

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní specializace: Biofyzikální chemie



Bc. Adam Brzezina

Objasnění vlivu posttranslačních modifikací na interakci proteinů FOXO4 a p53
Elucidating the effect of post-translational modifications on the interaction of FOXO4
and p53 proteins

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.08.2024

Poděkování

V prvé řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odbornost při vedení mé diplomové práce. Děkuji mu rovněž za nadšení, s kterým k badatelské práci přistupuje a za cenné rady, které mi v průběhu práce předal. Dále děkuji své konzultantce RNDr. Veronice Obšilové Ph.D. za její vřelý přístup a za možnost pracovat v její laboratoři. Děkuji Mgr. Kláře Kohoutové za předání celé řady zkušeností v oblasti exprese a purifikace rekombinantních proteinů a Karolíně Honzejkové, Ph.D. za ochotu a velkou pomoc s ovládnutím metody analytické ultracentrifugace. Závěrem bych chtěl poděkovat své rodině a příteli Kamilovi Mrkvanovi za jejich přetrvávající podporu.

Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem protein-proteinové interakce lidských transkripčních faktorů FOXO4 a p53. Za stresových podmínek spolu p53 a FOXO4 v jádře interagují. Jejich interakce je spojena se zvýšenou transkripcí proteinu p21, inhibitoru cyklin-dependentních kinas, který je zodpovědný za zastavení buněčného cyklu a přechod buněk do senescentního stavu. Senescentní buňky jsou vyčleněny z buněčného cyklu a nejsou schopny zastávat svoji fyziologickou funkci, za to však ale zůstávají metabolicky aktivní a do okolí vylučují prozánětlivé faktory. Akumulace senescentních buněk se pokládá za jednu z hlavních příčin stárnutí a je spojena s rozvojem celé řady onemocnění. Je známo, že tvorba komplexu FOXO4:p53 vede k upřednostnění procesu senescence před apoptózou, zatímco narušení této interakce vede k odblokování procesu apoptózy. V důsledku toho jsou senescentní buňky odstraněny, dochází k jejich nahrazení a ke znovuobnovení tkáňové homeostázy. Molekulární mechanismus, jakým tato protein-proteinová interakce reguluje transkripci proteinu p21 není známa. Aktivita p53 i FOXO4 je regulována celou řadou posttranslačních modifikací. Jednou z těchto posttranslačních modifikací je fosforylace FOXO4 proteinkinasou AKT na residuech T32, S197 a S262, ke které dochází po aktivaci PI3K/AKT signální dráhy, jež také souvisí se senescencí. První dvě z těchto fosforylačních míst tvoří vazebná místa pro dimerní regulační proteiny 14-3-3. Stále je však nejasné, zda fosforylace a následná vazba proteinů 14-3-3 nějak ovlivňuje interakci FOXO4 s p53. Proto byl v této práci studován vliv fosforylace FOXO4 a následné vazby dimerního 14-3-3 proteinu na schopnost interagovat s p53 pomocí metody sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace. Výsledky této práce ukazují, že zatímco samotná fosforylace FOXO4 nemá vliv na interakci s p53, vazba 14-3-3 proteinu znemožňuje tvorbu komplexu FOXO4:p53.

Klíčová slova: FOXO, p53, buněčná senescence, protein-protein interakce, posttranslační modifikace, 14-3-3

Abstract

This work deals with the study of protein-protein interaction of human transcription factors FOXO4 and p53. Under stress conditions, p53 and FOXO4 interact in the nucleus. Their interaction is associated with increased transcription of p21 protein, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, which is responsible for cell cycle arrest and the transition of cells to a senescent state. Senescent cells are excluded from the cell cycle and are unable to perform their physiological function, yet they remain metabolically active and secrete pro-inflammatory signals to the environment. The accumulation of senescent cells is considered one of the main causes of aging and is associated with the development of several diseases. It is known that the formation of the FOXO4:p53 complex leads to a preference of the senescence process over apoptosis, whereas disruption of this interaction leads to unblocking of the apoptosis process. As a result, senescent cells are removed, replaced and tissue homeostasis is restored. The molecular mechanism by which this protein-protein interaction regulates p21 protein transcription is unknown. The activity of both proteins is regulated by a variety of post-translational modifications. One of these posttranslational modifications is the phosphorylation of FOXO4 by AKT kinase at residues T32, S197 and S262, which occurs after activation of the PI3K/AKT signalling pathway, also related to senescence. The first two of these phosphorylation sites form binding sites for dimeric regulatory proteins 14-3-3. However, it is still unclear whether phosphorylation and subsequent binding of 14-3-3 proteins somehow affect the interaction of FOXO4 with p53. Therefore, the effect of FOXO4 phosphorylation and subsequent binding of dimeric 14-3-3 protein on the ability to interact with p53 was studied using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation method. The results of this work show that FOXO4 phosphorylation alone does not affect the interaction with p53, whereas binding of 14-3-3 protein prevents the formation of the FOXO4:p53 complex.

Keywords: FOXO, p53, cellular senescence, protein-protein interaction, posttranslational modifications, 14-3-3

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	12
2 Literární přehled	13
2.1 Buněčná senescence	13
2.1.1 Role senescence ve stárnutí	14
2.1.2 Molekulární mechanismy senescence	15
2.2 Transkripce.....	16
2.3 Transkripční faktory	17
2.3.1 Regulace transkripce prostřednictvím transkripčních faktorů.....	18
2.4 Transkripční faktory FOX.....	19
2.4.1 FOXO transkripční faktory.....	20
2.5. Transkripční faktor FOXO4	23
2.5.1 Regulace FOXO4 prostřednictvím PI3K-AKT signální dráhy	23
2.5.2 Regulace FOXO4 prostřednictvím posttranslačních modifikací.....	25
2.5.3 Ostatní mechanismy regulace FOXO4	27
2.6 Transkripční faktor p53	27
2.6.1 Transkripční a cytoplasmatické aktivity p53	28
2.6.2 Doménová architektura p53.....	28
2.6.3 Regulace p53 prostřednictvím MDM2 a proteinového obrátu	31
2.6.4 Regulace p53 prostřednictvím posttranslačních modifikací.....	33
2.7 Role p53 v senescenci	35
2.8 Role FOXO4 v senescenci	35
2.9 Vzájemná souhra FOXO4 a p53 v senescenci	36
3 Cíle práce	38
4 Materiál	39
4.1 Použité chemikálie a biologický materiál	39
4.2 Použité přístroje.....	40
4.3 Ostatní pomůcky	41
5 Metody	42
5.1 Příprava rekombinantních proteinů	42
5.1.1 Exprese a purifikace FOXO4(15-217)	42
5.1.2 Exprese a purifikace p53(1-312) a p53(1-393).....	46
5.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	49

5.3 Fosforylace FOXO4 in vitro pomocí AKT kinasy	50
5.4 Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	51
5.5 Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací	52
5.6 Měření sedimentační rychlosti analytickou ultracentrifugací	52
5.6.1 Příprava vzorků a sběr dat	55
6 Výsledky.....	56
6.1 Purifikace FOXO4 proteinu	56
6.1.1 GST-afinitní chromatografie a štěpení fúzního proteinu.....	56
6.1.2 Kationtově výměnná chromatografie	57
6.1.3 Gelová permeační chromatografie.....	57
6.2 Purifikace p53(1-312) proteinu	58
6.2.1 Niklová chelatační chromatografie a štěpení afinitní kotvy	58
6.2.2 Heparin-afinitní chromatografie	59
6.2.3 Gelová permeační chromatografie.....	60
6.3. Purifikace p53(1-393) proteinu	61
6.3.1 Niklová chelatační chromatografie.....	61
6.3.2 Aniontově výměnná chromatografie	61
6.3.3 Heparin-afinitní chromatografie	63
6.3.4 Gelová permeační chromatografie.....	63
6.4 Fosforylace FOX4 pomocí proteinkinasy AKT <i>in vitro</i>	64
6.4.1 Nativní elektroforéza	64
6.4.2 Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací	66
6.5 Měření sedimentační rychlosti analytickou ultracentrifugací	67
7 Diskuze	71
8 Závěr	75
9 Seznam citované literatury.....	76
10 Přílohy.....	85
10.1 Tabulky se složením použitých roztoků a pufrů	85
10.2 Sekvence proteinů	90
10.2.1 Sekvence proteinu FOXO4(15-217).....	90
10.2.2 Sekvence proteinů p53(1-312) a p53(1-393).....	90
10.2.3 Sekvence proteinu 14-3-3ζ	90

Seznam použitých zkratek

(14-3-3 ζ) ₂	dimer proteinu 14-3-3 (isoforma zéta)
A	adenin
AFX	dříve používaný název pro FOXO4 (z angl. <u>A</u> cute leukemia <u>f</u> usion gene located on chromosome <u>X</u>)
AKT/PKB	proteinkinasa B
ATM	kinasa mutovaná při syndromu Louis-Barové (z angl. <u>a</u> taxia- <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated kinase)
ATP	adenosintrifosfát
AUC	analytická ultracentrifugace
BL21(DE3)	kmen bakterií <i>Escherichia coli</i> vhodný pro expresi proteinů
bp	základní jednotka dvouřetězcových nukleových kyselin (z angl. <u>b</u> ase <u>p</u> air)
<i>c(s)</i>	distribuce sedimentačních koeficientů
C	dle kontextu cytosin (nukleová báze) nebo cystein (aminokyselina)
CBP	CBP acetyltransferasa (z angl. <u>C</u> REB <u>b</u> inding protein)
CDK	cyklin dependentní kinasa
cDNA	komplementární DNA (z angl. <u>c</u> omplementary DNA)
CK1	kasein kinasa 1 (z angl. <u>c</u> asein <u>k</u> inase <u>1</u>)
CK2	kasein kinasa 2 (z angl. <u>c</u> asein <u>k</u> inase <u>2</u>)
CRD	C-koncová regulační doména
CTP	cytidintrifosfát
DBD	DNA-vazebná doména (z angl. DNA-binding domain)
DBE	vazebný element rodiny DAF-16 (z angl. <u>D</u> af-16 family member- <u>b</u> inding <u>e</u> lement)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiothreitol
E	glutamová kyselina
E1	ubikvitin-aktivující enzym
E2	ubikvitin-konjugující enzym
E3	ubikvitin ligasa
F	fenylalanin

FKH-DBD	„forkhead“ DNA-vazebná doména (z angl. <u>f</u> ork <u>h</u> ead <u>D</u> NA- <u>b</u> inding <u>d</u> omain)
FOX	„Forkhead box“ rodina transkripčních faktorů
FOXO	„O“ podrodina forkhead box transkripčních faktorů
G	dle kontextu guanin (nukleová báze) nebo glycin (aminokyselina)
G ₁ fáze	předsyntetická fáze buněčného cyklu
G ₂ fáze	postsyntetická fáze buněčného cyklu
GST	glutathion-S-transferasa
GTP	guanosintrifosfát
His	histidin (alternativně značen jednopísmennou zkratkou H)
HDAC	histonové deacetylasy (z angl. <u>h</u> istone <u>d</u> eacetylases)
HMG1	amphoterin (z angl. <u>h</u> igh- <u>m</u> obility group protein 1)
Chk1	serin/threoninová kinasa Chk1 (z angl. <u>c</u> heckpoint <u>k</u> inase <u>1</u>)
Chk2	serin/threoninová kinasa Chk2 (z angl. <u>c</u> heckpoint <u>k</u> inase <u>2</u>)
IGF-1	růstový faktor podobný insulinu 1 (z angl. <u>i</u> nsuline-like growth <u>f</u> actor <u>1</u>)
IMR90	buněčná linie lidských fibroblastů
IRE	insulin-responsivní element (DNA vazebný motiv)
JNK	JNK kinasa (z angl. c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>k</u> inase)
K	lysin
L	leucin
LB médium	médium pro růst bakterií dle Luria-Bertani (z angl. <u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth)
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
Mb	násobná jednotka dvouřetězcových nukleových kyselin (z angl. <u>m</u> ega <u>b</u> ase); 1 Mb = 10 ⁶ bp
MDMX	lidská ubikvitin ligasa (z angl. <u>m</u> ouse <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>X</u>)
MDM2	lidská ubikvitin ligasa (z angl. <u>m</u> ouse <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>2</u> homolog) známá též jako HDM2 (<u>h</u> uman <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>2</u>)
MEFs	myší embryonální fibroblasty (<u>m</u> ouse <u>e</u> mbryonic <u>f</u> ibroblasts)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
miRNA	microRNA
N	asparagin
NES	nukleární exportní sekvence

NLS	nukleární lokalizační sekvence
OD	optická hustota (z angl. <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
OGT	glukosyl transferasa OGT (z angl. <u>O</u> -linked N-acetylglucosaminyl <u>t</u> ransferase)
OIS	senescence indukovaná onkogenní signalizací (z angl. <u>o</u> ncogene- <u>i</u> nduced <u>s</u> enescence)
P	prolin
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PP2A	protein fosfatasa 2A
pRB	retinoblastomový protein (z angl. <u>r</u> etinob <u>l</u> astoma <u>p</u> rotein)
Pu	purinová báze
Py	pyrimidinová báze
Q	glutamin
R	arginin
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
S	dle kontextu serin (aminokyselina) nebo Svedberg (jednotka sedimentačního koeficientu)
S fáze	syntetická fáze buněčného cyklu
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (z angl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis)
SASP	fenotyp případně sekretom senescentních buněk (z angl. senescence-associated secretory phenotype)
SE AUC	metoda sedimentační rovnováhy analytické ultracentrifugace (z angl. <u>s</u> edimentation <u>e</u> quilibrium)
SGK1	serin/threoninová protein kinasa SGK (z angl. <u>s</u> erum/ <u>g</u> lucocorticoid <u>r</u> egulated <u>k</u> inase 1)
SIRT1	NAD-dependentní deacetylasa SIRT1 (z angl. <u>S</u> irtuin 1)
Skp2	ubikvitin ligasa Skp2 (z angl. <u>S</u> -phase <u>k</u> inase associated <u>p</u> rotein 2)
SV AUC	metoda měření sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace (z angl. <u>s</u> edimentation <u>v</u> elocity)
T	dle kontextu thymin (nukleová báze) nebo threonin (aminokyselina)

TBE	<u>T</u> ris- <u>b</u> orát- <u>E</u> DTA; pufr pro nativní elektroforézu v polyakrylamidovém gelu
TAD	transaktivační doména
TD	tetramerizační doména
TF	transkripční faktory
U	uracil
Ub	ubikvitin
UTP	uridintrifosfát
UTR	nepřekládaná oblast mRNA (z angl. <u>un</u> translated <u>r</u> egion)
wt	divoký typ (z angl. <u>w</u> ild type)
w/v	hmotnost/objem (z angl. <u>w</u> eight/ <u>v</u> olume)
Y	tyrosin

1 Úvod

Protein-proteinové interakce (PPI) jsou stěžejní pro téměř všechny biologické procesy a hrají klíčovou roli v buněčné signalizaci, regulaci a realizaci buněčných funkcí. Přestože dosavadní výzkum strukturovaných proteinů a jejich interakcí čerpá obrovského úspěchu v oblasti strukturní biologie, podstatnou část proteomu tvoří proteiny, které obsahují nestrukturované oblasti nebo jsou zcela neuspořádané. Studium neuspořádaných proteinů (IDPs, z angl. intrinsically disordered proteins) se však těší rostoucímu zájmu vzhledem k jejich zapojení do důležitých buněčných procesů, včetně signální transdukce (až 75 % signálních proteinů u savců obsahuje > 30 aminokyselin dlouhé neuspořádané oblasti [1]), regulace transkripce, nebo při tvorbě biomolekulárních kondenzátů důsledkem fázové separace a také proto, že jejich působení je implikováno v celé řadě patologií včetně rakoviny, neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění.

IDPs nemají za fyziologických podmínek stabilní trojrozměrnou strukturu, čímž jejich studium představuje v mnoha ohledech jedinečnou výzvu. Tradiční techniky strukturní biologie, jako je rentgenová krystalografie a kryoelektronová mikroskopie se při objasňování molekulárních detailů interakcí spoléhají na přítomnost stabilní, dobře definované struktury. Přirozená flexibilita a absence stabilní konformace IDPs proto činí tyto metody do značné míry neúčinnými. IDPs se často zapojují do dynamických, přechodných interakcí a jsou schopné interagovat s více různými vazebnými partnery v důsledku jejich konformační plasticity. Nukleární magnetická resonance (NMR) roztoků proteinů sice umožňuje nahlédnout do konformačních souborů IDPs v atomárním rozlišení, avšak je omezena na studium malých systémů < 60 kDa [2].

Oba proteiny, FOXO4 i p53, obsahují rozsáhlé neuspořádané oblasti (IDRs, z angl. intrinsically disordered regions), a proto studium jejich protein-proteinové interakce přináší stejné výzvy. Tato diplomová práce navazuje na charakterizaci vazebného rozhraní mezi těmito proteiny a rozvíjí problematiku této interakce o vliv posttranslačních modifikací, konkrétně je pomocí analytické ultracentrifugace studován efekt fosforylace FOXO4 proteinkinasou AKT a následné vazby 14-3-3 na schopnost interagovat s p53.

