ne však nezbytné) vazebné motivy pro 14-3-3 jsou RSXpSXP a RX(Y/F)XpSXP, kde R=arginin, X je libovolný aminokyselinový zbytek, P=prolin, Y= tyrosin, S=serin a F=fenylalanin. Celkově existuje více než sto vazebných partnerů 14-3-3 proteinů, kteří obsahují ve své struktuře alespoň jeden vazebný motiv pro 14-3-3 vazbu [9, 17, 18]. Je také možné, že se dva různé vazební partneři mohou současně vázat na jeden dimer 14-3-3. Tato vazba pak může zprostředkovávat jejich vzájemnou efektivní interakci [18]. Efekt jaký má navázání 14-3-3 proteinu na vazebného partnera je dán spíše funkcí vazebného partnera

v buněčném metabolismu, neboť mechanismus vazby 14-3-3 je zřejmě víceméně stále stejný.

Interakce polypeptidu s 14-3-3 proteinem spočívá v navázání fosforylovaných aminokyselinových zbytků do postranních vazebných žlábků v „U“ kanálu 14-3-3. 14-3-3 proteiny pracují jako molekulová „lešení“ modulující strukturu svých vazebných partnerů. Jako výsledek této strukturní změny mohou 14-3-3 proteiny ovlivnit jejich enzymatické vlastnosti (pokud vazebným partnerem je enzym), mohou zprostředkovat dalším proteinům interakce s cílovými proteiny, nebo regulovat vnitrobuněčnou lokalizaci svých vazebných partnerů pravděpodobně zakrytím blízké cílové sekvence jako je *NLS* (*jaderná lokalizační sekvence*) nebo *NES* (*jaderná exportní sekvence*) [9] (kapitola 2.5). Mezi proteiny podléhající takové regulaci zahrnujeme např. Cdc25 fosfatasy, telomerasy, histonové deacetylasy a FoxO transkripční faktory.

2.4 Význam fosforylace proteinkinasou B

Nedávno bylo prokázáno, že transkripční aktivita AFX, FKHR a FKHL1 je regulována v závislosti na jejich intracelulární lokalizaci, což je kontrolováno prostřednictvím fosforylace proteinkinasou B (PKB) a následnou vazbou 14-3-3 proteinu [9]. Pozice fosforylačních míst se ve struktuře jednotlivých druhů FoxO proteinů liší. Fosforylace je vyvolána obecně růstovými faktory, konkrétně například insulinem (Ins) nebo insulinovým růstovým faktorem (IGF), respektive jejich vazbou na příslušné receptory (InsR, IGFR). Následně je spuštěno několik variant signálních drah zakončených různými druhy kináz. Hlavní signální dráha je PI3K-PKB (fosfatidylinositol-3-kinasa - proteinkinasa B). Mezi další regulační činitele patří CK1 (kaseinkinasa), DYRK1a (dual-specificity regulated kinase) a Ras-Ral signální dráha (Ral-GTPase), které pouze modulují funkce FoxO transkripčních faktorů [10, 19, 20].

Za přítomnosti růstových faktorů na povrchu buňky dojde k aktivaci PI3K signální dráhy. Aktivace (tedy fosforylace) P13K má za následek produkci sekundárních poslů PIP₃ (fosfatidylinositol-3,4,5 trisfosfát) a PIP₂ (fosfatidylinositol- 4,5 bisfosfát) těsně pod povrchem cytoplazmatické membrány. Sekundární poslované poté aktivují proteinkinasu B (PKB nebo též AKT) [10]. PKB fosforyluje FoxO na třech specifických místech na serinových a threoninových aminokyselinových zbytcích. Sekvence PKB fosforylačního místa je RXXRXXS/T (kde R = arginin, X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek, S = serin/

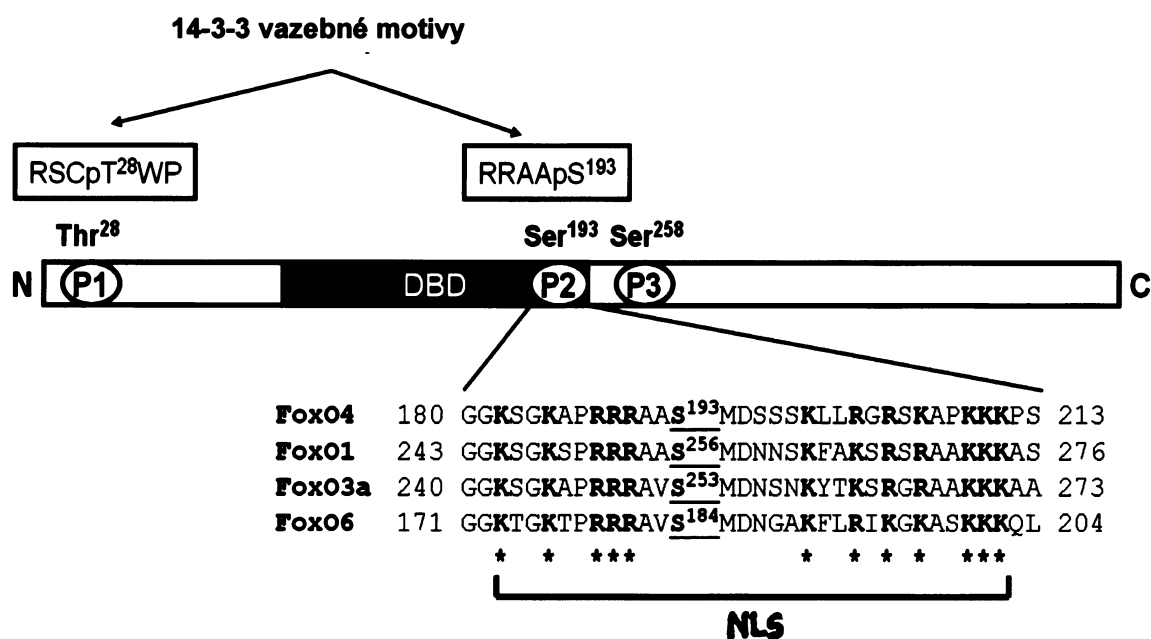
T = threonin). Následně dochází k fosforylaci dalších fosforylačních míst, což umožní navázání 14-3-3 proteinu a změnu buněčné lokalizace komplexu 14-3-3 : FoxO [9].

2.5 Forkhead transkripční faktor FoxO4

Předmětem této bakalářské práce je mutagenese lidského transkripčního faktoru FoxO4 (nebo též AFX). Proteinová sekvence AFX, dlouhá 501 aminokyselin, obsahuje dvě odlišné domény: DNA-vazebnou doménu, umístěnou mezi aminokyselinovými zbytky 96 až 200, která se váže na cílovou specifickou DNA sekvenci a aktivační doménu, nacházející se podle orientace konců bílkoviny v C-terminální polovině AFX molekuly, která se pravděpodobně váže s dalšími proteiny podněcující transkripci [6, 21].

FoxO4 obsahuje ve své struktuře tři fosforylační motivy pro proteinkinasu B: Thr-28, Ser-193 a Ser-258. Při studiích interakcí mezi 14-3-3 proteinem, transkripčním faktorem FoxO4 a jeho cílovou DNA, se pro vazbu 14-3-3 ukázala být důležitá fosforylace pouze na místech P1 a P2 (Thr-28 a Ser-193). Exprese a purifikace kompletního FoxO4 je velmi obtížná z důvodu nízké rozpustnosti proteinu. Proto byla pro studium interakcí FoxO4 faktoru se 14-3-3 proteinem zvolena pouze N-terminální polovina FoxO4 (sekvence 11-213) (*obr. 2.2*), která obsahuje Forkhead DNA vazebnou doménu ohraničenou dvěma PKB fosforylačními vazebnými místy P1 a P2 (které jsou zároveň vazebnými místy pro 14-3-3) [9].

NMR struktura DNA vazebné domény FoxO4 byla publikována v roce 2001 [22]. Současný model regulace FoxO proteinů naznačuje, že FoxO transkripční faktory (tedy i FoxO4) se distribuují mezi jádrem a cytoplasmou. Lokalizace FoxO transkripčních faktorů v buňce je regulovaná přítomností *jaderné (nukleární) lokalizační sekvence (NLS)* a *jaderné exportní sekvence (NES)* ve struktuře FoxO proteinů.[9] NLS je úsek polypeptidového řetězce, který umožňuje bílkovinné molekule proniknout do jádra, a který je tvořen skupinou aminokyselin s bazickými postranními řetězci [1]. NES sekvence je motiv, který rozeznává jaderný exportní systém [23]. Všechny FoxO transkripční faktory obsahují ve své struktuře neklasickou dvoumístnou NLS, která je tvořená 12 aminokyselinovými zbytky. Analýza FoxO4 odhalila přítomnost 5 argininových a 7 lyzinových zbytků. Tyto dvě části obklopují fosforylační místo Ser-193 pro PKB na C-konci DNA vazebné domény [22].



Obr. 2.2 Schématické znázornění primární struktury FoxO4. Na obrázku jsou patrné pozice PKB fosforylačních míst FoxO4 označené P1, P2 a P3. Thr-28 a Ser-193 jsou vazebnými motivy pro 14-3-3 protein, mezi nimiž se nachází DNA-vazebná doména. V okolí Ser-193 je navíc jaderná lokalizační sekvence (NLS). Dolní část obrázku ukazuje sekvenční srovnání aminokyselinové sekvence jednotlivých členů rodiny FoxO faktorů.