2 Literární přehled

2.1 Buněčná senescence

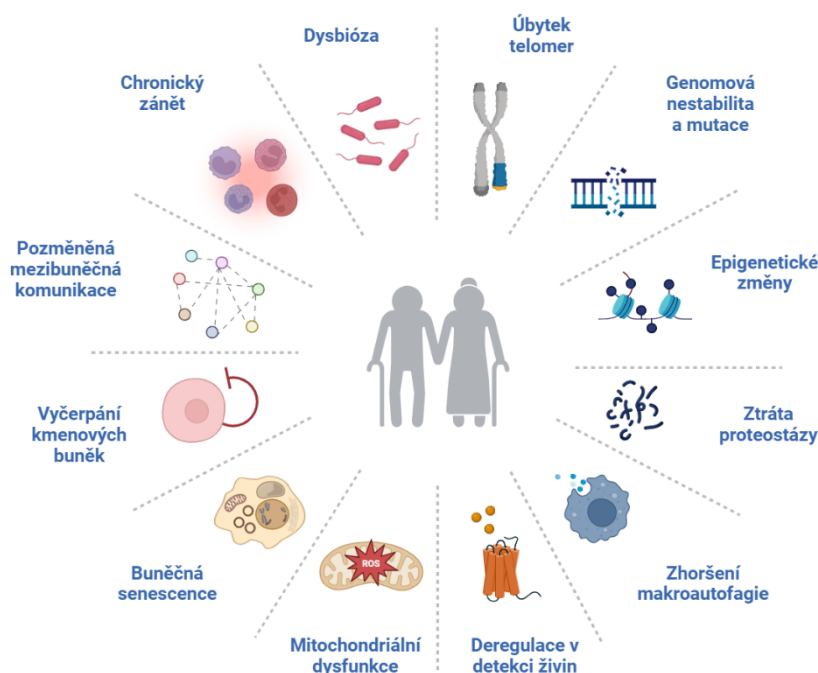
Buněčná senescence (též pouze „senescence“) je definována jako stav trvalého zastavení buněčného cyklu [3]. Senescence byla poprvé popsána Hayflickem a Moorheadem v roce 1961 při jejich pozorování nevratného zastavení růstu lidských fibroblastů při dosažení konečného počtu buněčných dělení po rozsáhlé kultivaci, navzdory přítomnosti dostatku růstových faktorů a mitogenních podnětů [4]. Zároveň autoři vyslovili domněnku, že senescence probíhá také *in vivo* jako přirozená součást procesu stárnutí a jako mechanismus zabraňující nekontrolovanému růstu poškozených buněk, což přispívá k potlačení rakoviny [5].

Tento názor se setkal s nedůvěrou většiny tehdejší vědecké komunity, a obecně byl spíše přijímán názor, že buněčná senescence pozorována *in vitro* je artefaktem buněčné kultivace (neschopností přesně napodobit *in vivo* podmínky) než biologicky relevantním procesem v živých organismech [6], [7]. Postupně se však hromadily důkazy o senescentních buňkách ve stárnoucích tkáních a za patologických stavů, což vedlo k pozdějšímu přijetí jejich hypotézy a dnes je již zcela jasné, že senescence je fyziologický proces. Později byl tento zvláštní typ senescence (tzv. replikační senescence) kauzálně spojen s úbytkem telomer, procesu, který vede k chromozomální nestabilitě a podporuje tumorigenezi v souladu s původní hypotézou Hayflicka a Moorheada [8]. Následné studie posílily význam senescence jakožto obranného mechanismu před nekontrolovaným množením poškozených buněk a v potlačení rozvoje nádorových onemocnění [9].

Nové studie však ukazují, že fyziologický význam buněčné senescence přesahuje rámec potlačování nádorů a týká se řady dalších biologických procesů, např. embryonálního vývoje [10], [11], hojení ran, opravy a remodelace tkání a stárnutí organismu [12], [13]. Senescenci doprovází výrazné fenotypové změny (zejména v oblasti struktury chromatinu a sekretomu buněk) a odolnost vůči buněčné smrti [9], [14].

2.1.1 Role senescence ve stárnutí

Pokročilý věk představuje u člověka hlavní rizikový faktor pro celou řadu onemocnění včetně rakoviny, cukrovky, kardiovaskulárních a neurodegenerativních poruch [15]. Obecně se má za to, že ke stárnutí dochází v důsledku postupné ztráty funkce tkání a orgánů. Základní molekulární a buněčné mechanismy podmiňující stárnutí však zůstávají předmětem rozsáhlého výzkumu* [17]. Buněčná senescence přitom představuje jeden ze základních mechanismů podporující proces stárnutí (viz obr. 2.1).



Obrázek 2.1: Molekulární a buněčné mechanismy podmiňující stárnutí. Vytvořeno pomocí Biorender.com. Kategorie převzaté z [17].

Předpokládá se, že senescentní buňky narušují strukturu a funkci tkání kvůli sekreci interleukinů, prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů[†] do jejich mikrobuněčného okolí, což se může přenést v chronický zánět [19]. Senescentní buňky mají pozměněný fenotyp a mohou být rozpoznány a eliminovány buňkami imunitního systému, přičemž s přibývajícím

* Až ~300 000 článků bylo publikováno na téma stárnutí v letech 2013-2023. V roce 2013 byl v časopise *Cell* publikován článek „The Hallmarks of Aging“ (Charakteristické znaky stárnutí), který poskytuje komplexní rámec pro pochopení biologických procesů, které podmiňují proces stárnutí [16]. V roce 2023 byl v *Cell* publikován další článek od stejných autorů, v němž je problematika stárnutí rozvedena o nové poznatky získané za deset let výzkumu [17].

[†] Souhrnně se sekretom senescentních buněk označuje jako SASP (z angl. *senescence-associated secretory phenotype*) [18].

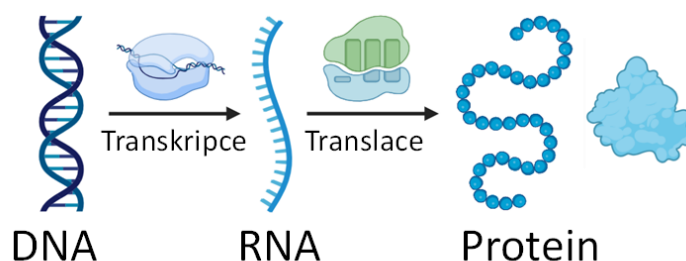
věkem se imunitní systém stává při odstraňování senescentních buněk méně účinným, což vede k jejich hromadění v různých tkáních a orgánech [20]. Nejpřesvědčivějším důkazem kauzální role buněčné senescence ve stárnutí je, že kontinuální genetická nebo farmakologická eliminace senescentních buněk u přirozeně stárnoucích myší prodlužuje dobu, po kterou organismus žije bez chronických onemocnění způsobených stárnutím (angl. tzv. healthspan) a dobu života (angl. lifespan) [21]. Na modelech myší s již rozvinutými onemocněními se prokázalo farmakologické odstranění senescentních buněk jako léčebné [22]. Několik klinických studií cílících na odstranění senescentních buněk pro různé indikace již dokončilo první fázi a v současnosti další klinické studie probíhají nebo jsou plánovány (přehled probíhajících klinických studií zde [23]).

2.1.2 Molekulární mechanismy senescence

Senescence může být indukována celou řadou buněčných stresorů, mezi něž patří např. úbytek telomer, poškození DNA, onkogenní signalizace, mitochondriální dysfunkce nebo oxidační stres, přičemž existují dvě hlavní signalizační dráhy, které vyvolávají a udržují senescenci [24]. Jedna dráha je řízena transkripčním faktorem a tumorovým supresorem p53 a proteinem p21 (inhibitorem CDK2), který spadá pod transkripční kontrolu p53. Druhá dráha je řízena proteinem p16^{INK4A}, který je inhibitorem CDK4 a CDK6 [9]. Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou klíčovými hráči progresu buněčného cyklu. Spolu s partnerskými cyklin proteiny umožňují přechod z G₁ přípravné fáze do S fáze buněčného cyklu. Inhibice CDK proteinů blokuje fosforylaci retinoblastomového proteinu (pRB), čímž pRB zůstává ve své aktivní hypofosforylované formě, a dále aktivuje E2F transkripční faktory, což vede ke stabilnímu zastavení buněčného cyklu a indukci senescence [25], [26]. Senescentní buňky mají zvýšenou transkripci několika anti-apoptických proteinů, včetně BCL-2 a BCL-xL, čímž se stávají odolnými vůči apoptóze [27]. Různé buněčné stresory sice zasahují do různých signalizačních kaskád, ale nakonec aktivují p53, p16^{INK4A} nebo oba tyto proteiny [9].

2.2 Transkripce

Transkripce je základní biologický proces, při kterém se genetická informace zakódovaná v pořadí deoxyribonukleotidů DNA kopíruje do sekvence ribonukleotidů RNA, vzniká tak nová molekula RNA, která je syntetizována na základě komplementarity dusíkatých bází podle vzoru nekódujícího vlákna DNA, a to za účasti enzymu DNA-dependentní RNA polymerasy. Vzniklý primární RNA transkript je u eukaryot dále zpracováván tzv. posttranskričními úpravami, výsledným produktem těchto úprav je buď funkční nekódující RNA nebo mRNA (z angl. messenger RNA), podle které se v procesu translace syntetizuje bílkovina [28]. Transkripce tudíž zahajuje proces genové exprese, jenž lze vystihnout jednoduchým schématem (viz obr. 2.2) [29].



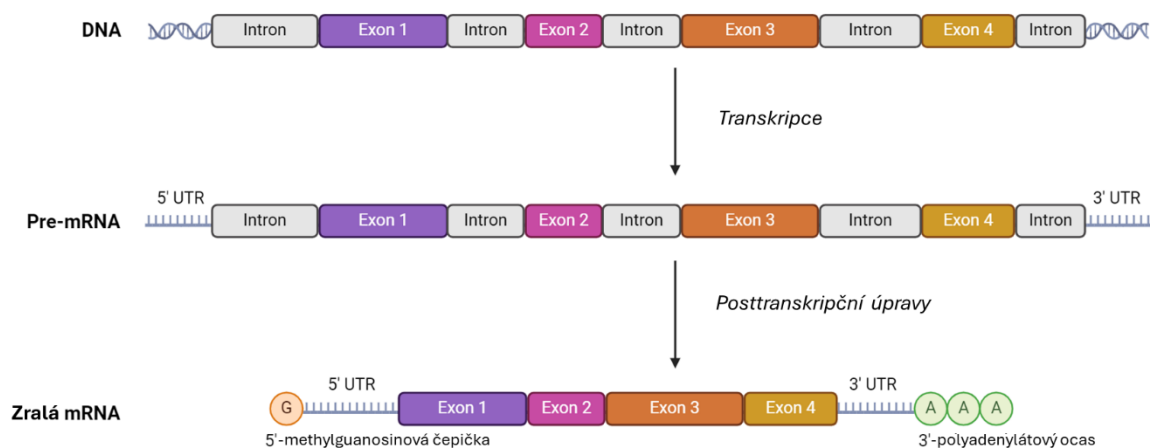
Obrázek 2.2: Schéma genové exprese. Vytvořeno pomocí Biorender.com

Prokaryotní organismy mají k dispozici pouze jednu RNA polymerasu, zatímco eukaryoty mají nejméně tři typy RNA polymeras, a každá z nich je zodpovědná za přepis různých podtypů RNA. RNA polymerasy I a III syntetizují funkční nekódující RNA, kdežto RNA polymerasa II syntetizuje všechny protein-kódující geny [30].

Kroky transkripce lze obecně rozdělit do tří hlavních fází: iniciace, elongace a terminace. V iniciační fázi dochází k navázání transkripčních faktorů a RNA polymerasy na promotor, vzniká tzv. iniciační komplex. Promotor je klíčovou a specifickou sekvencí DNA daného genu, rozpoznávaný RNA polymerasou a transkripčními faktory, které zajišťují přesnou kontrolu genové exprese. RNA polymerasa rozvine dvojité vlákno DNA a přesouvá se po vláknech DNA k místu začátku transkripce. Elongace se uskutečňuje čtením nekódujícího (templátového) vlákna DNA ve směru od 3' do 5' konce RNA polymerasou, ta současně katalyzuje postupné připojování ribonukleosidtrifosfátů (ATP, UTP, GTP, CTP) fosfodiesterovou vazbou [28]. Molekula RNA je proto syntetizována ve směru opačném (5'→3'). Transkripce je ukončena přepisem tzv. terminační sekvence, například

tzv. polyadenylačního signálu AAUAAA u genů kódujících proteiny, kde A = adenin a U = uracil [31]. Nově syntetizovaná molekula RNA je uvolněna, v případě eukaryot dále následují post-transkripční úpravy (viz obr. 2.3).

Na 5' konec pre-mRNA je přes trifosfátový můstek připojena 7-methylguanosinová čepička a na 3' konec dochází k připojení několika desítek adenylátových zbytků, vzniká tzv. polyadenylátový ocas. Tyto úpravy slouží jednak k lokalizaci mRNA do cytosolu, a dále chrání konce řetězce před exonukleasami. Další posttranskripční modifikací je sestřih (z angl. splicing), který spočívá ve specifickém vyštěpení nekódujících sekvencí primárního transkriptu (tzv. intronů). Ve zralé mRNA se taktéž na 5' a 3' konci nachází sekvence ribonukleotidů, které nejsou v procesu translace překládány do sekvence aminokyselin, nazývají se UTR (z angl. untranslated region) [32]. Transkripční kontrola stojí na samotném počátku genové exprese a je bez sporu pro buňku zcela stěžejní proces, a proto podléhá přísné regulaci prostřednictvím transkripčních faktorů.



Obrázek 2.3: Zpracování RNA u eukaryot. Vytvořeno pomocí Biorender.com

2.3 Transkripční faktory

Jako transkripční faktory (TF) se označují všechny proteiny, které se podílejí na regulaci transkripce v její iniciační fázi. Tyto proteiny se buď vážou na specifická místa v regulačních oblastech DNA – tzv. elementech promotoru, obvykle o délce 5–12 nukleotidových párů, nebo jsou součástí iniciačního komplexu transkripce. Rozlišují se transkripční faktory obecné (bazální), které jsou právě potřebné k vytvoření iniciačního komplexu, a bez kterých by nebylo možné docílit stabilní interakce RNA polymerasy

s promotorem nutné pro zahájení transkripce, a dále transkripční faktory specifické, které se dále dělí na induktory a represory, podle toho, zda usnadňují nebo znemožňují vazbu RNA polymerasy na DNA [28].

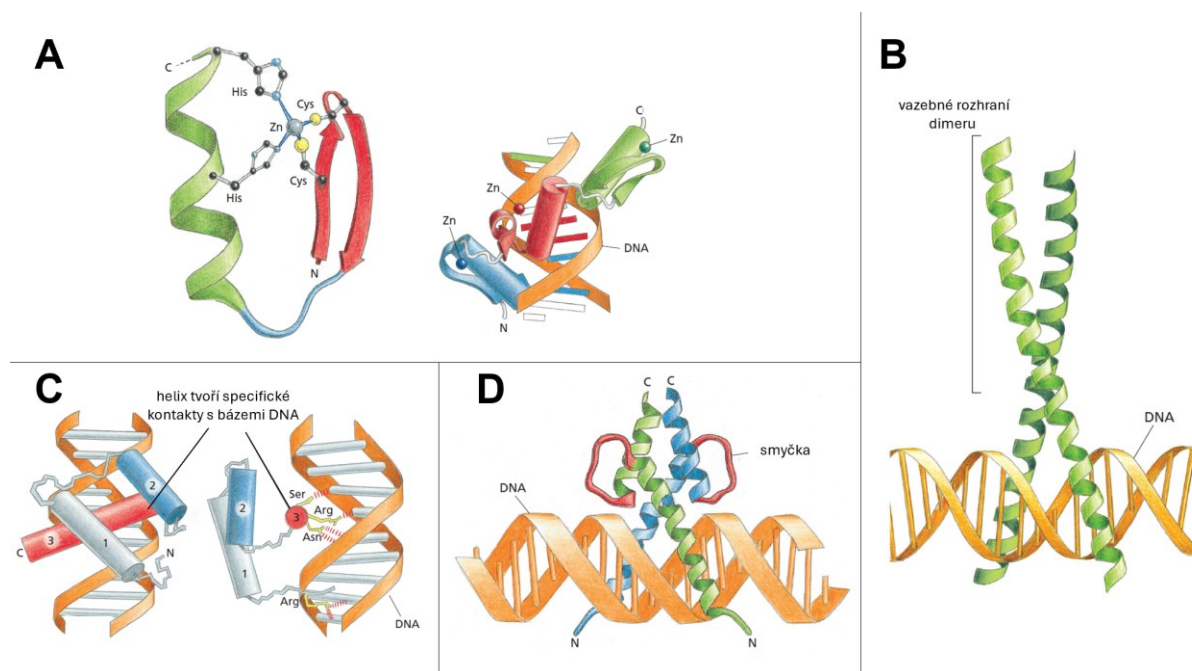
Elementy promotoru, které tvoří vazebná místa pro induktory a represory se obvykle nenachází v bezprostřední blízkosti místa zahájení transkripce daného genu RNA polymerasou, ale jsou vzdáleny 100 bp až 1 Mb, a to ve směru k 5' konci (angl. „upstream“) nebo 3' konci (angl. „downstream“) [33]. Jeden z modelů, popisujících jak se takto vzdálené transkripční faktory podílí na iniciaci transkripce cíleného genu, spočívá v ohýbání DNA či tvorbě smyček ve struktuře DNA, které prostorově přibližují induktory/represory k iniciačnímu komplexu a umožňují přímou interakci s iniciačním komplexem, případně mohou interakci zprostředkovávat další mediátorové proteiny [34]. Jiný model zdůrazňuje úlohu chromatinu ke zprostředkování interakcí. Vazba transkripčních faktorů může způsobit změny v struktuře chromatinu, čímž se promotorová oblast stane přístupnější pro transkripční mašinerii [35].

2.3.1 Regulace transkripce prostřednictvím transkripčních faktorů

Genová exprese je nejčastěji regulována již na úrovni transkripce. Oproti ostatním kontrolním bodům genové exprese (např. regulace degradace proteinů nebo jejich aktivity), totiž jediná transkripční kontrola zajišťuje, že buňka nebude syntetizovat nadbytečné meziprodukty. Lidský genom obsahuje asi 25 000 genů a 20 000 z nich náleží protein-kódujícím genům, přičemž přibližně 10 % z protein-kódujících genů většiny organismů připadá na transkripční faktory, což je dělá jednu z nejpočetnějších proteinových tříd v buňce [28]. Přestože existují případy redundance, transkripční faktory obvykle rozpoznávají unikátní regulační sekvenci nukleotidů DNA, která je odlišná od jiných regulačních sekvencí rozpoznávaných dalšími transkripčními faktory.