V nepřítomnosti insulinu není PKB aktivní, FoxO4 protein je převážně lokalizován v jádře (rychlost importu FoxO4 do jádra převyšuje rychlost jeho exportu z jádra). Tento posun směrem k jaderné lokalizaci je pravděpodobně výsledkem navázání FoxO4 na DNA. Tak může FoxO4 aktivovat expresi genů jím regulovaných. Fosforylace FoxO4 prostřednictvím PKB na třech zmíněných místech je prvním krokem k inhibici jejich DNA vazebných vlastností, což následně vede k inaktivaci jejich transkripční aktivity a k exportu AFX z buněčného jádra do cytoplazmy. Samotná fosforylace sama o sobě nemá vliv na DNA-vazebnou afinitu faktoru AFX. Indukuje však vazbu regulačního 14-3-3 proteinu, který je přítomen v jádře. Tato asociace způsobuje uvolnění FoxO4 z DNA a rychlý transport komplexu 14-3-3:AFX z jádra do cytoplazmy. Tato schopnost 14-3-3 proteinu se vysvětluje tím, že 14-3-3 protein přímo interaguje s NLS FoxO4. Vazba 14-3-3 proteinu na fosforylovaný FoxO4 „maskuje“ NLS, čímž částečně naruší její funkci a tak zabraňuje její interakci s importním systémem buněčného jádra. Současně dojde patrně k odkrytí NES ve struktuře AFX. V důsledku maskování NLS dojde k inhibici zpětného transportu AFX z cytoplazmy do jádra, což způsobí cytoplasmatickou retenci AFX. Konečným výsledkem je posun v rovnováze rozmístění

AFX směrem k cytoplasmě. Přesné mechanismy těchto procesů jsou však stále nejasné [9].

2.6 Komplex 14-3-3 protein : FoxO4

Experimentální důkaz, že 14-3-3 protein je opravdu schopen interagovat s NLS faktoru AFX byl proveden v roce 2005. Byl připraven konstrukt AFX (sekvence 11-213) s fluorescenčně označenou NLS (konkrétně Cys-213, což je C-terminální konec NLS). Pomocí metod časově-rozlišené fluorescence byly studovány konformační změny nukleární lokalizační sekvence AFX při fosforylaci, vazbě DNA a vazbě 14-3-3 proteinu. Tato měření ukázala, že vazba 14-3-3 proteinu významně mění strukturní vlastnosti NLS okolo fluorescenčně značeného místa, zatímco samotná fosforylace transkripčního faktoru má jen malý efekt na strukturu této oblasti. Z toho vyplývá, že tato přímá interakce 14-3-3 proteinu je s největší pravděpodobností zodpovědná za inhibici funkce NLS [7].

Biofyzikální studie charakterizující interakce mezi FoxO4, 14-3-3 ζ a fragmentem DNA, jehož sekvence odpovídá sekvenci, na kterou se specificky váží FoxO proteiny *in vitro*, potvrdila předchozí výsledky, že fosforylace sama o sobě nestačí pro inhibici FoxO4 vazby na DNA [9]. Tento výsledek se shoduje s daty získanými pro *C. elegans* FoxO homolog DAF-16, kde bylo prokázáno, že fosforylace DAF-16 pomocí PKB sama o sobě neovlivňuje vazbu DNA, avšak navázání 14-3-3 proteinu na fosforylovaný DAF16 má za následek téměř kompletní inhibici DAF16-DNA vazebné aktivity [24].

Dále bylo předmětem výzkumů zda pro efektivní vazbu 14-3-3 ζ na FoxO4 a pro vyvázání tohoto komplexu z DNA jsou zapotřebí oba dva fosforylované motivy na FoxO4.

Výsledky experimentů analytické gelové filtrace a analytické ultracentrifugace ukazují, že dvakrát fosforylovaný FoxO4 (dpFoxO4) a 14-3-3 ζ vytvářejí komplex s 1:2 molární stechiometrií a K_D méně než $30 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Toto těsné spojení FoxO4 a 14-3-3 ζ způsobuje úplnou inhibici vazby DNA. Jednou fosforylovaný FoxO4 však váže 14-3-3 ζ se značně nižší afinitou, zatímco si zachovává schopnost vázat DNA. Takže pro úplnou inhibici vazby FoxO4 s cílovou DNA jsou zapotřebí dva fosforylované 14-3-3 vazebné motivy [9]

Přesný molekulární mechanismus inhibice DNA vazebných vlastností FoxO4 v přítomnosti 14-3-3 a inaktivace NLS je však stále nejasný. Porozumění tomuto mechanismu by mohlo poskytnout jak chybějící informace o regulaci biologicky důležitých FoxO transkripčních faktorů, tak pochopení mechanismu funkce 14-3-3 proteinu.

3 CÍL PRÁCE

Hlavními cíly této bakalářské práce jsou:

- Pomocí cílené mutagenese provést bodové mutace Thr-28-Ala a Ser-193-Ala a tím připravit dva rekombinantní plasmidy pro expresi mutantních forem lidského transkripčního faktoru FoxO4₁₁₋₂₁₃, které budou obsahovat pouze jedno fosforylační místo buď na pozici Thr-28 nebo Ser-193.
- Provést test exprese jedné mutované verze proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃ v bakteriích *Escherichia coli* a zkontrolovat jeho přibližnou velikost pomocí SDS-PAGE elektroforesy.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Cílená bodová mutagenese

Cílená bodová mutagenese je metoda, která umožňuje vytvářet definované mutace genů libovolného typu na předem určených místech. K zavedení mutací se používají krátké, synteticky připravené jednořetězcové sekvence DNA, označované jako *mutagenní oligonukleotidy*. Jejich konce jsou komplementární k mutované sekvenci, jejich střední část je však úmyslně pozměněna a představuje mutaci, která má být do cílové sekvence zavedena. DNA určená k mutagenisaci se nejdříve klonuje ve speciálním vektoru umožňujícím připravit kruhové rekombinantní molekuly. K nim jsou pak pomocí PCR reakce připojeny hybridizací navržené mutagenní oligonukleotidy, které slouží jako „primery“ pro syntézu komplementárního vlákna DNA-polymerázou [3]. Vzniklá hybridní molekula DNA je poté přenesena transformací do bakterií *E. coli*, kde se bude replikovat. Klony obsahující mutantní molekuly pak produkují pozměněnou bílkovinu [25].

Jako templát byla pro mutagenesi použita cDNA kódující lidský FoxO4 gen (sekvence Ile-11 – Ser-213) (*příloha A*) zaklonovaná ve vektoru pGEX-4T-1 (Amersham Bioscience, Švédsko). Bodové mutace byly provedeny pomocí QuickChange soupravy (Stratagene) a poté ověřeny sekvenací (viz kapitola 5.5).

4.2 Izolace plasmidové DNA

Matriční plasmidová DNA byla izolována z 5 ml bakteriální kultury *E. coli* (kmen DH5 α), rostoucí 12-16 hodin při teplotě 37 °C, pomocí metody Jetquick Plasmid Miniprep spin kit (Genomed, USA). Tato sada obsahuje všechny potřebné roztoky, kolony i přesný návod na provedení izolace.

Bylo postupováno následujícím způsobem: Tekuté médium s napěstovanou kulturou bylo pečlivě promícháno (na míchadle Vortex VELP. Scientifica) a zcentrifugáno při 12000 x g 1 min (na přístroji Eppendorf, Centrifuge 5415 D). Následovalo slítí supernatantu a postup se opakoval, dokud nebyl spotřebován celý obsah miniprepu. Na jednu kolonku bylo použito maximálně 5 ml média. Získaná peleta byla resuspendována v 250 μ l roztoku G1 pomocí opakovaného opatrného nasávání a vypouštění pipetou,

dokud nebyl roztok homogenní. K přípravě čistého lyzátu bylo využito modifikovanou alkalickou/SDS metodu. Buňky byly lyzovány přidavkem 250 μl G2. Jelikož roztok obsahuje již volnou DNA, nebyly zkumavky vortexovány, ale „invertovány“ - několikrát jemně převráceny, aby se roztok promíchal. Následovala inkubace 5 min. při pokojové teplotě (RT). Přídavkem 350 μl G3 byl roztok neutralizován a centrifugován 10 min při RT. Supernatant byl aplikován přímo na kolonku JetQuick Micro-spin column. Poté následovala 1 min. centrifugace, čímž se plasmidová DNA navázala na adsorpční matrix. Supernatant, který protekl do receiver tube byl odlit, kolonka znovu sestavena a bylo přidáno 500 μl GX. Po 1 min. inkubace následovala 1 min. centrifugace a odstranění supernatantu. Kolonka byla vymyta pro odstranění RNA, proteinů a všech nečistot 500 μl G4, 1 min. centrifugována a supernatant znovu opakovaně centrifugován „na sucho“, pro dokonalé odstranění G4 obsahující ethanol. Kolonka byla umístěna do nové sterilní Eppendorfky a purifikovaná (čistá) plasmidová DNA byla eluována z kolonky pomocí TE pufru (aplikace 75 μl TE pufru na střed silikonové matrix). Po 1 min. inkubace následovala centrifugace 2 min. TE pufr musel být předehřátý na 65 - 70 °C. Jako výsledek bylo získáno 4x cca 35 ml roztoku plasmidové DNA, jež byla skladována při -20 °C.

Použité chemikálie:

G1 $5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} Tris HCl (pH 8,0), 10^{-2} mol dm^{-3} EDTA, 10-2 g dm^{-3} Rnasa A

G2 0,2 mol dm^{-3} NaOH, 1% SDS

G3 acetát sodný a guanidinhydrochlorid (množství výrobce neuvádí)

G4 EtOH, NaCl, EDTA, Tris/HCl

GX acetát sodný, guanidinhydrochlorid, EDTA, EtOH

4.3 Restrikční analýza plasmidové DNA

Plasmidy jsou malé dvouřetězcové cirkulární molekuly DNA, přítomné v bakteriální buňce vedle vlastního chromosomu. Ty které slouží jako klonovací vektory (viz kap. 4.6) obsahují tzv. mnohočetné klonovací místo (angl. *multiple cloning site*) které umožňuje linearizovat (otevřít) plasmid v tomto místě a vložit do něj ligací cizí DNA nebo z něj zpětně DNA vyštípnout. Je to sekvence obsahující větší množství (míst)

krátkých sekvencí, rozpoznávaných restrikními endonukleasami, což jsou enzymy vyhledávající „uvnitř“ molekuly DNA určitou cílovou sekvencí, na které ji štěpí.

Mateřská DNA AFX₁₁₋₂₁₃ byla zaklonována ve vektoru pGEX-4T-1 mezi místy pro restrikní endonukleasy BamH I a Xho I (*příloha B*). Proto pro kontrolu velikosti plasmidu a přítomnosti úseku FoxO4 byly zvoleny restrikní enzymy BamH I a Xho I. Pro restrikní štěpení bylo použito 10 µl izolované čisté DNA, k nimž bylo přidáno 1,5 µl 10x zředěného TBE pufru a po 1 µl restrikních enzymů. Směs byla inkubována 30 min. při 37 °C.

4.4 Agarosová elektroforesa DNA

Agarosová elektroforesa je metoda sloužící k separaci různě dlouhých segmentů DNA ve směsi, které je třeba navzájem rozlišit. Je založena na rozdělení molekul DNA v elektrickém poli podle jejich délky (molekulové hmotnosti). Díky svému negativnímu náboji se DNA pohybuje směrem ke kladné elektrodě, přičemž dlouhé úseky DNA migrují pomaleji, protože jsou v mikroskopické síti pórů agarosového gelu více zpomalovány. Tzn. vzdálenost čela elektroforézy od startu je nepřímo úměrná logaritmu molekulové váhy. Vzdálenosti neznámých fragmentů, které třídíme, lze zjistit (nebo ověřit) srovnáním se standardy (markery) molekulové hmotnosti o známých velikostech fragmentů směsi nukleových kyselin. Díky dokonale rovnoměrnému rozdělení fragmentů v určitých intervalech počtu páru bazí se nejčastěji používají uměle připravené markery přesně odstupňované velikosti, tzv. žebříky (*angl. ladder*) [26].

Koncentrace agarosy v rozmezí 0,8-1,5 hmotnostních procent, se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány. V této práci byl použit 1% gel. 0,35 g agarosy bylo rozpuštěno v 35 ml 1x koncentrovaného TBE pufru postupným zahříváním. Trochu zchladlá agarosa byla nalita do elektroforetické vaničky a byl vložen vzorkovací hřeben. Tuhý zpolymerovaný agar byl převrstven TBE puftrem tak, aby byl zcela ponořen. Po vyjmutí hřebenu byly do vzniklých jamek pipetou nanášeny vzorky DNA po 10 µl s 3 µl vzorkového pufru pro agarosovou elfo tzv. *loading solution*. Jako standardu molekulových hmotností bylo použito 5 µl markeru Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Digest, MBI fermentas) obsahující fragmenty o velikosti 24756-125 párů bazí, objem doplněn 5 µl destilované vody a 3 µl sledovacího barviva. Elektroforesa probíhala v horizontální orientaci při konstantním napětí 75 V přibližně 60 minut. Po ukončení

elektroforesy byl gel inkubován ve vodném roztoku ethidium bromidu o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Molekuly ethidium bromidu se váží do prostoru mezi bázemi DNA (dochází k tzv. interkalaci) a v důsledku hydrofobních interakcí začnou silně fluoreskovat. Po 15 minutách inkubace byl gel přenesen do destilované vody a poté bylo možné fragmenty vizualizovat pod UV lampou.

roztoky:

Pufr pro přípravu vzorků: 50% roztok glycerolu, 0,5% bromfenolová modř, 0,5% xylen cyanol

10x koncentrovaný TBE pufr: 108 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 55 g kyselina boritá, 9,3 g EDTA - doplněno vodou do 1l (pH 8,3)

4.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je enzymatická amplifikace (zmnožení) DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích [27]. Tento proces je dnes zcela automatizován a prováděn v tzv. termocykleru. Metoda je založena na principu opakované replikace DNA takovým způsobem, že se produkt hromadí geometrickou řadou. PCR umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno analyzovat.

Nejprve je pomocí vysoké teploty (optimálně $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$), po dobu 30 vteřin dvouřetězcová DNA denaturována na dvě jednovláknové templátové (matricové) molekuly DNA. Poté je reakční roztok ochlazen na $50\text{-}55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 min. a dochází k tzv. *annealingu* tzn. oligonukleotidové sondy tzv. primery (*downstream primers* a *upstream primers*) se váží na komplementární sekvenci v původním vlákně DNA na počátek a konec úseku, který chceme amplifikovat. V třetí fázi se na určitou dobu zvýší teplota na $70\text{-}74 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a z obou primerů jsou syntetizovány nové komplementární řetězce DNA podle templátu v přítomnosti enzymu DNA-polymerasy a směsi čtyř nukleotidtrifosfátů. Syntézu vláken katalyzuje DNA-polymerasa od 5' konce ke 3' konci začínající vždy od primerů. Dochází k tzv. extenzi (prodlužování) primerů přidáváním nukleotidů na 3'konci. Z jedné molekuly DNA vzniknou molekuly dvě, tedy dvě identické kopie. Tyto čtyři vlákna pak slouží jako templáty a pro nový reakční cyklus,

který je znovu zahájen denaturací zvýšenou teplotou, kdy dojde k oddělení nasyntetizovaných řetězců. Obvykle se pro ampifikaci používá 20-30 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předchozímu zdvojnásobí. Z celé molekuly DNA, která je pro reakci použita, je ampifikován pouze úsek mezi primery, protože DNA polymeráze pro iniciaci replikace na jiném místě chybí primer. Po 1, 5 hod. trvajícím procesu se fragment, který představoval pouze jednu milióntinu obsahu DNA ve zkumavce zůstane selektivně amplifikován tak, že se stane dominantní částí reakční směsi (až 98 %) [1].

Mutagenesní PCR využívá klasické polymerasové řetězové reakce s tím rozdílem, že jako primery jsou použity vhodně navržené oligonukleotidy s požadovanou mutací.

Pro každou mutaci DNA kódující protein FoxO₄¹¹⁻²¹³ byla na základě aminokyselinové sekvence navržena a použita dvojice komplementárních oligonukleotidů tak, abychom získaly dva konstrukty s jedním Ala na dvou různých místech (VBC-Genomics, Rakousko):

1. mutace na pozici 28 Thr → Ala:

Oligonukleotid Up: 5' - CGT CCC CGC TCC TGC **GCC** TTC CCC CTT CCC CGA - 3'

Oligonukleotid Dw: 5'- TCG GGG AAG GGG GAA **GGC** GCA GGA GCG GGG ACG - 3'

2. mutace na pozici 193 Ser → Ala:

Oligonukleotid Up: 5'-CGC CGC CGG GCC GCC **GCC** ATG GAT AGC AGC AGC-3'

Oligonukleotid Dw: 5'-GCT GCT GCT ATC CAT **GGC** GGC GGC CCG GCG GCG-3'

K lyofilizovaným primerům bylo přidáno předepsané množství sterilní vody (dle návodu VBC-Genomics), čímž byla získána koncentrace 10^{-4} mol dm⁻³. Pro vlastní PCR byly oligonukleotidy zředěny ještě 10x. Pro ampifikaci DNA mutantů FoxO₄¹¹⁻²¹³ byla použita komerční sada od firmy Stratagene. Reakční směs byla připravována tzv. „na ledu“, tzn. že mikrozkuhavky byly stále chlazeny na teplotu mírně nad 0 °C, aby se zabránilo předčasné aktivitě DNA polymerasy.

Vzorky pro PCR byly připraveny následovně:

- 5,0 μl 10x koncentrovaný pufr pro DNA polymerasu
- 1,0 μl templátová DNA
- 2,0 μl dNTP (koncentrace 10^{-2} mol dm^{-3})
- 2,0 μl oligonukleotid I Up (resp. II Up)
- 2,0 μl oligonukleotid I Down (resp. II Dw)
- 36,0 μl destilovaná H_2O
- 1,0 μl DNA polymerasy Pfu-turbo

Složení reakčního pufru: 0,1 mol. dm^{-3} KCl, 0,1 mol. dm^{-3} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 mol. dm^{-3} Tris-HCl (pH 8,8), $2 \cdot 10^{-2}$ mol. dm^{-3} MgSO_4 , 1% Triton X-100, 1 g. dm^{-3} BSA.

PCR byla provedena podle následujícího teplotního programu (na PCR přístroji Hybaid – PCR Express), přičemž amplifikace probíhala ve 20 cyklech:

95 °C ... 30 s	} 20x
51 °C ... 1 min	
68 °C ... 12 min	
4 °C ... konstantně	

Celkově tento program trval 5 hodin 14 minut. Poté byla směs ochlazena a uchovávána při 4 °C.

Ověření, zda amplifikace proběhla úspěšně a vzorek obsahoval dostatečné množství nově vzniklé mutantní DNA s předpokládanou velikostí, bylo provedeno pomocí agarosové elektroforézy.

Sada pro mutagenesi: QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA).

4.6 Dpn I štěpení

Výsledná směs po amplifikaci obsahuje původní, mateřskou DNA a velké množství zmutované DNA. K odstranění původní DNA ze směsi se používá restričního enzymu Dpn I. Původní DNA (tzv. *wild type*) vznikla v bakteriích, a proto je na určitých

místech methylována. Nová mutovaná DNA, která vznikla během PCR reakce tedy modifikována není. Restriční enzym Dpn I specificky štěpí methylovanou nebo částečně methylovanou DNA a tak ze vzorku původní templátovou DNA odstraní. Po vyjmutí z PCR přístroje byl ke směsi přidán 1ul restričního enzymu Dpn I. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C.

4.7 Transformace bakterií *E. coli* plasmidovou DNA

Transformací nazýváme přenos genetické informace (rekombinantních molekul) do hostitelské buňky pomocí DNA uvolněné z buněk donorového kmene. Tento proces vychází z přirozené schopnosti bakterií zachycovat mikročástice ze svého okolí, transportovat je přes svoji buněčnou membránu dovnitř buňky a replikovat cizorodou DNA společně se svou vlastní. Aby byl tento proces urychlen a usnadněn používá se pro transformaci metoda teplotního šoku.

Nejprve byla připravena živná LB media pro transformaci.