Molekulární rozpoznávání elementů promotoru transkripčními faktory obecně spoléhá na komplementaritu povrchu proteinu s povrchovými rysy dvojité šroubovice DNA, podmíněné sekvencí nukleotidů. TF navazují řadu kontaktů s DNA, které zahrnují vodíkové vazby, iontové vazby a hydrofobní interakce. Přestože jednotlivě se jedná o slabé kontakty, tak v jejich obvyklém počtu ~20 kontaktů, které se tvoří na rozhraní DNA s transkripčními faktory, zajišťují vysoce silnou a specifickou interakci [28]. Přestože jednotlivé kontakty na rozhraních protein–DNA jsou v detailech pokaždé jedinečné, transkripční faktory spoléhají

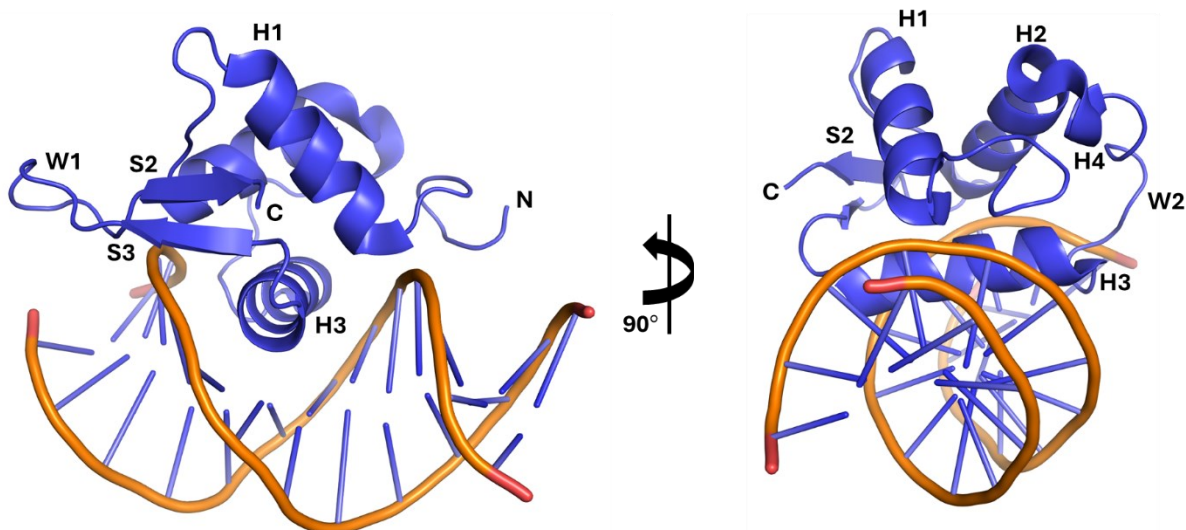
na některý z omezeného souboru DNA vazebných strukturních motivů (viz obr. 2.4). Tyto motivy obvykle využívají buď α -helixy, nebo β -listy k vazbě na hlavní žlábek DNA, přičemž boční řetězce aminokyselin, které z těchto motivů vystupují, vytvářejí specifické kontakty s DNA. Daný strukturní motiv tak může být použit k rozpoznání mnoha různých regulačních sekvencí v závislosti na specifických postranních řetězcích, které z něj vycházejí [28].



Obrázek 2.4: Typické strukturní motivy DNA-vazebných domén transkripčních faktorů. (A) Zinkový prst – α -helix a β -list propojené iontem Zn^{2+} . (B) Leucinový zip – dva α -helixy vážící se na DNA jako dimer. (C) Homeodoména – tři spojené α -helixy. (D) Helix-smyčka-helix (z angl. „helix-turn-helix“). Převzato a upraveno [28].

2.4 Transkripční faktory FOX

Forkhead box (zkráceně FOX) proteiny tvoří početnou rodinu transkripčních faktorů, kterou spojuje přítomnost evolučně konzervované „forkhead“ DNA vazebné domény (zkráceně FKH-DBD, z angl. Forkhead DNA binding domain). Dohromady bylo identifikováno 50 FOX proteinů v lidském genomu, ty jsou rozděleny do 19 podrodin (názvy abecedně od FOXA až po FOXS) na základě sekvenční homologie uvnitř a vně FKH-DBD [36]. DNA vazebná doména FOX transkripčních faktorů představuje kompaktní α/β protein tvořený asi ~ 100 aminokyselinami s třemi α -helixy (H1-H3), třemi β -řetězci (S1-S3) a dvěma smyčkami (W1-W2) (viz obr. 2.5) [37], [38].



Obrázek 2.5: DNA vazebná doména FOX transkripčních faktorů. Zde krystalová struktura FOXO4-DBD v komplexu s DNA (PDB: [3L2C](#)). Prvky sekundární struktury jsou značené v souladu s typickou nomenklaturou pro FKH-DBD. U FOXO4 se navíc oproti jiným FOX proteinům vyskytuje čtvrtý 3_{10} -helix (H4) [38]. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.2.4.1, Schrödinger, LLC.

Zakládající člen rodiny FOX byl identifikován u octomilky (*Drosophila melanogaster*) před více než třemi desetiletími. Bylo zjištěno, že mutace homeotického[‡] genu forkhead (fkh) vedla ke vzniku ektopických hlavových struktur u embryí octomilky připomínající vidličku, čímž vznikl i název rodiny (angl. vidlička–fork, hlava–head, odtud forkhead) [39].

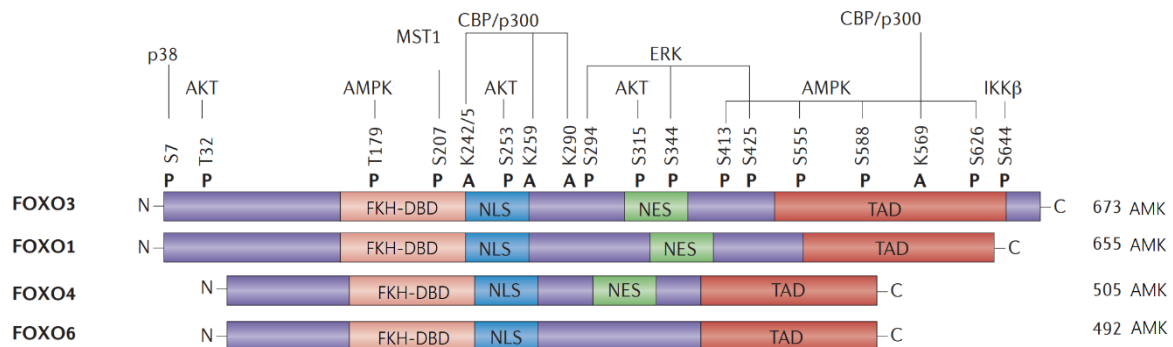
FOX proteiny jsou zodpovědné za přesné prostorové a časové ladění exprese plejády genů během růstu i v dospělých tkáních. Jejich funkce v rámci organismu jsou natolik různorodé, že detailní popis by byl značně obsáhlý [36]. Proto v této práci bude pozornost dále věnována pouze podrodině „O“ (FOXO), která je pravděpodobně nejlépe studovanou podrodinou FOX proteinů, a později zejména FOXO4 proteinu, protože je studován v experimentální části této práce.

2.4.1 FOXO transkripční faktory

U člověka podrodina FOXO zahrnuje čtyři proteiny: FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. Savčí FOXO jsou hojně exprimovány téměř ve všech tkáních v těle, s výjimkou FOXO6, který je patrně přítomen pouze v mozkové tkáni dospělých jedinců [36]. Molekuly FOXO proteinů jsou tvořeny již zmíněnou FKH-DBD doménou, která je vysoce kompaktní a představuje jedinou strukturovanou oblast FOXO proteinů (~75 % proteinu je

[‡] Homeotický gen je označení pro geny, které mají významnou roli v embryonálním vývoji anatomických struktur a částí těla mnohobuněčných organismů.

nestrukturovaná) [40], C-koncovou transaktivační doménou (TAD) a dále dvěma evolučně konzervovanými sekvencemi: nukleární lokalizační sekvencí (NLS) a nukleární exportní sekvencí (NES) [41], která však chybí v sekvenci FOXO6 proteinu [36] (viz obr. 2.6). Nestrukturované oblasti FOXO proteinů jsou funkčně důležité, obsahují místa pro posttranslační modifikace a vazebná místa pro protein-proteinové interakce [42].



Obrázek 2.6: Doménová organizace FOXO proteinů. FKH-DBD – Forkhead DNA vazebná doména, NLS – nukleární lokalizační sekvence, NES – nukleární exportní sekvence, TAD – transaktivační doména. Pro FOXO3 protein jsou dále vyznačeny regulační aminokyselinové zbytky, které podléhají posttranslačním modifikacím, a příslušné kinasy/acetylasy. P – fosforylační místo, A – acetylační místo. Převzato a upraveno [36].

Transkripční faktory FOXO se váží jako monomery na dva různé promotorové DNA elementy, DBE (z angl. Daf-16 binding element) o sekvenci nukleových bází 5'-GTAAA(C/T)AA-3' a IRE (z angl. insulin-responsive element) o sekvenci 5'-(A/C)(A/C)AAA(C/T)AA-3' [43]. Exprese genů pod transkripční kontrolou FOXO proteinů může být zřejmě řízena kterýmkoli členem FOXO podrodiny (v rámci FKH-DBD jsou pouze drobné rozdíly v aminokyselinové sekvenci, viz sekvenční srovnání na obr. 2.7) a specifita jednotlivých FOXO proteinů je tak alespoň částečně určena rozdíly v jejich expresních profilech [44], [45].

2.5. Transkripční faktor FOXO4

Transkripční faktor FOXO4, dříve také AFX (z angl. Acute Leukemia Fusion protein on chromosome X), byl objeven a identifikován jako součást fúzního genu, který je výsledkem chromosomální translokace u akutní leukemie [49]. U savců je FOXO4 exprimován po celém těle, nejvíce pak v srdci, mozku, ledvinách, plicích a kosterním svalstvu [46].

Aktivita FOXO4 je přísně regulována především signalizací růstových faktorů a buněčným stresem prostřednictvím posttranslačních modifikací, jejichž různé kombinace pozměňují transkripční aktivitu (tj. efektorové transkripční programy) a ovlivňují DNA-vazebnou afinitu, vnitrobuněčnou lokalizaci, stabilitu proteinu a následně i poločas (obrat) proteinu a interakce s dalšími molekulami, jako jsou koaktivátory, korepresory a další transkripční faktory [50].

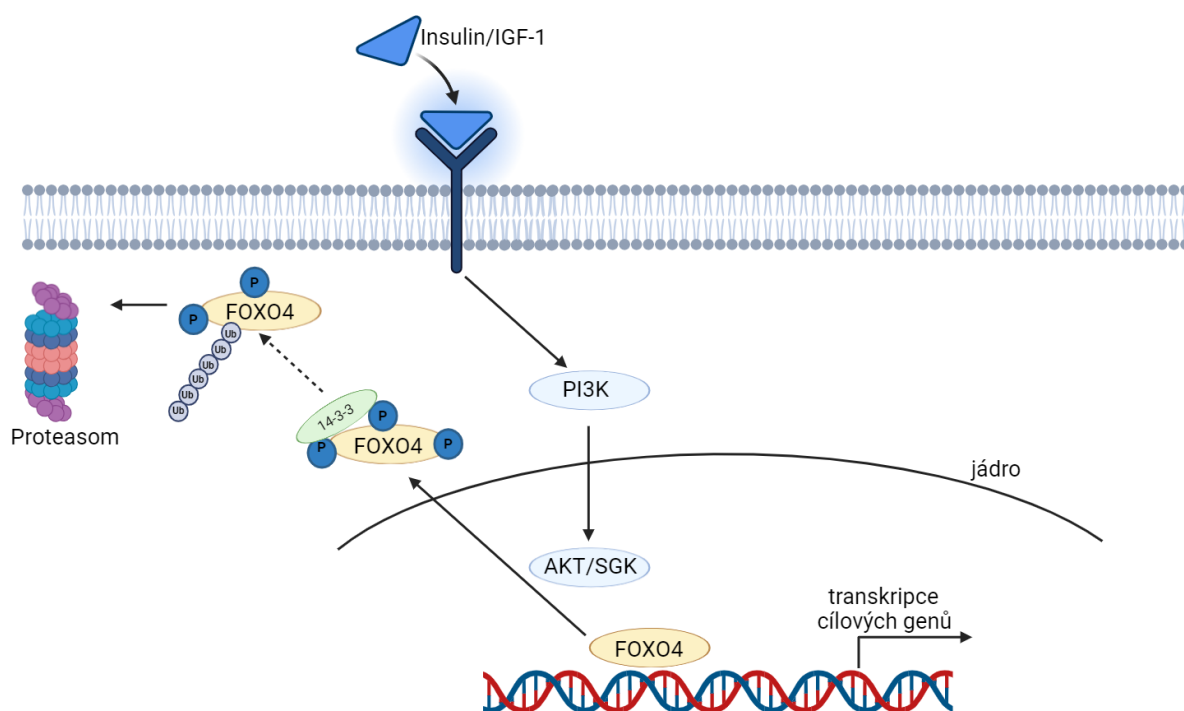
Aktivita FOXO4 je dále regulována na úrovni transkripce, kde aktivní FOXO4 regulují svou vlastní expresi nebo expresi ostatních členů FOXO podrodiny, ale také posttranskripčně, kde zasahují molekuly mikroRNA, tj. krátké nekódující RNA (o 21-25 nukleotidech) [51], které inhibují translaci cílových mRNA jejich navázáním na základě částečné komplementarity bází [52].

2.5.1 Regulace FOXO4 prostřednictvím PI3K-AKT signální dráhy

FOXO transkripční faktory jsou jedny z hlavních přímých substrátů proteinkinasy AKT (též známé pod názvem PKB, z angl. protein kinase B) v reakci na buněčnou stimulaci růstovými faktory nebo insulinem. Vazba růstových faktorů nebo insulinu na jejich tyrosinkinasové receptory způsobuje aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), která následně aktivuje několik serinových/treoninových proteinkinás, včetně rodiny proteinkinás AKT a příbuzné rodiny proteinkinás SGK (z angl. serum and glucocorticoid inducible kinase) [53]. PI3K-AKT signální dráha je nezbytná pro přežití a růst buněk během vývoje a karcinogeneze. Její důležitost podtrhuje skutečnost, že je evolučně konzervována mezi druhy od bezobratlých přes ryby, plazy, obojživelníky až po savce, a dále fakt, že je často deregulována v rámci nádorových onemocnění [54], [55].

AKT/SGK fosforyluje FOXO proteiny na třech residuích[§], v případě FOXO4 se jedná o T32, S197 a S262^{**}, přičemž první dvě fosforylační místa tvoří vazebná místa pro regulační 14-3-3 protein. Vazba dimeru 14-3-3 proteinu zapříčiňuje export FOXO proteinů z jádra do cytoplasmy, kde FOXO nejsou schopny vykonávat funkci transkripčních faktorů (viz obr. 2.8) [58]. Mechanismus exportu zprostředkovaný vazbou 14-3-3 spočívá v zakrytí NLS, čímž je zabráněno opětovnému vstupu do jádra a v odkrytí NES, čímž dochází k rychlejšímu rozpoznání této sekvence a následnému exportu FOXO prostřednictvím exportinů. Fosforylované FOXO proteiny jsou degradovány v proteasomu [59].

Současný model regulace FOXO proteinů předpokládá jejich kontinuální transport mezi jádrem a cytoplasmou. Existují také důkazy pro to, že fosforylace druhého fosforylačního místa proteinkinasou AKT, které se nachází v rámci NLS, vede ke konformačním změnám a/nebo změně náboje této sekvence. Tyto děje NLS inaktivují a tím posouvají rovnováhu



Obrázek 2.8: Schéma inhibice FOXO transkripčních faktorů. FOXO proteiny jsou inhibovány prostřednictvím PI3K/AKT signální dráhy v odpovědi na vazbu insulinu nebo růstových faktorů na jejich tyrosin kinasové receptory (např. IGF-1, z angl. *insuline-like growth factor 1*). Vytvořeno pomocí Biorender.com

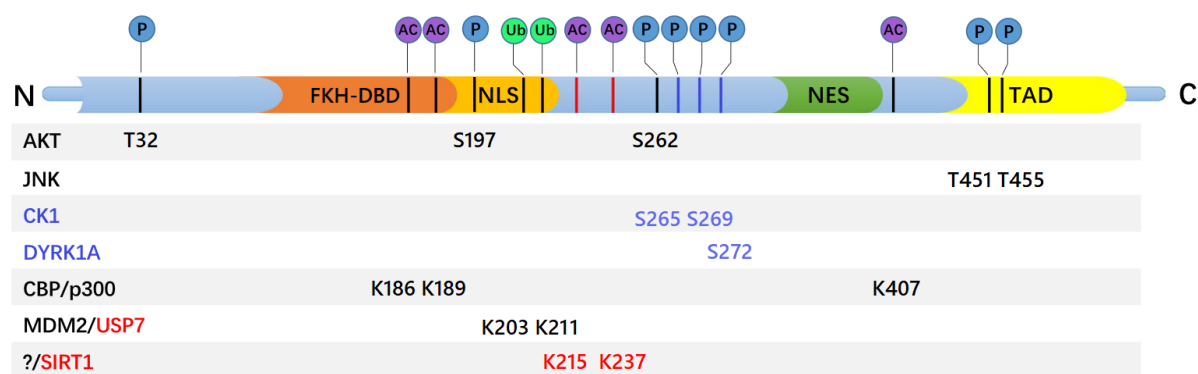
[§] Proteinkiny AKT a SGK fosforylují FOXO4 na stejných residuích, ale vykazují různé preference fosforylačních míst. Zatímco SGK preferuje fosforylaci T32 a S262, tak AKT přednostně fosforyluje T32 a S197 [56].

^{**} Aminokyselinové zbytky, které jsou fosforylovány proteinkinasami AKT/SGK se nacházejí v evolučně konzervovaných oblastech sekvence FOXO proteinů, to podtrhuje jejich význam jakožto hlavního regulačního prvku FOXO proteinů [57].

směrem k lokalizaci FOXO v cytoplasmě. Tento alternativní mechanismus translokace FOXO proteinů je nezávislý na proteinech 14-3-3 [53], [60].