Pevné LB médium (firma Bacto) pro přípravu agarových misek:

Složení: 10 g trypton, 5 g kvasniční extrakt, 10 g NaCl a 15 g agar (množství uváděné na 1l vody). 6 g této směsi bylo doplněno vodou do 150 ml a vysterilizováno. Po zchlazení na cca 40 °C bylo přidáno 150 µl ampicilinu o koncentraci 100 µg ml⁻¹ a roztok byl nalit do sterilních Petriho misek. Ty byly skladovány při 4 °C.

Tekuté LB médium pro *E. coli*:

10 g trypton, 5 g kvasniční extrakt, 10 g NaCl. Doplněno vodou do 100 ml. Roztok byl rozdělen po 5 ml do 20 zkumavek a cca 30 min. sterilizován.

Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *E. coli* kmen DH5α (JM109, Promega, USA). Ke 40 µl kompetentních buněk bakterií ve dvou mikrozkmavkách, byly přidány 2 µl vzorku A a vz. B PCR směsi mutantní DNA (mut. AFX Ala-28, Ala-193). Následovala inkubace 20 min. na ledu. Dále byl proveden tzv. *heat shock* pro destabilizaci cytoplasmatické membrány: vzorky byly inkubovány 45 sekund na vodní lázni o teplotě 42 °C a potom okamžitě vloženy na 2 min zpět do ledu. K reakční směsi bylo poté přidáno 400 µl LB média ohřátého na 42 °C. Následně byly vzorky inkubovány

60 min. při teplotě 37 °C za konstantního třepání 190 rpm. Oba vzorky byly naneseny na Petriho misky se ztuhlým ampicilinovým LB médiem a 12 hodin inkubovány při 37 °C.

Plasmidová DNA pGEX-4T-1 je komerčně připravena tak, aby obsahovala gen pro rezistenci k antibiotiku ampicilin. V přítomnosti ampicilinu v živném mediu se množí pouze ty bakterie, které během transformace přijaly tento plasmid (tzn. byly transformovány).

Z každé misky byly odebrány dvě kolonie bakterií a přeneseny pomocí sterilního očka do čtyř vysterilizovaných zkumavek s 5 ml tekutého LB média a 5 µl ampicilinu o koncentraci 100 µg.ml⁻¹. Tyto kultury byly inkubovány 14 hodin při teplotě 37 °C za konstantního třepání 190 rpm. Poté byla z těchto bakteriálních kultur vyizolována plasmidová DNA pomocí metody JetQuick (postup kap. 4.2). Takto připravené vzorky DNA byly zaslány na sekvenaci do laboratoře Dr. J. Felsberga, Mikrobiologický ústav AV ČR. Jelikož sekvenace prokázala přítomnost požadovaných mutací, následovala transformace do expresního kmene bakterií *E. coli*.

4.8 Expese rekombinantního proteinu AFX₁₁₋₂₁₃

Expesí rozumíme proces, kdy buňky bakteriální kultury produkují námi požadovaný protein.

Nejprve byla provedena transformace zmutované DNA do expresního kmene bakterií *E. Coli* BL21(DE3) (Stratagene, USA). To je speciální kmen kompetentních buněk vhodný pro dlouhodobé uchování a efektivní expresi proteinů. Transformace byla provedena stejným způsobem jako transformace předešlá (kap. 4.7), ale bylo požitó 25 µl buněk BL21(DE3). Bakteriální kultury (5ml, 100 µg.ml⁻¹ ampicilin), obsahující plasmid pGEX-4T-1/AFX₁₁₋₂₁₃ s alaninem na pozici 29 a 193, byly inkubovány 14 hodin při teplotě 37 °C za konstantního třepání 190 rpm. Poté bylo 10 ml napipetováno do 1 litru LB média s ampicilinem (celková koncentrace 100 µg.ml⁻¹). Celá směs byla inkubována při 37 °C a konstantních otáčkách 190 rpm tak dlouho, dokud absorbance při vlnové délce 600 nm nedosáhla hodnot ~ 0,8. Absorbance byla měřena na UV-VIS absorpčním spektrofotometru Agilent 8453, jako referenční vzorek bylo použito čisté LB medium. Poté byl odebrán 1 ml vzorku bakterií pro analýzu. Do média byl poté přidán roztok induktoru IPTG (látka, která spustí expresi rekombinantního proteinu) do finální koncentrace 5.10⁻⁴ mol.l⁻¹. Bakteriální kultura byla inkubována při 30 °C a v pravidelných

časových intervalech (1, 3 a 18 hodin) byly odebírány vzorky 1 ml pro následující SDS-PAGE elektroforesu.

4.9 SDS-PAGE

SDS-PAGE je vertikální elektroforetická metoda používaná především k separaci a určování molekulových vah proteinů. SDS - dodecylsulfát sodný je látka používaná zvláště v chromatografii jako tenzid (aniontový detergent). Rozbaluje proteiny a váže se na polypeptidový řetězec v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, přičemž délka komplexu SDS - bílkovina je úměrná jeho molekulové hmotnosti. V prostředí SDS získají proteiny jednotný záporný náboj a v elektrickém poli se pohybují na základě velikosti směrem od katody k anodě. Polyakrylamidový gel je směs akrylamidu a N,N metylenbis(akrylamidu), který polymerizuje při pokojové teplotě. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných proteinů od 3,5% až po 20% gely [27]. V této práci byl použit 15% separační gel v kombinaci se zaváděcím gelem. Rozmezí dělících schopností 15% gelu je přibližně 15 000 – 45 000 g.mol⁻¹.

Postup:

Nejprve byl připraven separační a zaváděcí gel. Mezi dvě skleněné desky byl nalit polymerační roztok a převrstven 40 μ l isopropanolu. Po uplynutí 20 až 30 min. a ztuhnutí gelu se vytvořilo ostré rozhraní. Přebytečná kapalina byla slila a vysušena titračním papírem. Následně byl zaváděcí gel napipetován na separační gel a vložen vzorkovací hřebínek. Po ztuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické aparatury a zalit vodícím pufrem. Vzorky byly připraveny následujícím způsobem: 10 μ l bakteriální kultury bylo centrifugováno pomocí stolní centrifugy (M-24 Boeco, Germany) po dobu 1,5 min. při 13 000 rpm. K peletu bylo přidáno 5 μ l vzorkového pufru a 10 μ l vody. Směs byla resuspendována pipetou. Vzorky byly vloženy do vodní lázně o teplotě 95-100 °C na dobu 2 minut. Účinkem zvýšené teploty, SDS a β -merkaptoethanolu, který redukuje disulfidické můstky ve struktuře proteinů, došlo k denuraci vzorku. Po vyndání hřebínku ze zaváděcího gelu byly do vzniklých jamek aplikovány takto připravené vzorky a 10 μ l standardu molekulových hmotností. Použitý standard Mix 4 obsahuje směs proteinů o relativních molekulových hmotnostech 97 000, 67 000, 45 000 a 29 000. Elektroforesa probíhala po dobu cca 50 minut při napětí 180 V, dokud bromfenolová

modř obsažena ve vzorcích nedosáhla spodního okraje separačního gelu. Po skončení elektroforesy byly separované proteiny vizualizovány ponořením gelu do barvicí lázně. Po 20 min. byl gel přemístěn do odbarvovacího roztoku (20 min), čímž došlo k odbarvení samotného gelu. Oba roztoky byly mírně zahřívány.

Tab. 1: Složení 15% separačního gelu

<i>Činidlo</i>	<i>Objem</i>
Akrylamid/bisakrylamid	5,60 ml
4 x pufr pro separační gel (obsahující SDS)	3,00 ml
Destilovaná voda	2,60 ml
10% persulfát amonný	100,00 μ l
TEMED	10,00 μ l

Tab. 2: Složení 15% zaváděcího gelu:

<i>Činidlo</i>	<i>Objem</i>
Akrylamid/bisakrylamid	0,50 ml
Pufr pro zaváděcí gel (obsahující SDS)	1,00 ml
Destilovaná voda	2,25 ml
TEMED	8,00 μ l
10% persulfát amonný	75,00 μ l

Složení roztoků:

Akrylamid-bisakrylamid: 29,2 g akrylamidu, 0,8 g bis-akrylamidu, doplněno vodou do 100 ml

Pufr pro separační gel : 1,5 mol.dm⁻³ Tris-HCl (pH = 8,8), 4 ml 10% SDS, 21 ml H₂O

Pufr pro zaváděcí gel: 50 ml 1 mol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 6,8), 4 ml 10% SDS, 46 ml H₂O

10 x koncentrovaný pufr pro elektroforesu: 30 g Tris-HCl, 144 g glycinu, 10 g SDS, doplněno vodou do 1 litru

5 x koncentrovaný pufr pro přípravu vzorků: 0,6 ml 1 mol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 6,8), 5 ml 50% glycerolu, 2 ml 10% SDS, 0,5 ml β -merkaptoethanolu, 1 ml 1% bromfenolové modři, 0,9 ml H₂O

Barvicí roztok (1 litr) : 1 g Coomassie Blue R-250, 450 ml methanolu, 100 ml ledové kyseliny octové, 450 ml H₂O

Odbarvovací roztok : 100 ml methanolu, 100 ml ledové kyseliny octové, 800 ml vody

5 VÝSLEDKY

5.1 Restrikční analýza a agarosová elektroforesa plasmidové DNA

Nejprve byla z bakteriální kultury *E. Coli* (DH5 α) izolována matečná plasmidová DNA. Tento templát (pro následující PCR reakci) obsahoval část genu lidského Forkhead transkripčního faktoru FoxO4₁₁₋₂₁₃ Trp-29,97,126,146-Phe zabudovaný ve vektoru pGEX-4-T1 (do míst pro restrikční endonukleasy BamH I a Xho I). K izolaci byla použita metoda JetQuick (Germany) (viz kapitola 4.2). Pro ověření velikosti této výchozí DNA byla provedena restrikční analýza a agarosová elektroforesa (viz kap. 4,3; 4,4). Po inkubaci s enzymy BamH I a Xho I došlo k vyštěpení fragmentu DNA kódujícího FoxO4₁₁₋₂₁₃ z plasmidu, čímž vznikly dva fragmenty o přibližných velikostech 4900 a 600 párů bazí. Tyto velikosti odpovídají předpokládané délce fragmentu AFX₁₁₋₂₁₃ a velikosti vektoru pGEX-4T-1. Ve stejné dráze byla také patrná přítomnost o něco těžšího fragmentu, který s největší pravděpodobností odpovídal linearizovanému plasmidu, tzn. že došlo pouze k jednomu štěpení a vznikla tak lineární DNA o délce 5506 bp. Záznam chromatografického gelu TBE elektroforézy není vyobrazen, jelikož na PřF UK nebylo k dispozici zařízení pro digitalizaci agarózových gelů obarvených ethidium bromidem.