2.5.2 Regulace FOXO4 prostřednictvím posttranslačních modifikací

FOXO proteiny podléhají celé řadě posttranslačních modifikací, zejména fosforylaci, acetylaci a ubiquitinaci, ale jsou známé také případy methylace a glykosylace [61]. V následující části textu budou uvažovány především ty posttranslační modifikace, které byly experimentálně potvrzené *in vivo*, nikoliv posttranslační modifikace předpovězené ze sekvence. Hlavní posttranslační modifikace FOXO4 proteinu jsou shrnuty na obr. 2.9.



Obrázek 2.9: Hlavní místa posttranslačních modifikací FOXO4 v rámci jeho doménové architektury. Legenda: P – fosforylační místo, AC – acetylační místo, Ub – ubiquitinační místo. Černě jsou vyznačeny potvrzené posttranslační modifikace. Předpovídané posttranslační modifikace na základě sekvenčního alignmentu s ostatními členy FOXO podrodiny jsou vyznačeny modře. Červeně jsou vyznačeny ty enzymy a příslušné posttranslační modifikace, které jsou tímto enzymem odstraněny (např. SIRT1 deacetyluje FOXO4 na residuích K215 a K237, přitom acetylasy zodpovědná za vznik této posttranslační modifikace není známa – symbolizováno otazníkem). Převzato a upraveno [52].

2.5.2.1 Fosforylace FOXO4

V modulaci aktivity FOXO4 hrají hlavní roli fosforylace. Kinasy podílející se na fosforylaci FOXO4 lze rozdělit podle toho, zda zvyšují transkripční aktivitu FOXO4 (JNK) a nebo ji snižují (AKT, SGK, CK1, DYRK, NLK, ERK) [50].

V odpovědi na oxidační stres nebo probíhající zánět zprostředkovaný signalizací cytokinem TNF- α (z angl. tumor necrosis-factor α) dochází k aktivaci proteinkinasy JNK (z angl. c-Jun N-terminal kinase). JNK fosforyluje FOXO4 na residuích T451 a T455, přičemž tyto modifikace vedou k translokaci FOXO4 do jádra a aktivaci FOXO4 řízených

transkripčních programů [62]. Je třeba poznamenat, že fosforylační místa rozpoznávané proteinkinasou JNK u FOXO1 a FOXO3 chybí [15].

2.5.2.2 Acetylace FOXO4

FOXO4 je *in vivo* acetylován CBP acetyltransferasou (z angl. CREB-binding protein) a homologní acetyltransferasou p300 na třech lysinových residuích: K186, K189 a K407. První dva lysinové zbytky se nachází v rámci FKH-DBD a bylo zjištěno, že tyto modifikace snižují transkripční aktivitu FOXO4 u řady klíčových genů [63]. U FOXO1 a FOXO3 bylo dále ukázáno, že tyto modifikace přímo snižují DNA-vazebnou afinitu.

Acetylace inhibují aktivitu FOXO4, zatímco deacetylace aktivitu zvyšují. FOXO4 může být deacetylován histonovými deacetylasy (HDAC) na těch residuích, které jsou acetylovány CBP/p300, takže aktivita HDAC působí proti snížení transkripční aktivity FOXO4 [52]. Na jiných residuích jsou deacetylace zprostředkovány NAD-dependenční deacetylasy SIRT1 a bylo ukázáno, že i tyto deacetylace mají za účinek zvýšení DNA-vazebné afinity u řady cílových genů [64].

2.5.2.3 Ubikvitinace FOXO4

FOXO4 podléhá jak monoubikvitinaci, tak i polyubikvitinaci. Monoubikvitinace FOXO4 v odpovědi na oxidační stres je zprostředkována E3 ubikvitin ligasou MDM2 (z angl. murine double minute 2) a vede k jeho jaderné lokalizaci a zvýšení transkripční aktivity [65], zatímco polyubikvitinace je pravděpodobně zprostředkována Skp2 (z angl. S-phase kinase-associated protein 2) a vede k degradaci na proteasomu. Odstranění monoubikvitinace proteasou USP7 (z angl. ubiquitin specific protease 7), vede k relokizaci FOXO4 do cytoplasmy a inhibici jeho transkripční aktivity [52].

2.5.2.4 Glykosylace FOXO4

FOXO4 je v odpovědi na oxidační stres prostřednictvím asociace s glykosyltransferasou OGT (z angl. O-GlcNAc transferase) glykosylován připojením β -N-acetylglukosaminu na serin nebo threonin. Bylo ukázáno, že tato glykosylace vede ke zvýšení transkripční aktivity FOXO4, konkrétně ke zvýšení exprese p27 proteinu, inhibitoru cyklin dependentních kinas, a následnému zastavení buněčného cyklu a zvýšené odolnosti buněk vůči akutnímu oxidačnímu stresu [66]. Glykosylace proteinů může dále sloužit jako obecný ochranný mechanismus intracelulárních proteinů před oxidativním stresem [67].

2.5.3 Ostatní mechanismy regulace FOXO4

Transkripce FOXO3 a FOXO1 je zvýšena prostřednictvím E2F-1 transkripčního faktoru, a dále bylo ukázáno, že aktivace FOXO3 vede ke zvýšené koncentraci mRNA pro FOXO1 a FOXO4, což nasvědčuje o přítomnosti pozitivní zpětné vazby, která řídí expresi FOXO proteinů. Dále bylo ukázáno, že hladovění nebo kalorické restriktce vedou ke zvýšené hladině mRNA FOXO4 v kosterním svalstvu [52].

Exprese FOXO4 je posttranskripčně inhibována navázáním různých microRNA (též miRNA) na nepřekládanou oblast (tzv. 3'UTR; z angl. 3' - untranslated region) mRNA kódující FOXO4. Tento typ inhibice exprese FOXO4 je typický pro patologické stavy, např. u diabetické retinopatie (skrže miRNA-29a a miRNA-29b), u nádorů tlustého střeva (skrže miRNA-1274a), nebo u karcinomu nosohltanu (skrže miRNA-421), u nějž bylo zjištěno, že inhibice hladiny FOXO4 proteinu prostřednictvím miRNA-421 způsobují proliferaci nádorových buněk a jejich resistenci vůči apoptóze [52].

Na regulaci aktivity FOXO4 se dále podílí interakce s koaktivátory (např. β -catenin, p300) [68], [69] a korepresory (např. pin1, Ku70) [70], [71] a dalšími transkripčními faktory, včetně nepochybně nejznámějšího tumorového supresoru p53.

2.6 Transkripční faktor p53

Protein p53 je kódován genem TP53, který je u člověka lokalizován na chromosomu 17 [72], a své jméno dostal při jeho objevení v roce 1979 podle zdánlivé molekulové váhy 53 kDa získané metodou SDS-PAGE [73]. Přestože se jedná o nejznámější tumorový supresor, který je mutacemi inaktivovaný u ~50 % lidských sporadických^{††} nádorů, tak při počátcích jeho studia byl nejdříve chybně klasifikován jako onkogen v souladu s tehdejšími experimentálními nálezy a paradigmaty. Tři různé skupiny nezávisle publikovaly výsledky, které podporovaly závěr, že TP53 podporuje maligní transformaci buněk. Všechny skupiny totiž získaly cDNA TP53 genu z již transformovaných nádorových buněk, ve kterých TP53 obsahoval bodové mutace, namísto cDNA TP53 z normální funkční tkáně [75]. Nádorové buňky byly pro klonování cDNA vhodnými kandidáty, protože tehdejší účinnost klonovací

^{††} Většina nádorových onemocnění má v populaci náhodný – **sporadický výskyt**. K maligním transformacím dochází mutacemi pouze somatických buněk (x **hereditární výskyt**, u něhož dochází k přenosu mutovaného genu pohlavní buňkou jednoho z rodičů a mutace druhé alely nastane v somatické buňce) [74].

technologie byla nízká, takže bylo vyžadováno, aby buňky exprimovaly příslušný gen ve velkém množství, což v případě TP53 není pro netransformované buňky splněno, kdežto v nádorových buňkách se p53 hojně vyskytuje [76].

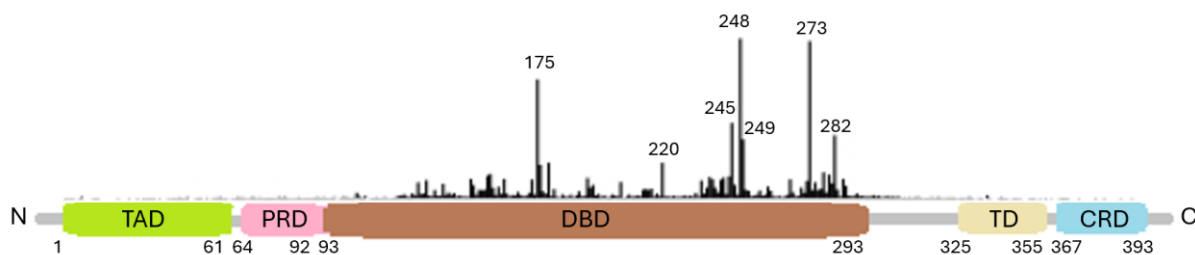
V roce 1989 pak jiní autoři naklonovali lidský TP53 gen nezávisle na předchozích skupinách a poskytli pečlivé a přesvědčivé důkazy o tumor supresivní funkci p53 [77]. Krátce potom byly porovnány DNA sekvence různých klonů TP53, a vzhledem k tomu, že žádné dva klony neměly identickou sekvenci, tak bylo zřejmé, že dřívější klony musely nést mutace, které inaktivují tumor supresivní funkci p53 [78].

2.6.1 Transkripční a cytoplasmatické aktivity p53

Jako transkripční faktor se p53 se podílí na regulaci více než 500 cílových genů, a tím řídí širokou škálu buněčných procesů, včetně metabolické adaptace, oprav DNA, zástavy buněčného cyklu, apoptózy a senescence [79], [80]. V cytoplasmě má p53 další funkce, nezávislé na jeho transkripční aktivitě. Za určitých podmínek indukuje apoptózu a inhibuje autofagii [81]. Aktivity p53 úzce souvisí s jeho multifunkční doménovou architekturou, která z p53 činí ústřední protein-proteinový interakční uzel v nespočtu signalizačních drah [15].

2.6.2 Doménová architektura p53

Protein p53 je homotetramerní transkripční faktor, přičemž každý protomer je tvořen řetězcem 393 aminokyselin o skutečné molekulové váze ~43,7 kDa [76]. Protein p53 je členěný do pěti domén (viz obr. 2.10): N-koncové transaktivační domény (TAD), domény bohaté na prolin (PRD, z angl. proline rich domain), DNA vazebné domény (DBD), tetramerizační domény (TD) a C-koncové regulační domény (CRD, z angl. C-terminal negative regulatory domain) [82], [83].



Obrázek 2.10: Doménová architektura p53. Protomerní jednotka p53 je tvořena řetězcem 393 aminokyselin a je členěna do šesti domén: TAD – transaktivační doména, PRD – doména bohatá na prolin, DBD – DNA vazebná doména, TD – tetramerizační doména, CRD – C-koncová regulační doména. Svislé sloupce znázorňují relativní četnost mutací jednotlivých aminokyselin. Aminokyseliny, které jsou nejčastěji mutovány jsou číselně označeny. Převzato a upraveno [83].

2.6.2.1 Transaktivační doména

Transaktivační doména (residua 1-61) je vnitřně neuspořádaná, avšak obsahuje dva kratší motivy TAD1 (residua 17-29) a TAD2 (residua 40-57), které mohou za určitých podmínek zaujmout konformaci α -helixu, např. při stabilizaci vazbou na MDM2. Tyto dva motivy mohou působit nezávisle nebo v kombinaci, aby umožnily vazbu s jinými proteiny, které regulují buď stabilitu p53 (např. MDM2) nebo transkripční aktivitu, např. vazba s koaktivátory p300 nebo HMG-1. Další úroveň regulace aktivity p53 spočívá v rozsáhlé fosforylaci TAD *in vivo* různými proteinkinasami, včetně ATM, CK-1, JNK a Chk1/2 [15]. Transaktivační doména byla rovněž identifikována jako klíčová pro interakci s FOXO4 [84]. Kromě interakcí s jinými proteiny interaguje TAD p53 také s vlastní DNA-vazebnou doménou prostřednictvím intramolekulárních interakcí [85].

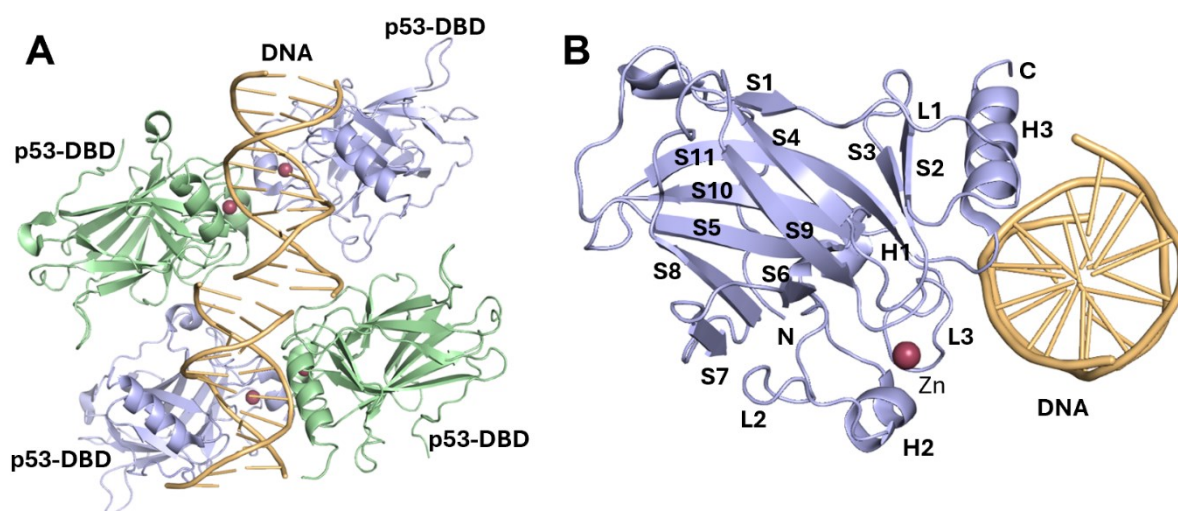
2.6.2.2 Doména bohatá na prolin

Doména bohatá na prolin (residua 64-92) propojuje N-koncovou transaktivační doménu p53 proteinu s jeho DNA-vazebnou doménou. U člověka PRD obsahuje pětkrát opakující se sekvenci PXXP (kde P=prolin a X=libovolná aminokyselina). Dohromady tvoří strukturní motiv s tendencí vytvářet tuhou levotočivou polyprolinovou šroubovici, která udržuje TAD p53 odděleně od jeho DBD [86]. V rámci domény bohaté na prolin je známá pouze jediná posttranslační modifikace, a to fosforylace T81 proteinkinasou JNK za stresových podmínek, která vede ke stabilizaci a aktivaci p53 [87].

2.6.2.3 DNA-vazebná doména

DNA-vazebná doména (residua 93-293) se nachází mezi N- a C- koncovými nestrukturovanými oblastmi a je zodpovědná za rozpoznání specifických elementů DNA

cílových genů. Ty vykazují určitou mírou variability, obecně se však jedná o dvě dekamerní sekvence 5′–PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy–3′, kde Pu = purinová báze a Py = pyrimidinová báze, které jsou odděleny sekvencí o délce 0–13 nukleotidů [83]. DNA-vazebnou doménu tvoří tři α -helixy (H1–H3), tři smyčky (L1–L3) a jedenáct antiparalelních β -řetězců (S1–S11), které tvoří dva na sebe přeložené β -listy s hydrofobní vnitřní stranou (viz obr. 2.11). Klíčovou roli ve správném skládání p53-DBD hraje kovový iont zinku (Zn^{2+}), který je koordinovaný čtyřmi aminokyselinovými zbytky (C176, H179, C238 a C242) a stabilizuje zejména smyčky L2 a L3 [88].



Obrázek 2.11: DNA-vazebná doména proteinu p53. Na obrázku je ukázána krystalová struktura p53-DBD v komplexu s DNA (PDB: [2AHI](#)) [88]. (A) Dimer p53 rozpoznává specifickou dekamerní sekvenci DNA (tzv. half-site) zatímco biologicky aktivní p53 se váže na DNA (tzv. full-site) v tetramerní formě. (B) Detail struktury protomerní jednotky p53-DBD v komplexu s DNA. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.2.4.1, Schrödinger, LLC.

DNA vazebná doména také zprostředkovává protein-proteinové interakce, např. s proapoptickým faktorem BAX a protiapoptickým faktorem BCL-xL, takže může docházet ke kompetici s vazbou DNA v jádře [89]. Až 90 % tzv. „missense“^{‡‡} mutací identifikovaných v lidských nádorech cílí právě na DNA-vazebnou doménu, což podtrhuje důležitost DBD v tumor supresivních aktivitách p53 [91].

^{‡‡} Missense mutace je projev bodové mutace, u níž dochází k zařazení chybné aminokyseliny, což může mít za následek vznik defektního proteinu [90].

2.6.2.4 Tetramerizační a C-koncová regulační doména

Tetramerizační doména (residua 325-355) zprostředkovává oligomerizaci p53, která je pro jeho transkripční aktivitu klíčová. Tetramerizace p53 zvyšuje skrze aviditu sílu jednotlivých vazebných interakcí s DNA, a tak výrazně zlepšuje schopnost vázat DNA ve srovnání s protomerní formou [15].

C-koncová regulační doména (residua 356-393) je převážně neuspořádaná a reguluje schopnost p53 vázat DNA a interakce s dalšími proteiny. Zároveň jsou zde obsaženy nukleární lokalizační a exportní sekvence. CRD podléhá rozsáhlým posttranslačním modifikacím, které ovlivňují DNA-vazebnou afinitu, buněčnou lokalizaci, stabilitu a interakce s dalšími proteiny [92].

CRD se někdy označuje jako druhá DNA-vazebná doména p53 proteinu. Na rozdíl od p53-DBD však CRD není sekvenčně specifická, tvoří však stabilní komplexy s DNA včetně jednořetězcové DNA, „mismatched“ DNA (tj. dvouřetězcová DNA se špatně zařazeným nukleotidem porušujícím komplementaritu bází) nebo DNA s dvojnými zlomy (tzv. DSB, z angl. double strand breaks) [82].

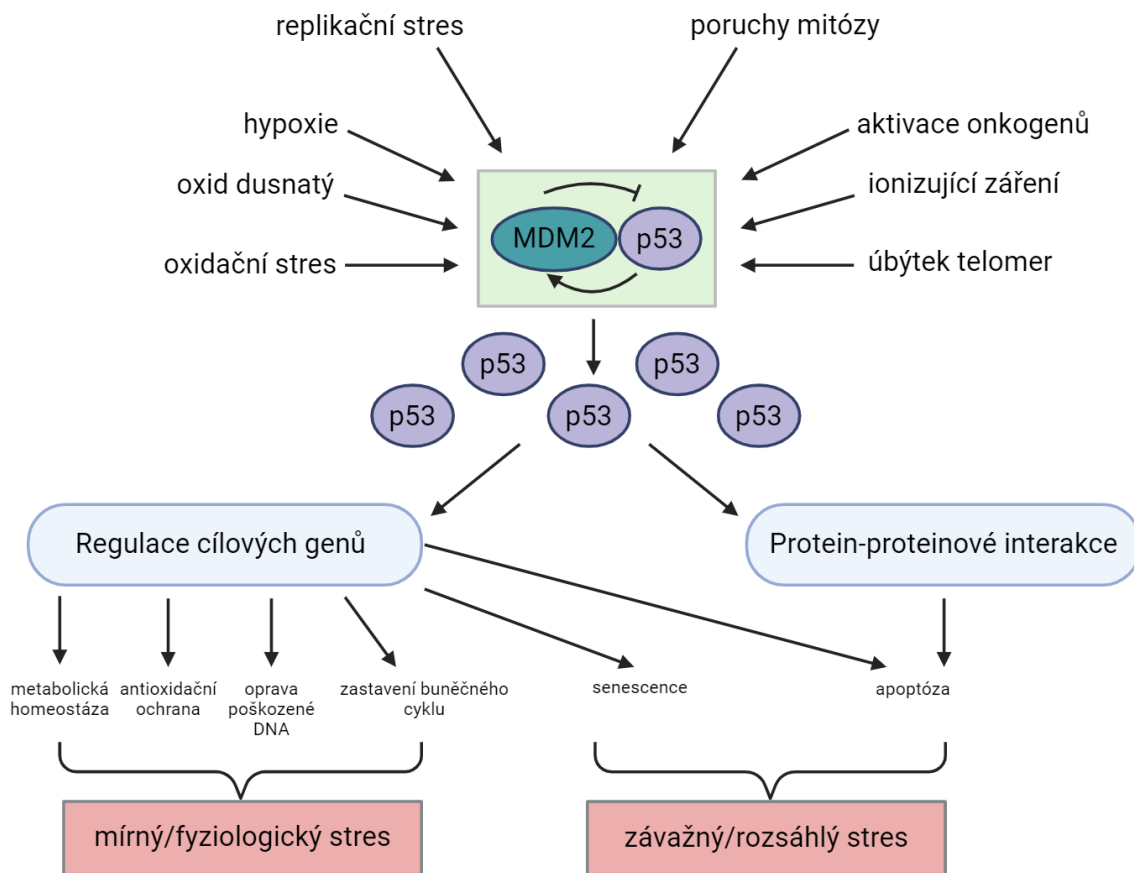
2.6.3 Regulace p53 prostřednictvím MDM2 a proteinového obratu

MDM2 (z angl. mouse double minute 2 homolog) známý též jako HDM2 (z angl. human double minute 2) je klíčový negativní regulátor aktivity p53. Patří do rodiny E3 ubikvitin ligas a inhibuje aktivitu p53 dvěma způsoby: 1) vazbou na transaktivační doménu stericky blokuje funkci této domény a transkripční aktivitu a 2) zprostředkovává polyubikvitinaci p53 na několika residuech v tetramerizační a C-koncové regulační doméně a jeho následnou degradaci v proteasomu [93].

Za nestresových podmínek je tímto mechanismem kontinuálně udržována nízká bazální hladina p53 (poločas p53 je ~5–20 min). Za stresových podmínek, zejména takových, které ohrožují buněčný genom, dochází k rychlé aktivaci p53 a vzrůstu jeho koncentrace v buňce (viz obr. 2.12). Aktivace p53 v odpovědi na různé stimuly probíhá prostřednictvím posttranslačních modifikací, nejčastěji v rámci transaktivační domény, které vytěsňují MDM2 z p53, a tak zabraňují jeho polyubikvitinaci a následné degradaci v proteasomu [94].

MDM2 je navíc pod transkripční kontrolou p53, takže mezi p53 a MDM2 existuje negativní zpětná vazba, při níž p53 indukuje expresi MDM2, který následně podporuje jeho degradaci a tlumí jeho aktivity. Již bylo zmíněno, že p53 je mutacemi inaktivován v asi

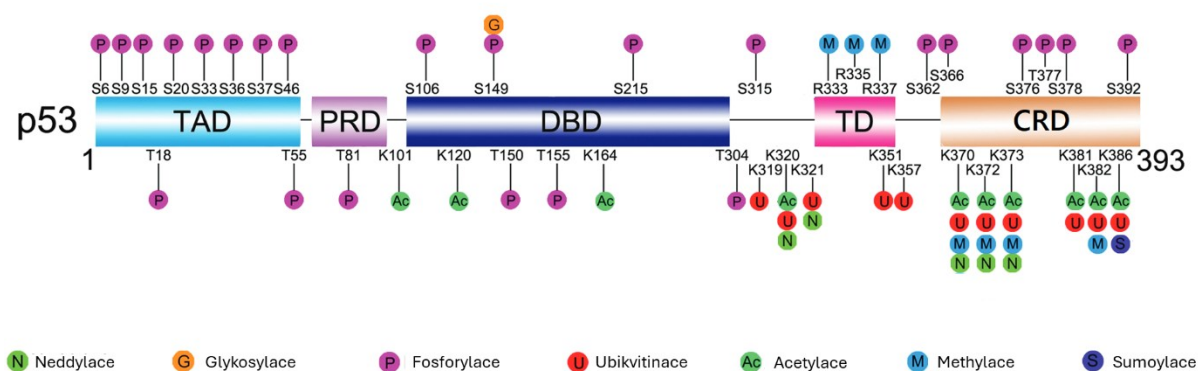
polovině všech lidských rakovin. Uvádí se, že u velkého podílu zbylých rakovin, kde není přímo inaktivován p53, je amplifikován MDM2 nebo MDMX (tj. homolog MDM2, který reguluje p53 na stejném principu jako MDM2, ale není pod přímou transkripční kontrolou p53), což podtrhuje důležitost MDM2/MDMX v rámci regulace p53 *in vivo* [75], [95].



Obrázek 2.12: Zjednodušené schéma aktivace p53 proteinu v odpovědi na různé stresory. Za normálních podmínek MDM2 udržuje nízkou ustálenou hladinu p53. Za stresových podmínek je inhibice p53 prostřednictvím MDM2 přerušena, p53 je aktivován a jeho koncentrace roste. Aktivity p53 pak spočívají zejména ve spuštění vhodných transkripčních programů s cílem vypořádat se s příčinou stresu (např. přechodné zastavení růstu a opravení poškozené DNA) anebo vedou k extrémnější, často nevratné buněčné odpovědi – tj. apoptóze nebo senescenci. Aktivovaný p53 může taky vyvolat buněčnou odpověď prostřednictvím protein-proteinových interakcí (např. interakcí s proapoptickými faktory BAX, PUMA nebo NOXA spouští mitochondriální dráhu apoptózy). Převzato a upraveno [76]. Vytvořeno pomocí Biorender.com

2.6.4 Regulace p53 prostřednictvím posttranslačních modifikací

Za stresových podmínek p53 podstupuje několik posttranslačních modifikací, které napomáhají jeho aktivaci a ovlivňují expresi různých cílových genů. Většina míst posttranslačních modifikací se nachází v N- a C-koncových neuspořádaných oblastech, zatímco v DNA-vazebné doméně se jich vyskytuje málo (viz obr. 2.13). Nejčastějšími posttranslačními modifikacemi p53 jsou fosforylace, acetylace, ubikvitinace a methylace, ale vyskytují se dále i glykosylace, sumoylace a neddylace. Posttranslační modifikace ovlivňují, ať už nezávisle nebo v kombinaci, stabilitu, konformaci, lokalizaci a vazebné partnery p53 [87].



Obrázek 2.13: Přehled posttranslačních modifikací p53. Vybrané posttranslační modifikace v rámci doménové architektury p53. Aminokyselinové zbytky, které podstupují modifikace jsou číselně označeny. Převzato a upraveno [87].

2.6.4.1 Fosforylace p53

Fosforylační místa se nacházejí napříč celým proteinem, se zřejmým obohacením v N-koncové transaktivační doméně. Většina těchto N-koncových fosforylačních míst je modifikována v odpovědi na buněčný stres, který iniciuje aktivaci p53. S15 může být fosforylován proteinkinasou ATM (z angl. *ataxia-telangiectasia mutated kinase*), ale i jinými kinasami, zatímco S20 může být fosforylován proteinkinasami Chk1/2 (z angl. *checkpoint-kinase 1/2*) [87]. Jedná se o specializované DNA-dependentní serin/threoninové proteinkinasy, které jsou evolučně konzervovány a signalizují poškození DNA. Fosforylace na těchto místech chrání p53 před jeho hlavním negativním regulátorem MDM2, čímž zlepšují jeho stabilitu a funkci [96]. S20 může být však fosforylován i proteinkinasou JNK, nezávisle na poškození DNA [97]. Residua T55, S376 a S378 jsou konstitutivně fosforylovány ve stresem nezátížených buňkách. Fosforylovaný T55 přispívá degradaci p53 prostřednictvím

proteasomu, zatímco defosforylace tohoto místa protein fosfatasou 2A (PP2A) v reakci na poškození DNA stabilizuje p53 a podporuje zastavení buněčného cyklu. Defosforylace S376 v odpovědi na stres způsobeným ionizujícím zářením vytváří vazebné místo pro 14-3-3, jehož vazba vede ke zvýšení afinity p53 k DNA. Fosforylace S48 je korelována s upřednostněním apoptózy [87]. Za další rozsáhlé fosforylace jsou zodpovědné proteinkinasy CK1 a CK2 (z angl. *casein kinase 1/2*), které za stresových podmínek fosforylují p53 na residuích S6, S9, T18, S313, S314, S366, T377 a T387 [98].

2.6.4.2 Acetylce p53

Koaktivátory CBP a p300 hrají zásadní roli v regulaci transkripce genů různými mechanismy, mezi něž patří i acetylce histonů, která přetváří konformaci chromatinu. CBP/p300 rovněž acetyluje p53 na několika C-terminálních lysinech (K370, K372, K373, K381, K382 a K386). C-terminální acetylce zvyšují sekvenčně specifickou DNA-vazebnou afinitu, a tak napomáhají transkripci genů vedoucích k zastavení buněčného cyklu, senescenci nebo apoptóze. Všech šest těchto lysinů může být také ubikvitinováno. Acetylce na těchto místech může tak zároveň zabránit polyubikvitinaci p53, a tím zvýšit jeho stabilitu. Deacetylce zajišťují enzymy HDAC a nebo SIRT1, přičemž bylo zjištěno, že deacetylce K382 inhibuje p53 zprostředkovanou aktivaci proapoptických faktorů BAX a PUMA, které sehrávají klíčovou roli v apoptóze [87].

2.6.4.3 Ubikvitinace p53

Proteiny jsou ubikvitinovány v sledu enzymatických reakcí katalyzovaných enzymy známými jako E1 (ubikvitin-aktivující enzym), E2 (ubikvitin-konjugující enzym) a E3 (ubikvitin ligasy). Konečným výsledkem je přidání malého proteinu ubikvitinu (76 aminokyselin, ~8,5 kDa), který značí protein pro rozpoznání a následnou degradaci proteasomem 26S. Kromě již zmíněné polyubikvitinace p53, která má za následek jeho degradaci v proteasomu, může být p53 za určitých podmínek také monoubikvitinován. Nízké hladiny MDM2 indukují monoubikvitinaci a translokaci p53 do cytoplasmy. p53 může v cytoplasmě vykonávat své transkripčně nezávislé aktivity (indukovat apoptózu nebo inhibovat autofagii), takže akumulace cytoplasmického p53 následkem monoubikvitinace může tyto aktivity ovlivnit [87].

2.6.4.4 Methylace p53

Methylace p53 je známá na dohromady sedmi residuích (lysiny nebo argininy) v rámci tetramerizační a C-koncové regulační domény. V reakci na poškození DNA jsou methylovány R333, R335 a R337, přičemž bylo ukázáno, že tyto modifikace ovlivňují transkripční specifitu cílových genů. Methylace K372 stabilizuje a zadržuje p53 v jádře, zatímco methylace K382 oslabuje transkripci p53 cílových genů [87].

2.7 Role p53 v senescenci

V případě přetrvávajícího poškození DNA nebo jiných stresorů sehrává p53 roli na pomezí mezi apoptózou a senescencí [76]. Senescenci může p53 aktivovat prostřednictvím DDR signalizační dráhy (tj. při poškození DNA, z angl. DNA damage response) nebo nezávisle na ni. Poškození DNA, včetně úbytku telomer, aktivuje proteinkinasy ATM a ATR, které přímo fosforylují Chk1 a Chk2 proteinkinasy, které dále fosforylují p53 a MDM2. To vede k aktivaci p53 a inhibici jeho degradace prostřednictvím MDM2 proteasomální dráhy, a tím udržení vyšší hladiny p53 ve stresovaných buňkách [99]. Aktivovaný p53 zvyšuje expresi p21 proteinu, přičemž p21 inhibuje cyklin dependentní kinasy 4 a 6, což vede k akumulaci aktivního hypofosforylovaného pRb a následné aktivaci E2F transkripčních faktorů, čímž dochází ke stabilnímu zastavení buněčného cyklu v G₁, ale také G₂ fázi buněčného cyklu a indukci senescence [15], [99].

2.8 Role FOXO4 v senescenci

Buněčná senescence může být navozena intenzivní onkogenní signalizací (OIS, z angl. oncogene-induced senescence), a sloužit tak k potlačení nádorového bujení tím, že zabraňuje jejich růstu. Vzhledem k tumor supresivní roli FOXO proteinů bylo přirozeným zájmem vědecké komunity prozkoumat roli FOXO proteinů v OIS. FOXO4 skutečně sehrává důležitou roli v indukci senescence vyvolané BRAF^{V600} onkogenní signalizací. Onkogen BRAF^{V600E} je exprimován v řadě nádorů, především v melanomech. Aktivace BRAF^{V600E} vede ke zvýšené buněčné proliferaci a progresi buněčného cyklu, ale nakonec také k OIS. BRAF^{V600E} fosforyluje a aktivuje proteinkinasy JNK prostřednictvím MEK-JNK signální dráhy. Aktivovaná JNK následně fosforyluje FOXO4, čímž dochází k jeho aktivaci a translokaci do jádra a následné zvýšené expresi proteinu p21, zodpovědného za indukci buněčné senescence [15].

2.9 Vzájemná souhra FOXO4 a p53 v senescenci

První důkaz o interakci mezi p53 a FOXO byl získán v roce 2004, kdy bylo ukázáno, že komplex FOXO3:p53 způsobuje hladověním vyvolanou aktivaci deacetylasy SIRT1 [100]. V návaznosti na to se jiná skupina zabývala charakterizací vazebného rozhraní tohoto komplexu, přičemž bylo zjištěno, že DNA vazebná doména p53 slabě interaguje jak s DNA vazebnou doménou, tak s C-terminální transaktivační doménou FOXO3 [101]. Z dřívější studie bylo přitom prokázáno, že FOXO3 stabilizuje p53 a podporuje p53-zprostředkovanou apoptózu. Naproti tomu pro komplex FOXO4:p53 bylo zjištěno, že jejich společná interakce vede k indukci senescence zprostředkovanou expresí proteinu p21 a k potlačení apoptózy. Stejná skupina dále pozorovala zvýšenou expresi FOXO4 v senescentních buňkách (u buněčné linie lidských fibroblastů IMR90), zatímco pro FOXO1 a FOXO3 nedocházelo k žádné významné změně genové exprese [102].

Nicméně, existuje řada dalších důkazů podporující protichůdné role FOXO1/3 a FOXO4 v rámci senescence. Inaktivace AKT signalizační dráhy, vedoucí k aktivaci FOXO1 a 3 u myších embryonálních fibroblastů (MEFs, z angl. mouse embryonic fibroblasts) zvyšuje odolnost vůči senescenci a je spojena se zvýšenou hladinou intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species). Inaktivace FOXO1 nebo FOXO3 obnovuje předčasnou senescenci u MEFs s deficitní AKT kinasou [103]. Ačkoli specifická role FOXO4 v této modelové studii senescence nebyla prozkoumána, je lákavé spekulovat, že se zvýšená hladina ROS v důsledku inaktivace FOXO1 a FOXO3 podílí na specifické aktivaci FOXO4 zprostředkované JNK a indukci senescence. Aktivace FOXO4 zprostředkovaná proteinkinasou JNK v odpovědi na oxidační stres a inaktivace FOXO proteinů zprostředkovaná proteinkinasou AKT by mohly vést k rozdílným stavům aktivace FOXO4 oproti FOXO1 a 3, což by vysvětlovalo antagonistickou roli FOXO proteinů v procesu senescence [15].

V roce 2017 byla publikována přelomová studie, která ukázala přínos rozrušení interakce FOXO4:p53 pro selektivní a efektivní odstranění senescentních buněk, což vedlo k obnovení tkáňové homeostázy a výrazně zlepšené kondici a renální funkci stárnoucích myší. Mechanisticky dochází rozrušením komplexu FOXO4:p53 ke snížené expresi proteinu p21, translokaci p53 do cytosolu a k p53 zprostředkované apoptóze. Tato studie tak jasně demonstrovala klíčový význam interakce FOXO4:p53 pro udržování buněčné senescence a naznačila, že tuto interakci lze považovat za potenciální terapeutický cíl pro léčbu onemocnění spojených s procesem stárnutí [102].