5.2 Mutagenezní PCR

Pro každou mutaci DNA byla použita dvojice komplementárních oligonukleotidů o 33 basích, shodných s genem kódující protein FoxO4₁₁₋₂₁₃. Mutované místo bylo umístěno uprostřed oligonukleotidů. Pro konstrukci prvního mutantu byla zaměněna trojice bazí na pozici 28 pro threonin (ACC) na kodon pro alanin (GCC), v případě druhého mutantu byl kodon na pozici 193 pro serin (TCC) nahrazen za alanin (GCC). Oligonukleotidy syntetizovala firma VBC genomics (viz kap. 4.5). Po ukončení PCR byla ze směsi odstraněna původní nezmutovaná templátová DNA přídatkem restrikčního enzymu Dpn I. Provedením agarózové elektroforézy bylo ověřeno, že mutagenezní PCR reakce proběhla v pořádku, a že byly syntetizovány nové sekvence DNA odpovídající délce požadovaného produktu o velikosti přibližně 5 500 bazí. Správný průběh PCR

reakce a výsledná délka nově syntetizované zmutované DNA, byla ověřena pomocí agarosové elektroforezy.

5.3 Transformace kompetentních buněk *E. coli* kmen DH5α(JM109)

Před ověřením, zda se podařilo provést bodové mutace, pomocí sekvenace, byly oba konstrukty Thr-28-Ala a Ser-28-Ala transformovány do buněk bakterií *E. coli* (DH5α) (viz kap. 4.7). Aby mohlo k transformaci dojít bylo nutné učinit buněčné stěny bakteriálního hostitele přístupné pro DNA. K destabilizaci cytoplazmatické membrány bylo použito teplotního šoku (zahřátí na 42° C po dobu 45 sec.). Vektor pGEX-4T-1 obsahuje gen pro rezistenci na antibiotikum ampicilin. V živném mediu obsahujícím toto antibiotikum přežily pouze buňky, které byly úspěšně transformovány tímto vektorem a tím získaly schopnost rezistence vůči ampicilinu. Na každé z Petriho misek vyrostlo kolem 150 kolonií bakterií.

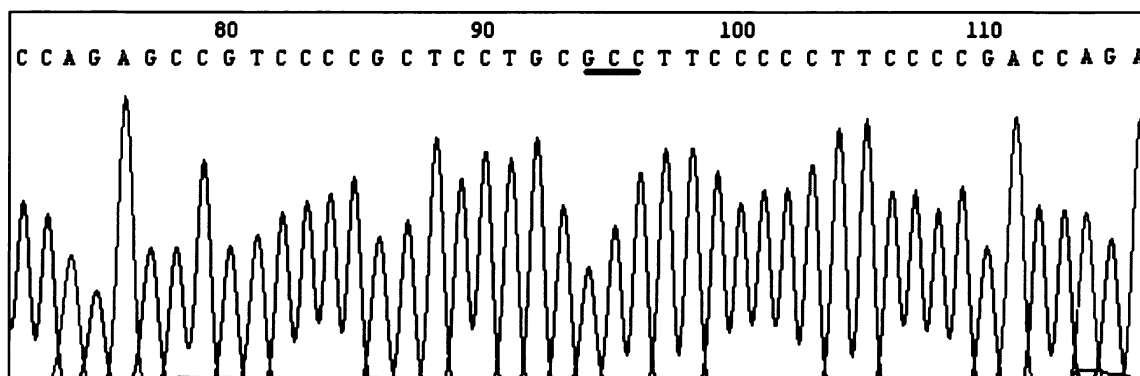
5.4 Izolace plasmidové DNA

Z každé misky byly odebrány tři různé bakteriální kolonie s mutací Ala-28 a Ala-193 a přeneseny do kapalného LB média. Z vypěstovaných kultur bylo následně izolováno metodou JetQuick šest vzorků plasmidové DNA pro sekvenaci.

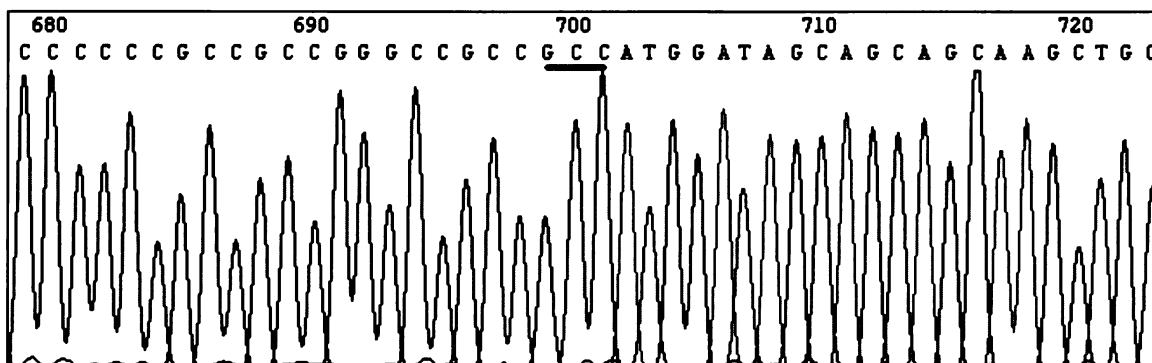
5.5 Sekvenace mutantních forem DNA proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃

Sekvenace izolovaných vzorků plasmidové DNA byla provedena v laboratoři Dr. J. Felsberga, Mikrobiologický ústav AV ČR. Získané sekvenační chromatogramy byly pečlivě porovnány se známou sekvencí FoxO4 (příloha A), respektive s původním sekvenačním záznamem DNA kódujícím nemutovaný protein FoxO4₁₁₋₂₁₃. Pomocí volně dostupného (z angl. freeware) programu CHROMAS, verze 1.45 - 32-bit, bylo ověřeno, že oba konstrukty DNA obsahují požadovanou mutaci, a že DNA nebyla poškozena žádnými dalšími náhodnými nežádoucími mutacemi. Na obr. 5.1 je vyobrazena část sekvenačního chromatogramu oblasti kolem Thr-28 a je zcela zřejmé, že Thr byl

zmutován na Ala. Taktéž na druhém sekvenačním záznamu je patrné místo vnesení Ala na pozici Ser-193 (*obr. 5.2*). Úplné sekvenační záznamy DNA FoxO4₁₁₋₂₁₃ obou konstruktů po mutacích ukazují *přílohy C, D*.



Obr. 5.1 Část sekvenačního chromatogramu cDNA kódující protein FoxO4₁₁₋₂₁₃ ukazující oblast kolem místa mutace Ala-28, jenž je zvýrazněna červeným podtržením. Gen byl sekvenován ve směru 5' → 3'.



Obr. 5.2 Část sekvenačního chromatogramu cDNA kódující protein FoxO4₁₁₋₂₁₃ s mutací Thr-28-Ala, jenž je zvýrazněna červeným podtržením. Gen byl sekvenován ve směru 3' → 5' (sekvence je zobrazena jako reverzní komplement).

5.6 Test exprese rekombinantního proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃

5.6.1 Transformace bakterií *E. Coli* BL21(DE3)

Po získání rekombinantních plasmidů bylo provedeno ověření, zda jsou bakterie schopny takto upravené proteiny exprimovat (viz kap. 4.8, 4.9). Plasmidová DNA o známé sekvenci inzertu se zabudovanou mutací Ser-193-Ala, byla transformována do buněk *E. Coli* BL21(DE3), což je kmen vhodný pro expresi rekombinantních proteinů. Pozitivní transformace byla indikována nárůstem kolonií na příslušných agarosových miskách. Bakteriální kultura byla inkubována v LB médiu a kultivace i exprese proteinu po indukci IPTG probíhaly ve 37 °C. V pravidelných časových intervalech byly odebírány vzorky pro SDS-PAGE analýsu.

5.6.2 SDS-PAGE analýza vzorků expresního testu

Princip a postup SDS-PAGE je popsán v kapitole 4.9. Analýza byla provedena pro exprimovanou verzi mutantního proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃ Ser-193-Ala. SDS-PAGE gel na *obr. 5.3* ukazuje expresi rekombinantního proteinu GST-FoxO4₁₁₋₂₁₃ Ser-193-Ala v bakteriích *E. coli* BL21(DE3). Z gelu je patrné, že bakterie rekombinantní protein exprimují velmi dobře a rekombinantní protein se zdá být stabilní. Odhadovaná relativní molekulová váha (asi 48000) odpovídá teoretické hodnotě 48524 (*obr. 5.4*).