3 Cíle práce

1. Exprese a purifikace proteinů FOXO4 a p53.
2. Fosforylace FOXO4 proteinu *in vitro* pomocí proteinkinasy AKT.
3. Ověření fosforylace FOXO4 pomocí ESI-MS a nativní elektroforézy.
4. Charakterizace vlivu fosforylace FOXO4 na stabilitu komplexu FOXO4:p53 pomocí metody sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace (SV AUC).
5. Charakterizace vlivu interakce proteinů 14-3-3 s fosforylovaným FOXO4 na vznik komplexu FOXO4:p53 pomocí metody sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace (SV AUC).

4 Materiál

4.1 Použité chemikálie a biologický materiál

1,4-dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
2-merkptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
adenosine 5'-triphosphate (ATP)	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
akrylamid	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
ampicilin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
azid sodný	PENTA (Česká republika)
bis-akrylamid	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
bromfenolová modř	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
citrát sodný	PENTA (Česká republika)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného	PENTA (Česká republika)
dihydrogenfosforečnan draselný	PENTA (Česká republika)
DNase	ZellBio GmbH, Germany
dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
<i>Escherichia coli</i> kmen BL21(DE3)	Stratagene (USA)
ethanol	PENTA (Česká republika)
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
glutathion	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
glycerol	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
glycin	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
guanidin hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
heptahydrát síranu zinečnatého	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
hexahydrát síranu nikelnatého	PENTA (Česká republika)
hydroxid sodný	PENTA (Česká republika)
chlorid draselný	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
chlorid sodný	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
imidazol	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
isopropanol	LACHNER a.s. (Česká republika)
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	EMD Biosciences, Inc. (Německo)
kalibrační pufrý (pH = 4,01; 7,01; 10,00)	Hanna Instruments (Česká republika)

kanamycin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
kvasinkový extrakt	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
kyselina boritá	PENTA (Česká republika)
kyselina citrónová	LACHNER a.s. (Česká republika)
kyselina chlorovodíková	PENTA (Česká republika)
LB médium	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
protein kinasa B	Upstate Biotechnology (USA)
peroxidisíran amonný	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
redukovaný glutathion	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
ROTI [®] Mark TRICOLOR proteinový marker	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
SIGMAFAST [™] koktejl inhibitorů proteas	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
tetrahydrát octanu hořečnatého	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
TEV proteasa (z angl. <u>T</u> obacco <u>e</u> tch <u>v</u> irus)	Připravena v naší laboratoři
Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
trypton	Sigma-Aldrich Corporation (USA)

4.2 Použité přístroje

analytická ultracentrifuga ProteomLab [™] XL-I	Beckman Coulter (USA)
analytické váhy ABS 120-4	KERN & SOHN (Německo)
BTD Dry Block Heater	Grant Instruments (Spojené království)
centrifuga 5804R (rotor A-4-44)	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga Hermle Z323K	Hermle Labortechnik GmbH (Německo)
centrifuga MiniSpin PL-109	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga Sigma 8K	Sigma Laborzentrifugen (Německo)
elektrický vaříč	SENCOR (Česká republika)
FPLC systém ÄKTAprime	GE Healthcare, USA
orbitální inkubátor NB-205	N-BIOTEK, Inc. (Korejská republika)
peristaltická pumpa	IDEX Health & Science (Švýcarsko)

pH metr Orion Star™ A111	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
předvážky KERN EW-NM	KERN & SOHN (Německo)
Q700 Sonikátor se sondou #4220	Qsonica, Llc (USA)
spektrofotometr IMPLEN P300	Biotech (USA)
spektrofotometr NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
stroj na výrobu ledu	Brema Ice Makers (Itálie)
vortex ZX3	VELP Scientifica (Itálie)
vodní lázeň s termostatem	Grant Instruments (Spojené království)
Grant SUB Aqua Pro	
zdroj pro elektroforézu CONSORT	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)

4.3 Ostatní pomůcky

automatické pipety	Eppendorf AG (Německo)
dialyzační membrány Spectra/Por (MWCO 6000-8000 a 14 000 Da)	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
GST Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare (USA)
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare (USA)
injekční stříkačky	B. Braun Melsungen AG (Německo)
kolona Econo-Pac®	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
kolona HiLoad 26/600 Superdex™ 75 pg	GE Healthcare (USA)
kolona HiLoad 26/600 Superdex™ 200 pg	GE Healthcare (USA)
kolona HiTrap Heparin HP 5ml	GE Healthcare (USA)
kolona HiTrap SP	GE Healthcare (USA)
kolona MonoQ™ 5/50 GL	GE Healthcare (USA)
kolona Superdex™ 75 Increase 10/300 GL	GE Healthcare (USA)
koncentrátory VIVASPIN TURBO (MWCO 5000, 10000 a 30000 Da)	Satorius Lab Instruments GmbH & Co. Kg (Německo)
křemenné kyvety	Agilent Technologies, Inc. (USA)
kyvety pro analytickou centrifugaci	Nanolytics Instruments GmbH (Německo)
kyvety pro analytickou centrifugaci	Beckman Coulter (USA)
Mini-PROTEAN® elektroforetický systém	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
svorky na dialyzační membrány	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
Whatman™ filtry o velikosti pórů 0,45 µm	GE Healthcare (USA)
Whatman SPARTAN™ stříkačkové filtry	GE Healthcare (USA)

5 Metody

5.1 Příprava rekombinantních proteinů

V této sekci jsou uvedeny detailní expresní a purifikační protokoly lidských proteinů FOXO4 a p53. Protein FOXO4 byl připraven jako zkrácený konstrukt o residuích 15-217, zatímco protein p53 byl připraven jednak o plné délce 393 aminokyselin, a také jako zkrácený konstrukt (residua 1-312). p53(1-393) je tetramerní, zatímco zkrácený konstrukt p53(1-312) je monomerní, protože mu chybí C-koncová tetramerizační doména, která zprostředkovává oligomerizaci. Lidský protein 14-3-3 ζ o plné délce 245 aminokyselin je rutinně připravován v naší laboratoři a pro potřeby SV AUC experimentů v této práci byl připraven Bc. Gabrielou Kočárovou (FGÚ AV ČR). Všechny proteiny byly exprimovány v bakteriálním expresním systému *E. Coli*, kmen BL21(DE3).

5.1.1 Exprese a purifikace FOXO4(15-217)

Gen pro lidský FOXO4 protein byl vnesen do plasmidu pGEX-4T-1 a exprimován jako fúzní protein s glutathion-S-transferasovou afinitní kotvou na N-konci. Bakteriální buňky transformované expresním vektorem pGEX-4T-1 jsou rezistentní vůči antibiotiku ampicilinu. Exprese proteinu je pod kontrolou *lac* operátoru a je indukována isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG), strukturním analogem allolaktózy.

Založení bakteriálních kultur: Do 6 skleněných zkumavek s kovovými víčky obsahujících 5 ml LB média (složení viz tab. 10.1) bylo za sterilních podmínek (tzn. v biologickém bezpečnostním boxu) napipetováno 5 μ l ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Do každé zkumavky bylo přidáno 5 μ l buněčné kultury uchované v glycerolu (zásobní roztok glycerol:buněčná kultura byl připraven v objemovém poměru 3:7). Takto založené bakteriální kultury byly ponechány inkubovat přes noc (po dobu 13–16 h) při teplotě 37 °C ve stolním orbitálním inkubátoru při 180 ot./min.

Růst bakteriální kultury a exprese proteinu: Následně byly buněčné kultury za sterilních podmínek sjednoceny v 50 ml kónické zkumavce a roztok kultury byl rovnoměrně rozdělen do šesti rozehrátých 2l Erlenmeyerových baněk obsahujících 900 ml sterilního LB média

a ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Buněčná kultura byla opět inkubována při teplotě 37 °C v orbitálním inkubátoru při 190 ot./min. Průběh růstu bakteriální kultury byl sledován měřením optické hustoty jejího roztoku při vlnové délce 600 nm, přitom nulová optická hustota byla kalibrována na čisté LB médium. Při $\text{OD}_{600} = 0,4 \text{ cm}^{-1}$ (obvykle po ~3 hodinách inkubace) byla teplota snížena na 20 °C a další růst probíhal za klesající teploty. Při $\text{OD}_{600} = 0,8$ a inkubátoru vychlazeném na ~20 °C byla indukována exprese proteinu použitím 900 μl 0,5 mol dm^{-3} roztoku IPTG. Po 18 hodinách exprese byly buněčné kultury sedimentovány při 2073 \times g v centrifuze vytemperované na 4 °C. Sedimenty buněk byly resuspendovány v dohromady 120 ml lyzačního pufru, složení viz tab. 10.2 (na sediment buněk z 900ml buněčné kultury bylo použito ~20 ml lyzačního pufru). Resuspendovaný roztok buněk byl zamražen při –80 °C.

Lyze buněk: Lyze buněk byla docílena působením lysozymu v kombinaci se sonikací. Zamražené buňky resuspendované v lyzačním pufru byly ponechány rozmraznout při pokojové teplotě. Roztok buněk byl převeden do silnostěnné kádinky PYREX a byl k němu přidán lysozym o výsledné koncentraci 0,1 mg/ml a tableta SIGMAFAST™ (rozpuštěná v 1 ml dH_2O), která obsahuje koncentrovaný koktejl inhibitorů různých proteas. Po 30 minutové inkubaci s lysozymem za stálého míchání při 4 °C byl roztok ponořen do ledové lázně a sonikován při výkonu 55 wattů za opakování třísekundových ultrazvukových pulsů následovaných sedmnáctisekundovou pauzou. Celkový čas trvání pulsu byl 15 minut. Po sonikaci byl buněčný lyzát centrifugován při 20 000 \times g po dobu 45 minut v centrifuze vytemperované na 4 °C. Následně byl supernatant, obsahující rozpustné buněčné komponenty včetně exprimovaného proteinu, dekantován od pelety, tvořené nerozpustnými buněčnými komponenty, a posléze použit k izolaci žádoucího proteinu sérií chromatografických metod.

GST-afinitní chromatografie: GST-afinitní chromatografie je purifikační technika, která využívá vysoké afinity mezi fúzními proteiny obsahujícími glutathion S-transferasu (GST) a tripeptidem glutathionem, který je imobilizován na agarosové náplni kolony a je přirozeným substrátem GST. Při průchodu buněčného lyzátu se proteiny obsahující GST naváží na glutathion, zatímco ostatní proteiny se odplaví. Navázané proteiny se poté eluují pufrem obsahujícím nadbytek redukovaného glutathionu, který soutěží o vazbu s imobilizovaným glutathionem a uvolňuje cílový protein z náplně kolony.

Na buněčný lyzát ze 6 litrů buněčné kultury byla použita 20ml kolona naplněná 4 ml Glutathion Sepharosy® 4 Fast Flow. Buněčný lyzát byl nejdříve 1 hodinu při 4 °C inkubován za stálého míchání se stacionární fází kolony. Kolona byla ponořena do ledové lázně a

následovala absorpce stacionární fáze na kolonu připojením k peristaltické pumpě za průtoku lyzátu 2 ml/min, a poté promytí 300 ml pufru pro GST-afinitní chromatografii (viz tab. 10.4) za průtoku 4 ml/min. Následně byla peristaltická pumpa odpojena a fúzní protein byl eluován 30 ml 10 mmol dm⁻³ glutathionu v pufru pro GST-afinitní chromatografii. Eluovaný protein byl sbírán po 10 ml frakcích do zkumavek inkubovaných na ledu. Přítomnost žádoucího proteinu v eluátu byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE.

Dialýza a štěpení fúzního proteinu TEV proteasou: Dialýza je běžně používanou technikou pro výměnu pufru v roztocích proteinů. Je založena na principu difuze, kdy se molekuly přesouvají z oblasti s vyšší koncentrací do oblasti s nižší koncentrací přes polopropustnou membránu. Tato membrána umožňuje průchod pouze malým molekulám, jako jsou soli a jiné složky pufru, zatímco větší molekuly, jako jsou proteiny, jsou zadržovány uvnitř dialyzačního vaku. Časem koncentrace nízkomolekulárních látek na obou stranách membrány dosáhne rovnováhy.

Po GST-afinitní chromatografii byly sjednocené frakce eluovaného proteinu dialyzovány proti pufru o složení viz tab. 10.5. Tím byl jednak odstraněn přebytečný glutathion a současně se zajistily optimální podmínky pro štěpení fúzního proteinu TEV proteasou. TEV proteasa (z angl. tobacco etch virus protease) rozpoznává sekvenci ENLYFQS a štěpí ji mezi glutaminem a serinem. GST fúzní značka sloužila pro purifikaci afinitní chromatografií, avšak pro další purifikační kroky je už nepotřebná a pro provádění následných experimentů nežádoucí, a proto byla v tomto kroku proteolyticky odštěpena. Ke štěpení fúzního proteinu bylo použito 200 U TEV proteasy na 1 mg rekombinantního proteinu. Výtěžek rekombinantního proteinu byl stanoven měřením absorbance ze vztahů 5.1 a 5.2 na str. 45. Kvantitativní průběh štěpení fúzního proteinu byl ověřen 15% SDS-PAGE.

Kationtově výměnná chromatografie: U iontově výměnné chromatografie má stacionární fáze (pevný nosič) na svém povrchu nabitě funkční skupiny, které fungují jako iontoměniče. Složky vzorku, které nesou opačný náboj než tyto funkční skupiny, se vážou na povrch stacionární fáze pomocí elektrostatických interakcí. Síla těchto interakcí závisí na iontové síle a pH mobilní fáze. Pokud má roztok proteinu pH nižší než je jeho izoelektrický bod (pI), protein nese kladný náboj a váže se na záporně nabitě funkční skupiny nosiče (katex). Eluce vázaného proteinu může být dosažena změnou pH mobilní fáze (tzn. změnou náboje proteinu) nebo gradientem soli, tzn. postupným zvyšováním iontové síly mobilní fáze a odpovídajícímu snižování síly elektrostatické interakce proteinu s iontoměničem.

Po štěpení fúzního proteinu TEV proteasou byl dialyzační pufr vyměněn za čerstvý pufr o jiném složení (viz tab. 10.6). Druhá dialýza sloužila k výměně pufru před kationtově výměnnou chromatografií, která musí probíhat v pufru o nízké iontové síle a vhodném pH, tak aby došlo k navázání purifikovaného proteinu na stacionární fázi kolony. Pro kationtově výměnnou chromatografii byla použita kolona HiTrap SP^{§§}, která byla připojena k FPLC systému ÄKTAprime. Před zavedením vzorku na kolonu byl celý obvod přístroje a kolona ekvilibrována na pufr E pro kationtově výměnnou chromatografii (složení viz tab. 10.7). Roztok proteinu byl postupně nanášen na kolonu za průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Eluce navázaného proteinu byla docílena lineárním gradientem pufru F (složení viz tab. 10.7) s rostoucí koncentrací soli.

Gelová permeační chromatografie: Gelová permeační chromatografie je technika, která umožňuje separaci proteinů na základě jejich velikosti. Je založena na rozdílném pronikání analytů do porézního separačního materiálu, zesít'ovaného polymerního gelu, např. dextranu, který má trojrozměrnou strukturu s póry o určité velikosti. Mobilní fázi tvoří roztok obklopující částice gelu, zatímco stacionární fázi tvoří samotný polymerní gel. Větší molekuly, které nemohou proniknout do pórů, obtékají částice gelu a rychleji se eluují. Naopak menší molekuly pronikají do pórů, jsou déle zadržovány v gelu, a proto se eluují později. Látky s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou anorganické soli, se v gelu zadržují nejvíce a eluují se jako poslední.

Sesbírané frakce po kationtově výměnné chromatografii byly sjednoceny v centrifugační zkumavce s membránou propustnou pro molekuly menší než 10 kDa a zkoncentrovány ultrafiltrací v centrifuze při 4 °C a 1361×g na konečný objem menší než 2 ml. Pro gelovou permeační chromatografii byla použita kolona HiLoad 26/600 SuperdexTM 75 pg, která byla připojena k FPLC systému ÄKTAprime. Před zavedením vzorku na kolonu byl celý obvod přístroje a kolona ekvilibrována na pufr pro gelovou permeační chromatografii (složení viz tab. 10.8). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 1,5 ml/min. Eluovaný protein byl sbírán po 1,5ml frakcích do mikrozkuvek inkubovaných na ledu. Po ověření dostačující čistoty proteinu v sbíraných frakcích pomocí 15% SDS-PAGE, byly frakce sjednoceny a z Lambertova-Beerova zákona byla stanovena koncentrace izolovaného proteinu měřením

§§ Kolona HiTrap SP je naplněna stacionární fází sefárovou a na svém povrchu nese záporně nabitě sulfopropylové skupiny.

absorbance při 280 nm. Purifikovaný protein byl zkoncentrován na konečnou koncentraci ~1 mg/ml, rozdělen do 1ml alikvót a následně zamražen a skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Měření proteinové koncentrace a určení výtěžku purifikace: Proteinová koncentrace byla stanovena měřením absorbance při vlnové délce 280 nm, kde absorbují aromatické kyseliny tyrosin a tryptofan, podle vztahu:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \cdot l} \quad (5.1)$$

kde c je koncentrace proteinu v mol dm^{-3} , A_{280} je absorbance při 280 nm, l je délka optické dráhy v cm a ϵ_{280} je molární absorpční koeficient při 280 nm v $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Ze zjištěné koncentrace byl vypočten výtěžek purifikace dle vztahu:

$$m = V \cdot c \cdot M \quad (5.2)$$

kde m je hmotnost proteinu v g, c je jeho koncentrace v mol dm^{-3} , V jeho objem v dm^3 a M je molární hmotnost v g mol^{-1} . Molární hmotnost proteinu, stejně tak jako molární absorpční koeficient byl vypočten ze sekvence proteinu pomocí programu ProtParam [104].

5.1.2 Exprese a purifikace p53(1-312) a p53(1-393)

Exprese a purifikace konstruktů p53(1-312) a p53(1-393) je velmi podobná, a proto bude popsána současně. Hlavní rozdíl v přípravě těchto dvou konstruktů spočívá v přidaném purifikačním kroku pro p53(1-393), který byl purifikován sérií čtyř chromatografických metod, v pořadí niklové chelatační chromatografie, aniontově výměnné chromatografie, heparin-afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie, zatímco u kratšího konstruktů p53(1-312) aniontově výměnná chromatografie chybí.

Gen pro lidský p53(1-312) protein byl vnesen do plasmidu pET-15b a exprimován jako fúzní protein s histidinovou kotvou na N-konci. Gen pro lidský p53(1-393) protein byl vnesen do plasmidu pHGT-2 a exprimován jako fúzní protein s GB1 a N-koncovou 6×His afinitní značkou. GB1 je ~8,2 kDa malý protein, který zlepšuje rozpustnost a stabilitu fúzního proteinu, to je užitečné zejména u proteinů, které jsou při expresi v rekombinantních systémech náchylné k agregaci. Bakteriální buňky transformované expresním vektorem pET-15b jsou resistantní vůči antibiotiku ampicilinu, zatímco buňky transformované expresním vektorem pHGT-2 jsou resistantní vůči kanamycinu. Exprese proteinů je opět pod kontrolou *lac* operátoru a je

indukována IPTG.

Založení bakteriálních kultur a jejich následná kultivace probíhala stejným způsobem, jakým bylo popsáno dříve pro FOXO4 protein, s tím rozdílem, že kultivace transformovaných buněk s p53(1-393) ve vektoru pHGT-2 probíhala v médiu obsahující kanamycin o koncentraci 100 µg/ml namísto ampicilinu. Exprese obou proteinů byla indukována 0,5 mmol dm⁻³ IPTG při OD₆₀₀ = 0,8 cm⁻¹ a teplotě 16 °C v médiu doplněném o 150 µM ZnSO₄. Přítomnost Zn²⁺ iontů při expresi napomáhá správnému skládání DNA-vazebné domény p53, v které je obsažen motiv zinkového prstu [88]. Proteiny byly exprimovány přes noc po dobu 16 hodin. Lyze buněk byla provedena shodně jako v případě FOXO4 proteinu, pouze se lišilo složení lyzačních pufrů (viz tab. 10.9 pro p53(1-312) a tab. 10.10 pro p53(1-393)).

Niklová chelatační chromatografie: Niklová chelatační chromatografie patří mezi afinitní chromatografie, u kterých je separace molekul umožněna na základě specifické interakci se stacionární fází, která selektivně interaguje pouze s určitým strukturním typem molekul vzorku. Jako stacionární fáze se používá Chelating SepharoseTM Fast Flow, která umožňuje imobilizaci Ni²⁺ iontů. Imobilizované nikelnaté ionty tvoří stabilní komplexy s atomy dusíku přítomných na postranních řetězcích histidinových zbytků. Při průchodu vzorku kolonou jsou proteiny se sekvencemi bohatých na histidin selektivně zachycovány na stacionární fázi. Např. proteiny značené tzv. histidinovou kotvou (tvořenou sekvencí po sobě jdoucích šesti histidinových zbytků na N- nebo C-konci proteinu) budou silně interagovat se stacionární fází, zatímco proteiny neobsahující sekvence bohaté na histidin se odplaví. Eluci zachycených proteinů lze docílit průtokem roztoku obsahujícího přebytek imidazolu. Molekula imidazolu se strukturně podobá histidinu a soutěží o vazbu s nikelnatými ionty, čímž vytěsňuje vázané proteiny ze stacionární fáze kolony.

Na buněčný lyzát ze 6 litrů buněčné kultury byla použita 20ml kolona naplněná 5 ml Chelating SepharoseTM Fast Flow. Buněčný lyzát byl nejdříve 1 hodinu při 4 °C inkubován za stálého míchání se stacionární fází kolony. Kolona byla ponořena do ledové lázně a následovala absorpce stacionární fáze na kolonu připojením k peristaltické pumpě za průtoku lyzátu 2 ml/min, a poté promytí 50 ml čistého pufru E pro niklovou chelatační chromatografii. Následovalo promytí 300 ml 10%(v/v) pufru F v pufru E za průtoku 4 ml/min. Posléze byla peristaltická pumpa odpojena a vázaný protein byl eluován 25 ml čistého pufru F pro niklovou chelatační chromatografii. Eluovaný protein byl sbírán po 2ml frakcích do zkumavek inkubovaných na ledu. Přítomnost žádoucího proteinu v eluátu byla ověřena 12% SDS-PAGE. Pufry E a F pro niklovou chelatační chromatografii proteinů p53(1-312) a p53(1-393) nebyly

stejně, jejich složení je uvedeno v tab. 10.14 a tab. 10.15.

Dialýza a štěpení TEV proteasou: Po niklové chelatační chromatografii byly sjednocené frakce eluovaného proteinu dialyzovány, jednak za účelem odstranění přebytečného imidazolu a současného štěpení fúzních proteinů TEV proteasou. Ke štěpení fúzního proteinu bylo použito 200 U TEV proteasy na 1 mg rekombinantního proteinu. Výtěžek rekombinantního proteinu byl stanoven měřením absorbance ze vztahů 5.1 a 5.2 na str. 45. Kvantitativní průběh štěpení fúzního proteinu byl ověřen 12% SDS-PAGE.

První dialyzační pufr byl po 3 hodinách vyměněn za čerstvý dialyzační pufr o jiném složení a dialýza pokračovala přes noc po dobu ~12 hodin. Složení dialyzačních pufrů pro p53(1-312) je uvedeno v tab. 10.11 a tab. 10.13. Složení dialyzačních pufrů pro p53(1-393) je uvedeno v tab. 10.12 a tab. 10.13.

Aniontově výměnná chromatografie: Aniontově výměnná chromatografie proteinů je principálně totožná s kationtově výměnnou chromatografií, s tím rozdílem že pH roztoku proteinu musí být vyšší, než je jeho izoelektrický bod (pI), pak protein ponese záporný náboj a váže se na kladně nabitě funkční skupiny nosiče (anex).

Pro aniontově výměnnou chromatografii byla použita kolona MonoQTM 5/50 GL^{***}, která byla připojena k FPLC systému ÄKTAprime. Před zavedením vzorku na kolonu byl celý obvod přístroje a kolona ekvilibrována na pufr E pro aniontově výměnnou chromatografii (složení viz tab. 10.16). Roztok proteinu byl postupně nanášen na kolonu za průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Eluce navázaného proteinu byla docílena lineárním gradientem pufru F (složení viz tab. 10.16) s rostoucí koncentrací soli. Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu. Eluované frakce byly jímány do plastových mikrozkušavek po 1 ml, a ty byly uchovány na ledu. Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 12% SDS-PAGE.

Heparin-afinitní chromatografie: Heparin-afinitní chromatografie je separační technika používaná k purifikaci proteinů na základě jejich afinity k heparinu, vysoce sulfátovanému glykosaminoglykanu. Specifitu metody zajišťují silné iontové a hydrofobní interakce mezi heparinem a cílovými proteiny. Na heparin se selektivně vážou koagulační faktory,

*** Kolona MonoQTM je naplněna stacionární fází sefárovou a na svém povrchu nese kladně nabitě kvarterní amoniové skupiny.

DNA-vazebné proteiny, nebo růstové faktory. Pro purifikaci jiných proteinů může sloužit jako iontoměnič – katex, a to díky hustému pokrytí povrchu zápornými sulfátovými skupinami.

Pro heparin-afinitní chromatografii byla použita kolona HiTrap Heparin HP 5ml, která byla připojena k FPLC systému ÄKTAprime. Před zavedením vzorku na kolonu byl celý obvod přístroje a kolona ekvilibrována na pufr E pro heparin-afinitní chromatografii, který je totožný s pufrům pro aniontově výměnnou chromatografii (viz tab. 10.16). Roztok proteinu byl postupně nanášen na kolonu za průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min. Eluce navázaného proteinu byla docílena lineárním gradientem pufru F (viz tab. 10.16) s rostoucí koncentrací soli. Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu. Eluované frakce byly jímány do plastových mikrozkušavek po 1 ml, a ty byly uchovány na ledu. Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 12% SDS-PAGE.

Gelová permeační chromatografie: Sesbírané frakce po heparin-afinitní chromatografii byly sjednoceny v centrifugační zkumavce s membránou propustnou pro molekuly s molekulovou hmotností nižší než 30 kDa a zkoncentrovány ultrafiltrací v centrifuze při 4 °C a 1361×g na konečný objem menší než 2 ml. Pro gelovou permeační chromatografii proteinu p53(1-393) byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex™ 200 pg, zatímco pro p53(1-312) byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex™ 75 pg. Před zavedením vzorku na kolonu byl celý obvod přístroje a kolona ekvilibrována na pufr pro gelovou permeační chromatografii (složení viz tab. 10.17). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 1,5 ml/min. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 a 260 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu. Po ověření dostačující čistoty proteinu v sesbíraných frakcích pomocí 12% SDS-PAGE, byly frakce sjednoceny a z Lambertova-Beerova zákona stanovena koncentrace izolovaného proteinu měřením absorbance při 280 nm. Purifikovaný protein byl zkoncentrován na konečnou koncentraci ~1 mg/ml, rozdělen do 1ml alikvót a následně zamražen a skladován při –80 °C.

5.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (z angl. sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis) je rutinně používaná metoda pro zjištění přítomnosti kontaminantů a stanovení čistoty

purifikovaného proteinu v proteinovém vzorku. Jedná se o metodu diskontinuální gelové elektroforézy, při níž jsou proteiny nejprve koncentrovány v tenké vrstvě zaostřovacího gelu, a pak rozděleny na základě své molekulové hmotnosti v separačním gelu. Dodecylsulfát sodný (SDS) je detergent a zajišťuje denaturační podmínky v průběhu elektroforézy. SDS narušuje nekovalentní vazby proteinu, a propůjčuje jim jednotný záporný náboj, čímž zajišťuje, že všechny proteiny migrují gelem směrem k anodě a rychlost jejich migrace závisí především na jejich relativní molekulové hmotnosti.

Pro SDS-PAGE byl připraven 15% nebo 12 % separační gel převrstvený 4% zaostřovacím gelem, složení polymerizačních roztoků pro jejich přípravu je uvedeno v tab. 10.18 a tab. 10.19. Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny smícháním 10 μ l analyzovaného proteinového vzorku s 5 μ l vzorkového pufru obsahujícího SDS (složení viz tab. 10.21). Pro zajištění úplné denaturace a snadnějšího navázání SDS byly vzorky zahřívány po dobu tří minut při teplotě 95 °C. Elektroforéza probíhala v 1×koncentrovaném pufru pro SDS elektroforézu (složení 10×koncentrovaného pufru viz tab. 10.22) při konstantním napětí 200 V po dobu 1 hodiny. Po skončení elektroforézy byly proteiny na gelu vizualizovány pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (složení barvicího roztoku viz tab. 10.23). Gel byl ponořen do ~200 ml dH₂O a voda přivedena k varu. Hned na to byl gel převeden do ~150 ml barvicího roztoku a zahříván při teplotě trochu nižší než teplotě varu. Po asi 4 minutách zahřívání byl gel převeden do ~200 ml dH₂O a odbarven povařením gelu v destilované vodě.

5.3 Fosforylace FOXO4 in vitro pomocí AKT kinasy

Připravený konstrukt FOXO4 (o residuích 15-217) obsahuje pouze dvě fosforylační místa rozpoznávané proteinkinase AKT (T32 a S197), které tvoří vazebné motivy pro dimerní 14-3-3 protein, třetí fosforylační místo (S262) v tomto zkráceném konstruktu chybí.

Pro přípravu fosforylovaného FOXO4 (dále značený FOXO4-2P) byl purifikovaný FOXO4 protein podroben fosforylační reakci s 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 0,2 mM ATP a 0,56 U AKT/mg proteinu při koncentraci substrátu (FOXO4) alespoň 30 μ M nebo vyšší. Reakce probíhala ve vodní lázni s termostatem nastaveným na 30 °C po dobu 2 hodin, následně byla reakční směs z lázně vyjmuta a ponechána další 2 hodiny při pokojové teplotě (~23 °C), a posléze přesunuta do lednice, kde reakce pokračovala při 4 °C po dobu 10 hodin. Následně byla za účelem odstranění ATP a AKT provedena druhá gelová permeační chromatografie

na koloně kolona Superdex™ 75 Increase 10/300 GL v pufru o stejném složení jako při první gelové chromatografii (viz tab. 10.8). Výsledek kvantitativního průběhu fosforylace byl ověřen hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací a pomocí nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu byl dokázána schopnost připraveného FOXO4-2P vázat dimerní 14-3-3 protein.

5.4 Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Na rozdíl od SDS-PAGE, která denaturuje proteiny, nativní PAGE zachovává nativní konformaci proteinů, včetně jejich kvartérní struktury. Proteiny migrují prostředím gelu v závislosti na svém náboji a velikosti, a zachovávají interakce s ostatními proteiny tak, že komplexy o vysoké afinitě (tj. nízké disociační konstantně) putují jako jeden celek.

Nativní elektroforéza probíhala v 12% polyakrylamidovém gelu v elektroforetické vaně naplněné 1×koncentrovaným TBE puftrem (složení 10×koncentrovaného TBE pufru viz tab. 10.24). Před samotnou elektroforézou proteinových vzorků byla elektroforéza nejprve spuštěna naprázdno (tzv. pre-run) při 200 V po dobu 1 hodiny za účelem odstranění zbytkového APS, nespotebvaného při přípravě gelu. APS se působením světla rozkládá za vzniku volných radikálů, které zahajují polymerační reakci gelu, před nativní elektroforézou je však nutné zbytkový APS z gelu odstranit, aby nedošlo k oxidačnímu poškození proteinových vzorků a jejich případné denaturaci nebo ke konformačním změnám.

Složení vzorků pro nativní elektroforézu je uvedeno v tab. 5.1. Po smíchání proteinů v daných molárních poměrech byly vzorky ponechány inkubovat po dobu 30 minut na ledu, následně bylo přidáno 5 μl vzorkového pufru s bromfenolovou modří (složení viz tab. 10.25) a po dalších 10 minutách inkubace bylo na gel pipetováno vždy 10 μl vzorku. Nativní elektroforéza probíhala v ledové lázni při 170 V po dobu tří hodin. Proteiny na gelu byly vizualizovány pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 stejným postupem jako při SDS-PAGE.

Tabulka 5.1: Složení vzorků pro nativní elektroforézu. Každý sloupec 1–5 odpovídá jedné dráze polyakrylamidového gelu.

	#1	#2	#3	#4	#5
40 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ 14-3-3 γ	–	–	15 μl	7,5 μl	7,5 μl
20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ FOXO4	15 μl	–	–	7,5 μl	–
20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ FOXO4-2P	–	15 μl	–	–	7,5 μl
TBE vzorkový pufr	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl

5.5 Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací

Pro provádění následných experimentů s FOXO4-2P bylo potřeba ověřit, že došlo ke kompletní fosforylaci na obou residuech T32 a S197, tedy že se v proteinovém vzorku nenachází frakce nefosforylovaného FOXO4 proteinu. Za tímto účelem byla provedena hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací vzorku před fosforylací (100 μl vzorku o koncentraci FOXO4 40 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) a vzorku vzatého po fosforylací (100 μl vzorku o koncentraci FOXO4-2P 40 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Měření bylo provedeno Pavlou Vaňkovou, Ph.D (Centrum molekulární struktury BTÚ AV ČR Biocev, Vestec) na hmotnostním spektrometru 15T-SolariX XR FT-ICR (Bruker Daltonics).

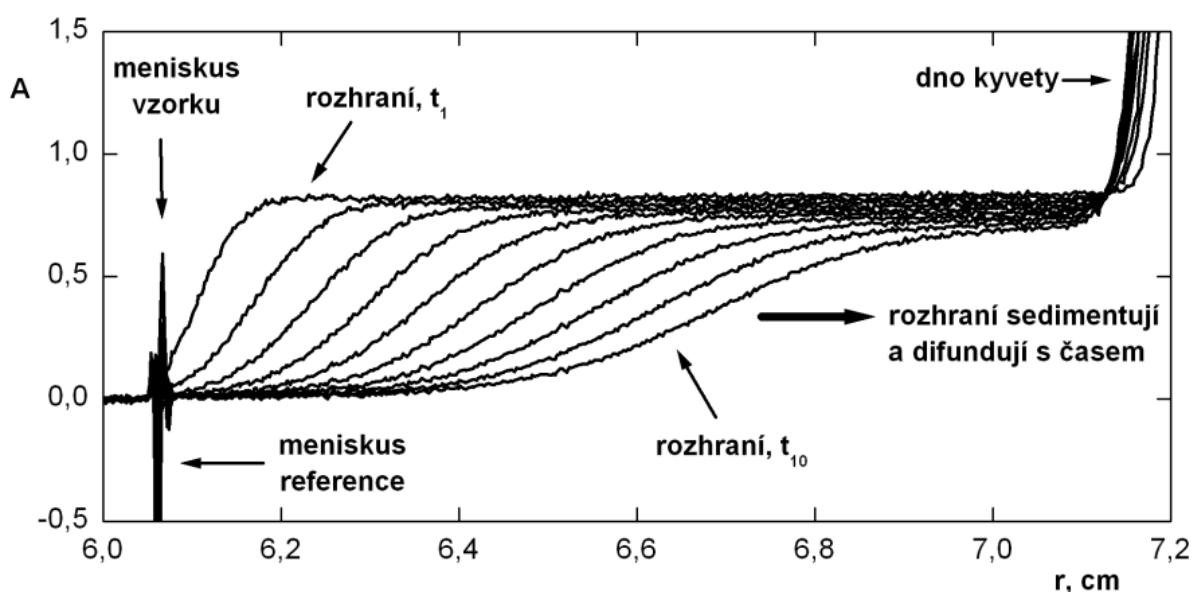
Obecný pracovní postup je následující: proteinový vzorek je nejdříve zbaven soli na odsolovací koloně proto, aby se zabránilo interferenci při převádění analytu do ionizovaného stavu. Současně dochází k výměně pufru za pufr těkavější, který je vhodný pro elektrosprejovou ionizaci (např. 0,1-1% kyselina mravenčí). Připravený roztok proteinu se přes kapiláru zavede do hmotnostního spektrometru a je vystaven vysokému napětí, tím se vytvoří nabitě kapičky, které později podléhají desolvataci, dochází k vypařování rozpouštědla a postupně se uvolňují do plynné fáze jednotlivé ionty. Vzniklé ionty jsou poté separovány na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) a detekovány za vzniku hmotnostního spektra. Elektrosprejová ionizace je tzv. měkká ionizační technika, u níž nedochází k významné fragmentaci molekul analytu, což z ní činí vhodnou techniku pro analýzu biomolekul.