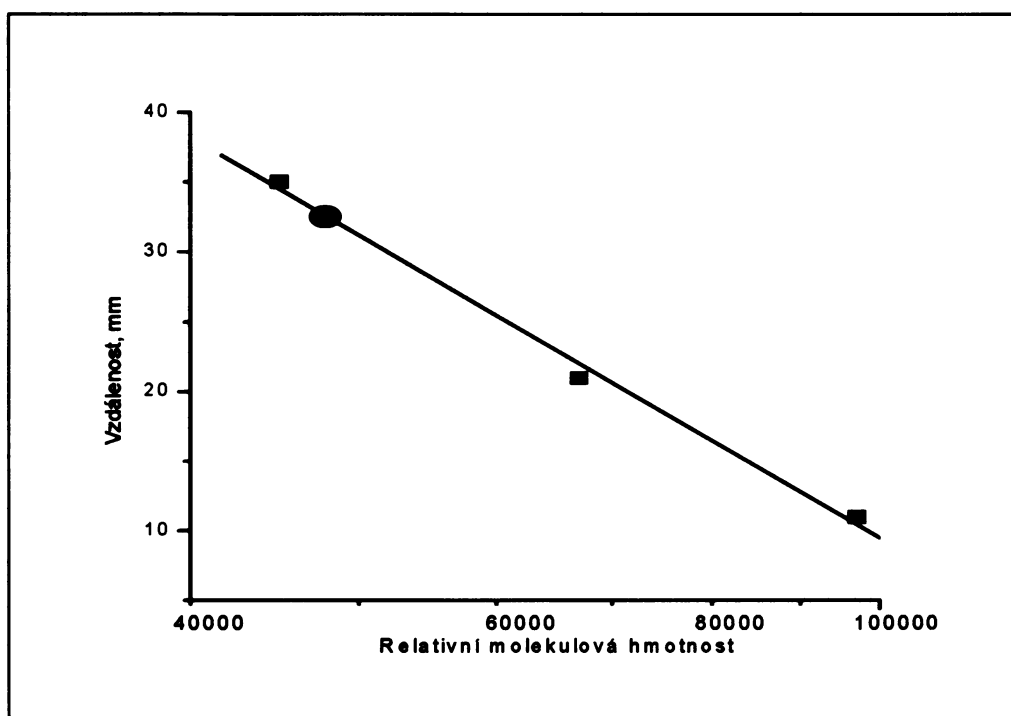


Obr. 5.3 15% akrylamidový gel SDS-PAGE zobrazující analýzu testu exprese proteinu AFX₁₁₋₂₁₃ Ser-193-Ala v bakteriích *E. Coli* kmen BL21(DE3). Na gelu je znázorněno srovnání vzorků bakterií inkubovaných v nepřítomnosti IPTG (1, 5), se vzorky po přidavku induktoru IPTG. V dráze 2, 3, 4 je znázorněna závislost exprese proteinu na čase. Dráha 6 obsahuje vzorek po GST afinitní chromatografii, pro srovnání čistoty exprimovaných proteinů.

Vzorky byly nanášeny na gel v tomto pořadí (zleva) (obr. 5.3): standard molekulových hmotností Mix 4 (dráha Mr), vzorek bakterií před indukcí (dráha 1 a 5), vzorek bakterií po indukci IPTG - inkubace 1 hod. (dráha 2), vzorek bakterií po indukci IPTG - inkubace 3 hod. (dráha 3), vzorek bakterií po indukci IPTG - inkubace 18 hod. (dráha 4), protein FoxO₄₁₁₋₂₁₃ s navázanou GST afinitní kotvou (dráha 6). Vzorek fusního proteinu GST-FoxO₄ po GST afinitní chromatografii byl poskytnut RNDr. Janem Šilhánem.

Výsledky SDS-PAGE ukázaly, že u vzorků bakterií indukovaných v nepřítomnosti IPTG (1, 5) nedocházelo k výrobě proteinu, zatímco v dráze 2, 3 a 4 je patrný výrazný pruh proteinu vyrobeného během indukce. Tyto 3 vzorky byly

inkubovány s induktorem IPTG a tudíž probíhala produkce bílkoviny. Již po jedné hodině inkubace po přidání induktoru je viditelné, že se protein exprimoval. Množství vyrobeného proteinu se s časem zvětšovalo. Největší množství proteinu bylo tedy bakteriemi exprimováno po 18 hodinách inkubace. Na gel byly nanášeny celé bakterie, kromě vzorku proteinu GST-FoxO4 (dráha 6), kde se jednalo o vzorek po afinitní chromatografii. GST afinitní chromatografie je prvním purifikačním krokem, při které byl protein FoxO₄₁₁₋₂₁₃ s navázanou GST afinitní kotvou oddělen od dalších znečišťujících proteinů v buňce. Je patrné, že touto purifikační metodou se docílí odstranění velkého množství nečistot.



Obr. 5.4 Kalibrační křivka pro odhad relativní molekulové hmotnosti z SDS-PAGE gelu (obr. 5.3). Na ose y je vynesena migrační vzdálenost standardů a na ose x jejich relativní molekulová hmotnost. Lineární regrese byla vypočítána programem Origin 6.0 (Microcal, USA). Červený bod odpovídá migrační vzdálenosti fusního proteinu GST-FoxO4 a relativní molekulová hmotnost byla odhadnuta na 48000.

6 DISKUSE

FoxO transkripční faktory jsou v poslední době stále více studovány. Jsou to farmakologicky velice důležité proteiny, které řídí expresi regulačních genů a takto ovlivňují buněčný metabolismus, stresovou odezvu či řízené odumírání buněk. Regulace funkce FoxO faktorů je značně komplexní a velmi důležitou roli v něm hrají 14-3-3 proteiny, které specificky interagují s fosforylovanými formami FoxO proteinů.

6.1 Hypotéza molekulové kovadliny

14-3-3 proteiny jsou rodina signálních vnitrobuněčných bílkovin, které specificky rozpoznávají celou řadu fosforylovaných proteinů a peptidů. Většina 14-3-3 vazebných partnerů obsahuje 1 nebo více fosforylačních míst, jejichž sekvence velmi často odpovídají motivům RSXpSXP nebo RX(Y/F)XpSXP [9, 18].

Charakter jednotlivých interakcí mezi 14-3-3 proteiny a jeho ligandy podhalila řada krystalových struktur komplexů 14-3-3 proteinů s peptidovými ligandy. Nedávno byla vyřešena struktura komplexu 14-3-3 ζ a serotonin-N-acetyltransferasy (AANAT), která umožnila objasnit jeden z mechanismů funkce 14-3-3 proteinů na atomové úrovni. Molekula 14-3-3 proteinu se díky řadě interakcí mezi α -helixy jeví jako mimořádně rigidní. Chová se v podstatě jako „*molekulová kovadlina*“ tím, že deformuje na ní navázané ligandy, zatímco sama při vazbě ligandu podléhá jen minimálním strukturním změnám. V případě AANAT, vazba 14-3-3 proteinu pravděpodobně stabilizuje enzym v konformaci přechodného stavu (komplexu enzym:substrát), který u samotného AANAT vzniká velmi neochotně. Následkem usnadnění vzniku přechodového stavu se podpoří vazba substrátu a tvorba produktu. U dalších proteinů mohou změny konformace vyvolané 14-3-3 usnadnit jejich interakci s jinými proteiny, nebo regulovat jejich subcelulární relokaci např. tím, že zprostředkují interakce mezi skrytými sekvencemi NES/NLS a jadernými importéry či exportéry.

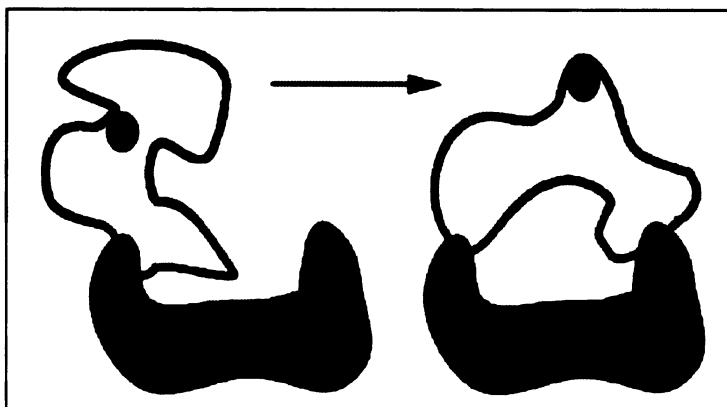
Zdá se, že hlavním vodítkem pro pochopení mechanistických základů působení 14-3-3 je jeho dimerní povaha. Dimer 14-3-3 proteinu má tvar kalichu, který obsahuje

dvě štěrby pro navázání ligandu. Molekula ligandu obsahující více motivů pro vazbu ke 14-3-3 tudíž může být schopna využít zároveň obě monomerní podjednotky v jediném dimeru. FoxO4 proteiny jsou případem tohoto typu tandemové interakce. FoxO faktory obsahují ve své struktuře tři PKB fosforylační místa, z toho dvě z nich jsou vazebná místa pro 14-3-3, mezi nimiž se nachází DNA vazebná doména. Komplex 14-3-3:FoxO4 má stechiometrii 2:1 (tzn., že 1 molekula dimeru 14-3-3 proteinu váže pouze 1 molekulu FoxO4).

V případě většiny proteinů se zdá pravděpodobné, že existuje jedna dominantní oblast, která působí jako hlavní kontaktní bod. Pokud tato oblast není přítomna či fosforylována, jsou sekundární oblasti příliš slabé na to, aby podporovaly stabilní interakci se 14-3-3. Pokud je ovšem oblast kontaktního bodu fosforylována a navázána k jednomu z monomerů v dimeru 14-3-3, sekundární oblasti jsou schopny interakce s druhou monomerní podjednotkou vlivem jejich vysoké lokální koncentrace vyvolané jejich těsnou blízkostí. Příkladem tohoto druhu tandemové vazby se zdají být FoxO4 transkripční faktory. Z výsledků biofyzikálních studií vyplývá, že pro účinnou inhibici vazby DNA (pravděpodobně díky konformační změně DNA vazebné domény) je nutná interakce mezi 14-3-3 proteinem a FoxO4 se dvěma vazebnými místy a nemůže jí být docíleno pokud chybí jedno vazebné místo (způsobené mutací S-193-A) [9].

Hypotéza molekulové kovadliny, teorie fosforylace záchytného bodu a význam sekundárních oblastí (pokud existují) však stále zůstávají spekulativní. Tato bakalářská práce je součástí projektu, jehož cílem je mj. tuto hypotézu ověřit a odhalit význam 14-3-3 fosforylačních míst Thr-28 a Ser-193 proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃.

Obr. 6.1 znázorňuje, jak 14-3-3 protein pomocí vícenásobných míst způsobuje změny konformace navázaných ligandů.



Obr. 6.1 Model znázorňující hypotézu molekulové kovadliny.

Více vazebných motivů pro 14-3-3 protein umožňují jediné molekule ligandu, aby interagovala zároveň s oběma podjednotkami v dimeru 14-3-3. Pro efektivní interakci, musí nejprve dojít k vazbě fosforylačního místa představující primární záchytný bod na jednu monomerní podjednotku 14-3-3 proteinu (1). Následná interakce slabšího sekundárního místa s druhou monomerní podjednotku (2) usnadní ligandu změnu jeho konformace, která v případě samotného ligandu vzniká velmi neochotně a zpřístupní aktivní místo proteinu (šedý kroužek).

6.2 Konstrukce fosforylačních mutant

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí cílené mutagenese připravit dva typy rekombinantní DNA proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃ obsahující pouze jedno fosforylační místo, buď na Thr-28 nebo Ser-193. Poté ověřit, zda je bakteriální systém schopen exprimovat mutovanou verzi proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃ Ser-193-Ala. Takto připravené dva typy mutantních proteinů FoxO4 jsou vhodné pro studium vlivu fosforylace a vazby 14-3-3 proteinu na DNA-vazebné vlastnosti transkripčního faktoru AFX a pro charakterizaci konformačních (strukturních) změn v okolí DNA vazebné domény a jaderné lokalizační sekvence proteinu FoxO4 způsobených interakcí s 14-3-3 proteinem.

Sledování strukturních změn se provádí pomocí fluorescenční spektroskopie (metod stacionární a časově rozlišené fluorescence). V této práci byl použit výchozí gen pro protein FoxO4₁₁₋₂₁₃ s již pozměněnou sekvencí, obsahující pouze dva tryptofanové zbytky na pozici 173 a 174. Mgr. Petr Vácha ve své diplomové práci [28] provedl mutace Trp-29,97,126-Phe, což je systém vhodný pro studium změn struktury DNA vazebné domény pomocí tryptofanové fluorescence.

Ke snížení PKB fosforylačních míst v okolí DNA vazebné domény byla použita metoda mutagenézní PCR. Nejednalo se tedy přímo o chemickou přeměnu jedné aminokyseliny na druhou, ale o mutaci genu kódující protein FoxO4₁₁₋₂₁₃. Nově vzniklá mutovaná DNA byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* JM109, čímž bylo připraveno větší množství této DNA pro sekvenování. Výsledkem sekvenace byly sekvenační chromatogramy, na nichž jsou patrná místa obou mutací (vznik kodonu GCC pro alanin na pozici 28 u vzorku A a na pozici 193 u vzorku B) (*přílohy C, D*). Nahrazením Thr-28 a Ser-193 za alanin došlo k narušení optimálního vazebného motivu pro PKB (proteinkinasu B), protože fosforylován může být pouze serin nebo threonin. Lze tedy konstatovat, že výsledkem cílené bodové mutagenéze jsou dva konstrukty plasmidové DNA kódující protein FoxO4₁₁₋₂₁₃ obsahující pouze jedno vazebné místo pro 14-3-3 protein.

Jelikož sekvenace prokázala přítomnost požadovaných mutací, následovala transformace do expresního kmene bakterií *E. Coli* BL21(DE3). Výsledky expresního testu ukázaly, že bakterie jsou schopny nový rekombinantní protein FoxO4₁₁₋₂₁₃ Ser-193-Ala exprimovat v dostatečném množství.

Takto připravené fosforylační mutanty (společně s Thr-28-Ala) budou použity k dalším výzkumům probíhajícím v rámci studia regulace funkce transkripčního faktoru FoxO4.

7 ZÁVĚR

- Pomocí cílené mutagenese založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) se podařilo provést bodové mutace Thr-28-Ala a Ser-193-Ala a tím připravit dva rekombinantní plasmidy pro expresi mutantních forem lidského transkripčního faktoru FoxO4₁₁₋₂₁₃, obsahující pouze jedno fosforylační místo (buď na pozici 28 nebo 193).
- Byl proveden expresní test mutantu Ser-193-Ala v bakteriích *Escherichia Coli*. Pomocí SDS-PAGE bylo dokázáno, že bakterie takto upravený protein exprimují. Pomocí SDS-PAGE elektroforezy byla odhadnuta přibližná relativní molekulová hmotnost rekombinantního proteinu, která velmi dobře odpovídá očekávané hodnotě pro relativní molekulovou hmotnost fusního proteinu FoxO4₁₁₋₂₁₃-TEV-GST.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem, Espero Publishing 1998.
2. Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie*. 3. inov. vyd. 2. sv. Brno, 2000
3. Rosypal, S. a kolektiv autorů: *Nový přehled biologie*. Praha, Pedagogické nakladatelství Scientia 2003.
4. Kubišta, V.: *Buněčné základy životních dějů*. Praha, Scientia 1998.
5. Kaufmann, E., Knochel, W. (1996) *Mech. Develop.* **57**, 3-20.
6. Kops, G.J.P.L, Burgering, B.M.T. (1999) *J. Mol. Med.* **77**, 656-665.
7. Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A, Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., Obsil, T. (2005) *Biochemistry* **44**, 11608-11617.
8. Weigelt, J., Climent, I., Dahlman-Wright, K., Wikstrom, M. (2001) *Biochemistry* **40**, 5861-5869.
9. Obsil, T., Girlando, R., Anderson, D. E., Hickman, A. B., Dyda, F. (2003) *Biochemistry* **42**, 15264-15272.
10. Van der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M., Smidt, M.P (2004) *Biochem. J.* **380**, 297-309.
11. Kops, G.J.P.L., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., Burgering, B.M.T. (2002) *Nature* **419**, 316-321.
12. Furukawa-Hibi, Y., Yoshida-Araki, K., Ohta, T., Ikeda, K., Motoyama, N. (2002) *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26729-26732.
13. Alvarez, B., Martinez, C., Burgering, B.M.T., Carrera, A.C. (2001) *Nature* **413**, 744-747.
14. Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O.A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T., Lampert, F. (1997) *Oncogene* **14**, 195-202.
15. Yang, H., Zhao, R., Yang, H. Y., Lee, M. H. (2005) *Oncogene* **24**, 1924-35.
16. Nemoto, S., Finkel, T. (2002) *Science* **295**, 2450-2452.
17. Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004) *J Biol Chem* **279**, 4531-4540.
18. Yaffe, M. B. (2002) *FEBS letters* **513**, 53-57.

19. Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G., Guan, K.L. (1999) *Journal of Biological Chemistry* **274**: 16741-16746.
20. Woods, Y.L., Rena, G. (2002) *Biochemical society transaction* **30**, 391-397.
21. Kops, G.J.P.L., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M.M., Powell, D.R., Bos, J.L., Burgering, B.M.T. (1999) *Nature* **398**, 630-634.
22. Weigelt, J., Kliment, I., Dahlman-Wright, K., Wikstörn, M. (2001) *Biochemistry* **40**, 5861-5869.
23. Brownawell, A.M., Kops, G.J.P.L., Macara, I.G., Burgering, B.M.T. (2001) *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3534-3546.
24. Cahill, C.M., Tzivion, G., Nasrin, N., Ogg, S., Dore, J., Ruvkun, G., Alexander-Bridges, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13402-13410.
25. Vodrážka, Z.: *Biotechnologie*. Praha, Academia 1992
26. <http://biologie.upol.cz/metody> (15. 3. 2006)
27. Průša, R.: *Základy analytických metod v molekulární biologii*. Praha, 2. LF UK a Lambda Bio-Med 1997
28. Vácha, P.: Diplomová práce, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK, Praha (2006)

9 PŘÍLOHY

Příloha A: Výchozí DNA sekvence lidského FoxO4₁₁₋₂₁₃

```

I11 I D L D
atc ata gac cta gat

P D F E P Q S R P R S C T28 F P
ccc gac ttc gaa ccc cag agc cgt ccc cgc tcc tgc acc tgg ccc

L P R P E I A N Q P S E P P E
ctt ccc cga cca gag atc gct aac cag ccg tcc gag ccg ccc gag

V E P D L G E K V H T E G R S
gtg gag cca gat ctg ggg gaa aag gta cac acg gag ggg cgc tca

E P I L L P S R L P E P A G G
gag ccg atc ctg ttg ccc tct cgg ctc cca gag ccg gcc ggg ggc

P Q P G I L G A V T G P R K G
ccc cag ccc gga atc ctg ggg gct gta aca ggt cct cgg aag gga

G S R R N A F G N Q S Y A E L
ggc tcc cgc cgg aat gcc tgg gga aat cag tca tat gca gaa ctc

I S Q A I E S A P E K R L T L
atc agc cag gcc att gaa agc gcc ccg gag aag cga ctg aca ctt

A Q I Y E F M V R T V P Y F K
gcc cag att tac gag tgg atg gtc cgt act gta ccc tac ttc aag

D K G D S N S S A G F K N S I
gac aag ggt gac agc aac agc tca gca gga tgg aag aac tcg atc

R H N L S L H S K F I K V H N
cgc cac aac ctg tcc ctg cac agc aag ttc atc aag gtt cac aac

E A T G K S S W W M L N P E G
gag gcc acc ggc aaa agc tct tgg tgg atg ctg aac cct gag gga

G K S G K A P R R R A A S193 M D
ggc aag agc ggc aaa gcc ccc cgc cgc cgg gcc gcc tcc atg gat

S S S K L L R G R S K A P K K
agc agc agc aag ctg ctc cgg ggc cgc agt aaa gcc ccc aag aag

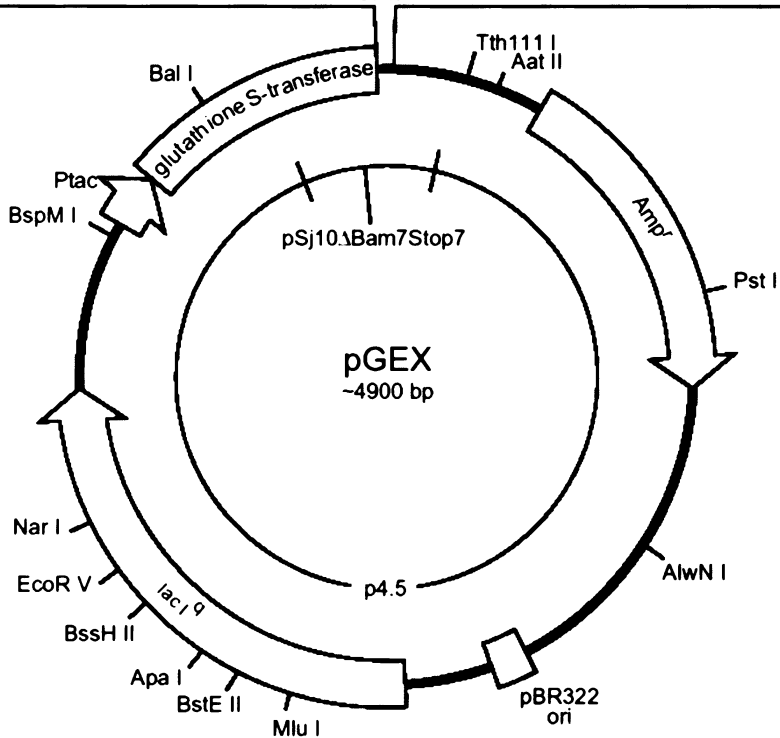
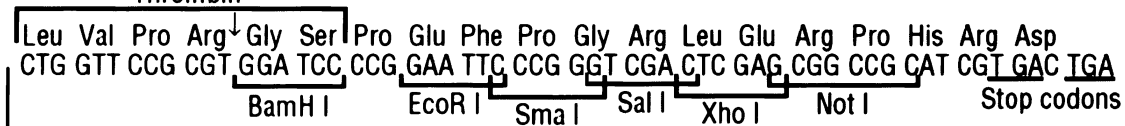
K P S
aaa cca tct
```

Příloha B

Klonovací vektor pGEX- 4T-1 (Amersham Bioscience, Švédsko)

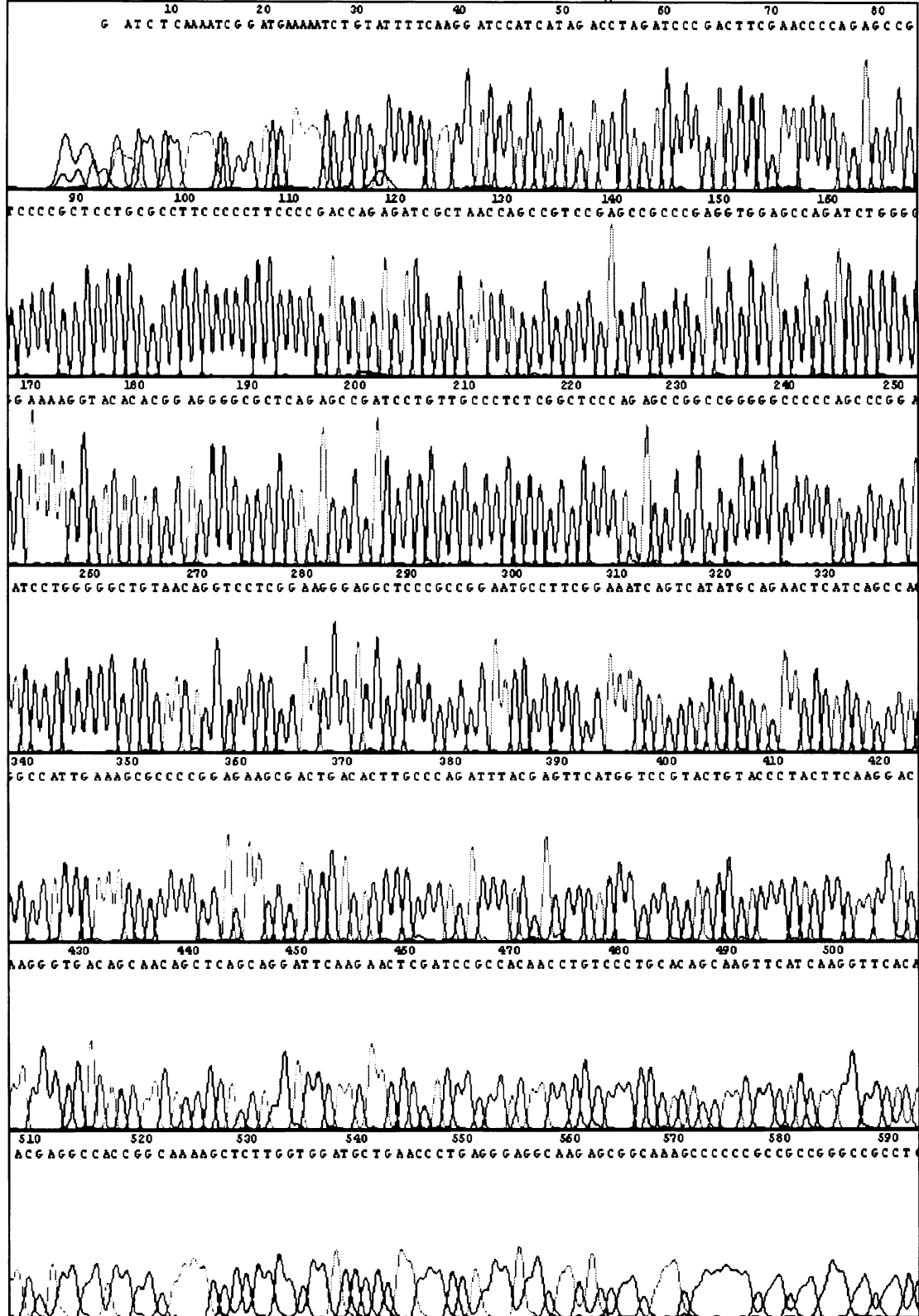
pGEX-4T-1 (27-4580-01)

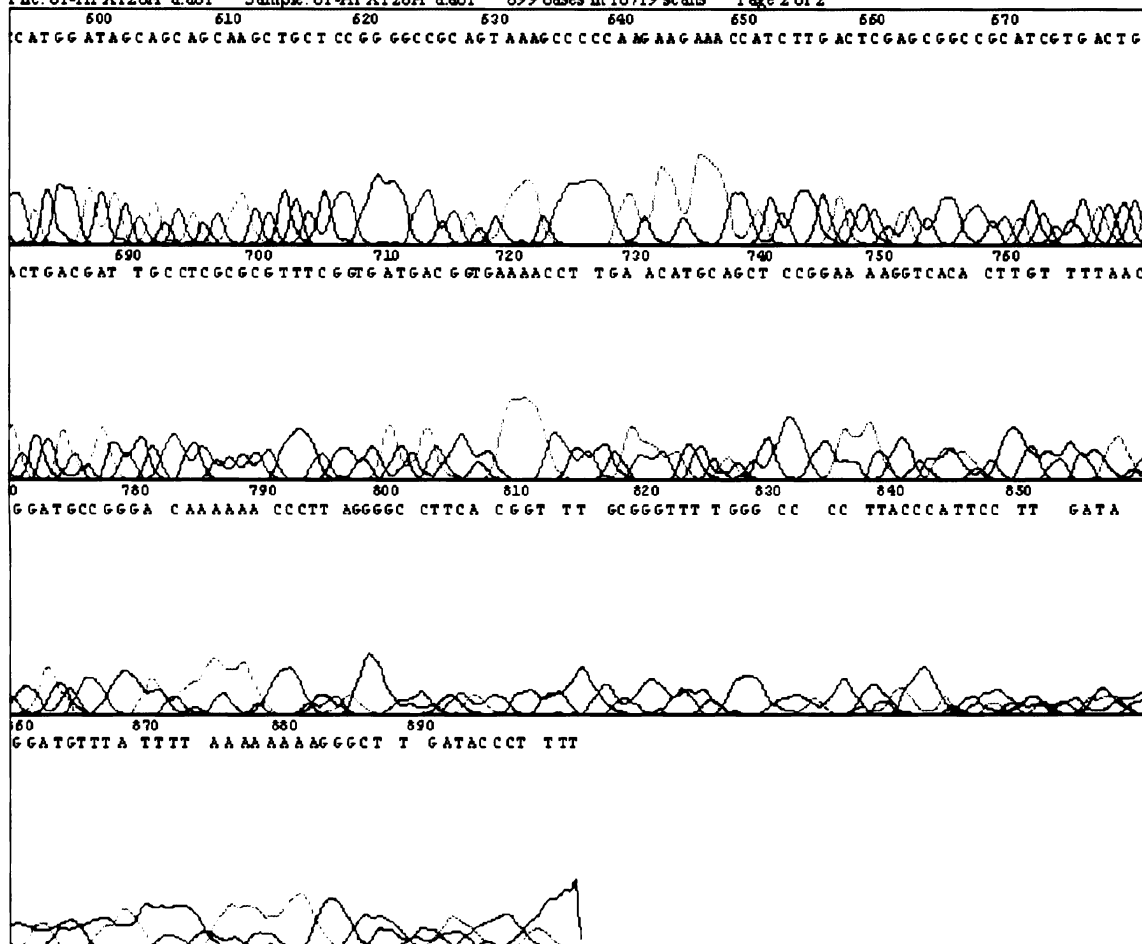
Thrombin



Příloha C: Sekvenační chromatogram genu FoxO4₁₁₋₂₁₃ s mutací Thr-28-Ala

File: 01-AFXT28A a.ab1 Sample: 01-AFXT28A a.ab1 899 bases in 10719 scans Page 1 of 2





Příloha D: Sekvenační chromatogram genu FoxO4₁₁₋₂₁₃ s mutací Ser-193-Ala

File: 10-AFXS193A b.ab1 Sample: 10-AFXS193A b.ab1 822 bases in 9949 scans Page 1 of 2