5.6 Měření sedimentační rychlosti analytickou ultracentrifugací

Analytická ultracentrifugace (AUC) je metoda sedimentační analýzy používaná ke studiu hydrodynamických a termodynamických vlastností biomolekul. Během ultracentrifugačního experimentu je vzorek v roztoku vystaven tíhovému poli, které způsobuje sedimentaci biomolekul v kyvetě, přičemž sedimentace je sledována v reálném čase díky UV/Vis absorpčnímu, fluorescenčnímu a/nebo interferenčnímu optickému detekčnímu systému. Kyvety uvnitř centrifugy jsou analyzovány po celé jejich délce a data jsou automaticky ukládána pro následnou analýzu softwarem uzpůsobeným pro porovnávání experimentálních dat s matematickými modely. Ze sedimentačních dat lze získat odhad molekulové hmotnosti a tvaru částic, údaje o distribuci jednotlivých typů sedimentujících částic ve vzorku (např. různých oligomerních stavů proteinu), nebo lze získat důkaz o tvorbě

proteinových komplexů a hodnotu jejich rovnovážné konstanty. Výhoda AUC pro studium biomolekul spočívá v tom, že jsou studovány ve vodném prostředí, za biologicky relevantních podmínek a v nepřítomnosti interakcí s matricí a bez výrazných povrchových efektů. Navíc metoda nevyžaduje žádné umělé afinitní značky nebo fluorescenční značení.

Existují dva základní typy experimentů analytické ultracentrifugace: 1) metoda sedimentační rychlosti (SV AUC, z angl. *sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*) a 2) metoda sedimentační rovnováhy (SE AUC, z angl. *sedimentation equilibrium*). V metodě sedimentační rychlosti se vlivem dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček ultracentrifugy začnou všechny makromolekuly stejnoměrně pohybovat směrem ke dnu kyvety (sedimentovat). Brzy na to se tak vytvoří pohybující se rozhraní (angl. „boundary“) mezi sedimentujícími makromolekulami a oblastí roztoku, kde již makromolekuly nejsou přítomny (viz obr. 5.1). Toto rozhraní se pohybuje od menisku směrem ke dnu kyvety konstantní rychlostí a rychlost pohybu rozhraní je sledována pomocí série snímků, které jsou zaznamenávány v pevném časovém intervalu. Proti sedimentaci částic působí difuze, která je zodpovědná za postupné rozmývání rozhraní. Z rychlosti pohybu rozhraní a jeho tvaru tak lze určit sedimentační a difuzní koeficient dané makromolekuly [105].



Obrázek 5.1: Soubor 10 snímků zaznamenaných absorpční optikou při 280 nm během experimentu měření sedimentační rychlosti (SV AUC). První snímek je označen t_1 a poslední snímek t_{10} . Časový interval mezi jednotlivými snímky byl 25 minut. Jedná se o snímky vzorku 40 kDa rekombinantního NK buněčného receptoru rClrb na analytické ultracentrifuge ProteomLab™ XL-I při 45 000 ot. min⁻¹. Převzato [105]

Sedimentační koeficient makromolekuly s je dán jejími molekulárními parametry vyjádřenými v Svedbergově rovnici:

$$s = u/\omega^2 r = M(1 - \tilde{v}\rho)/N_A f, \quad (5.3)$$

kde u je pozorovaná radiální rychlost makromolekuly (rychlost pohybu rozhraní) v $[\text{m s}^{-1}]$, ω^2 úhlová rychlost rotoru $[\text{rad s}^{-1}]$, r je vzdálenost od osy otáčení $[\text{m}]$, M molekulová hmotnost $[\text{kg mol}^{-1}]$, \tilde{v} parciální specifický objem molekuly $[\text{m}^3 \text{kg}^{-1}]$, ρ hustota roztoku $[\text{kg m}^{-3}]$, N_A Avogadrova konstanta $[\text{mol}^{-1}]$ a f frikční koeficient $[\text{kg s}^{-1}]$. Hodnota sedimentačního koeficientu se běžně udává v jednotkách Svedberg (S), přičemž 1 S odpovídá 10^{-13} sekundy. Sedimentační koeficient je nezávislý na aplikovaném gravitačním poli, a kromě závislosti na hustotě a viskozitě rozpouštědla (pufru) je molekulární konstantou. Dosazením vztahu $N_A f = RT/D$ (odvozeného ze Stokes-Einsteinovy rovnice) do pravé strany rovnice 5.3 lze vyjádřit závislost sedimentačního koeficientu na difuzním koeficientu D :

$$s = MD(1 - \tilde{v}\rho)/RT, \quad (5.4)$$

kde T je termodynamická teplota v Kelvinech a R univerzální plynová konstanta $[\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}]$.

Veškerá moderní analýza dat získaných metodou sedimentační rychlosti spočívá v numerickém řešení sady Lammových rovnic. Lammova rovnice je vyjádřena vztahem 5.5:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(c s \omega^2 r^2 - D \frac{\partial c}{\partial r} r \right), \quad (5.5)$$

kde c je koncentrace sedimentující makromolekuly v mol m^{-3} , r je vzdálenost od osy otáčení v metrech a t je čas v sekundách. Jedná se o parciální diferenciální rovnici, odvozenou na základě principů rovnice kontinuity, vycházející z popisu lokálních rovnováh difuzního a sedimentačního toku. Lammova rovnice tudíž popisuje evoluci distribuce koncentrace sedimentující makromolekuly $c(r,t)$ pod vlivem tíhového pole jakožto funkci času a radiální pozice v centrifugační cele. Lammova rovnice nemá vyjma speciálních případů analytické řešení, a proto se experimentální data prokládají funkcí vycházející z numerického řešení, např. nelineární regresí pomocí metody nejmenších čtverců [105], [106].

5.6.1 Příprava vzorků a sběr dat

SV AUC experimenty byly provedeny na analytické ultracentrifuze ProteomLabTM XL-I s osmimístným An-50 titanovým rotorem (Beckman Coulter, USA) při teplotě 20 °C a úhlové rychlosti rotoru 48 000 ot./min s interferenčním detekčním systémem. Měření předcházela dialýza proteinových vzorků proti pufru o složení viz tab. 10.26. V zásadě byly provedeny dvě série měření. V první sérii byla koncentrace p53 u všech vzorků stejná (20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) s různými přídávky FOXO4-2P (v molárních poměrech FOXO4-2P:p53 0,1:1; 0,3:1; 1:1; 3:1; 10:1). Koncentrace FOXO4-2P byla tedy v každém vzorku jiná, v rozsahu 2–200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. V druhé sérii měření byla u všech vzorků totožná koncentrace FOXO4-2P (20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) a 14-3-3 (40 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), přičemž koncentrace p53 byla postupně zvyšována (opět v rozsahu koncentrací 2–200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, odpovídající molárním poměrům FOXO4-2P:p53 1:0,1; 1:0,3; 1:1; 1:3; 1:10). Současně s těmito sériemi byly za účelem stanovení referenčních sedimentačních koeficientů měřeny ve zbylých volných místech rotoru vzorky samostatných komponent p53(1-312), FOXO4-2P(15-217), a také vzorek komplexu FOXO4-2P:(14-3-3 ζ). Pro měření SV AUC se nepodařilo získat data pro vzorky obsahující protein p53(1-393) kvůli jeho nízké stabilitě v roztoku. Všechny vzorky byly připraveny o objemu 400 μl , přičemž do dvousektorových centrifugačních cel bylo pipetováno vždy 380 μl vzorku a 382 μl blanku (tj. pufru v dialyzační rovnováze s roztokem proteinu).

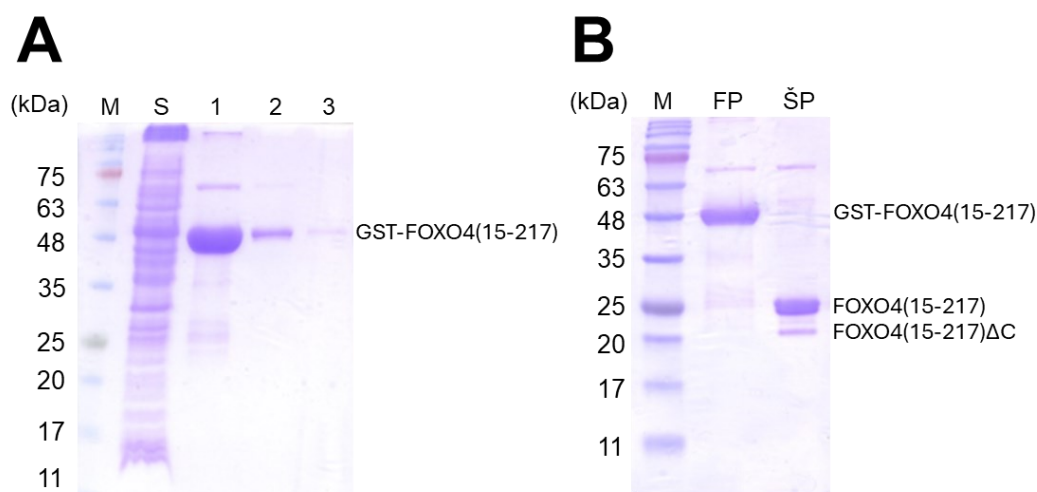
Naměřená SV AUC data byla analyzována v softwaru SEDFIT [107], použitím výnosu distribuce sedimentačních koeficientů (angl. termín continuous $c(s)$ distribution). Hustota a viskozita použitého pufru byla aproximována použitím programu SEDNTERP [108] z tabelovaných hodnot na základě znalosti složení pufru. Parciální specifický objem proteinů byla aproximován průměrnou hodnotou pro globulární proteiny 0,73 ml g^{-1} .

6 Výsledky

6.1 Purifikace FOXO4 proteinu

6.1.1 GST-afinitní chromatografie a štěpení fúzního proteinu

Eluovaný protein z GST-afinitní chromatografie byl sbírán po 10 ml frakcích do kónických zkumavek inkubovaných na ledu. Dohromady bylo posbíráno 30 ml eluátu. Výsledek purifikačního kroku byl ověřen pomocí 15% SDS-PAGE (viz obr. 6.1A). Z gelu je patrné, že už pomocí GST-afinitní chromatografie byl získán protein o relativně značné čistotě, a podařilo se zbavit velkého množství kontaminujících proteinů z buněčného lyzátu. Frakce 1–2 obsahují dostatečné množství fúzního proteinu, a proto byly sjednoceny pro další purifikační kroky.



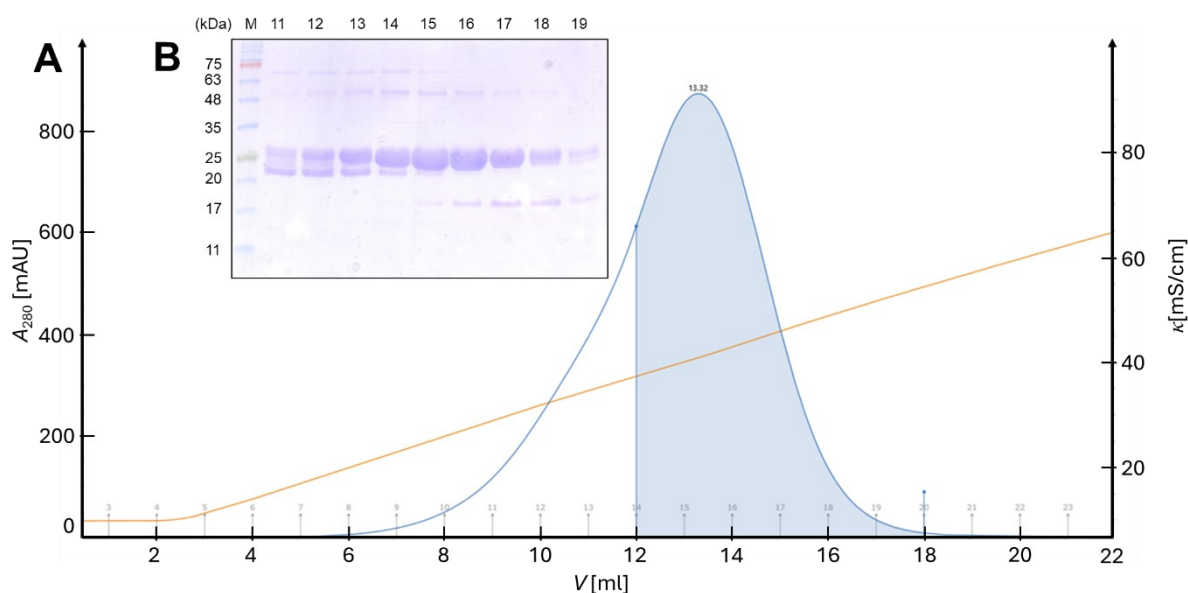
Obrázek 6.1: (A) 15% SDS-PAGE eluovaných frakcí fúzního proteinu GST-FOXO4 po GST-afinitní chromatografii. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth). Druhá dráha gelu (S) náleží vzorku supernatantu buněčného lyzátu. Dráhy 1–3 přísluší vzorkům sbíraných frakcí. (B) Ověření odštěpení GST pomocí 15% SDS-PAGE. Do dráhy označené FP (fúzní protein) byl pipetován vzorek vzatý z dialýzy před štěpením a do dráhy označené ŠP (štěpený protein) vzorek po proběhlé dialýze a po štěpení TEV proteasou.

Pro dialýzu byla použita membrána propustná pro molekuly s molekulovou hmotností do 6–8 kDa. Dialýza probíhala po dobu 12 hodin a posléze ještě 2 hodiny v novém pufru. Pro kvantitativní štěpení fúzního proteinu bylo k roztoku přidáno 5000 U TEV proteasy (200 U/mg rekombinantního proteinu). Z gelu na obr. 6.1B je patrné, že odštěpení GST proběhlo kvantitativně. U vzorku štěpeného proteinu je kromě štěpeného FOXO4 vidět také méně intenzivní pás při nižší molekulové váze. Z dřívějších studií je přitom známo, že se jedná

o proteolytický degradační produkt FOXO4, s několika chybějícími aminokyselinami na C-konci (dále značený FOXO4(15-217) Δ C).

6.1.2 Kationtově výměnná chromatografie

Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.2A). Eluované frakce byly jímány do plastových mikrozkušavek po 1 ml a uchovány na ledu. Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 15% SDS-PAGE (viz obr. 6.2B). K dalšímu purifikačnímu kroku byly sjednoceny frakce 14–19. Frakce 11–13 byly z další purifikace vyřazeny, neboť obsahují vyšší podíl C-koncově degradovaného FOXO4.

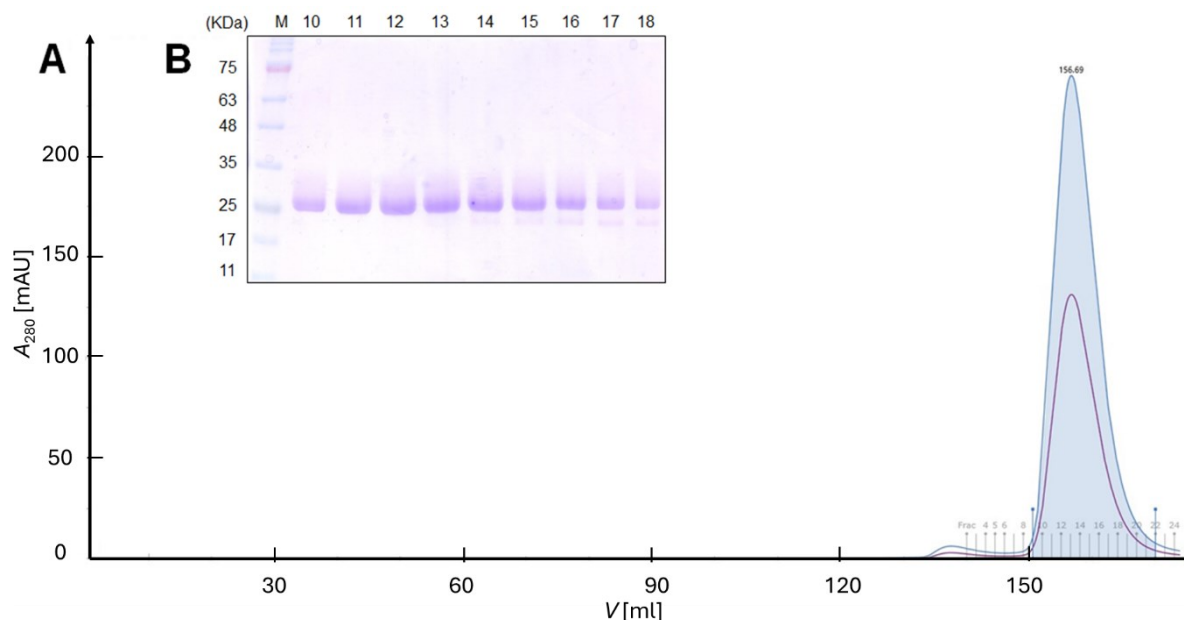


Obrázek 6.2: Purifikace FOXO4(15-217) kationtově výměnnou chromatografií. (A) Eluční profil FOXO4(15-217) z kationtově výměnné chromatografie na koloně HiTrap SP. Modrá křivka odpovídá absorbanci při 280 nm a oranžová křivka odpovídá konduktivitě. Vybarvená plocha pod křivkou odpovídá sesbíraným frakcím pro další purifikační krok. **(B)** Kontrola čistoty sbíraných frakcí FOXO4(15-217) pomocí 15% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

6.1.3 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena dle postupu uvedeném v sekci Gelová permeační chromatografie na str. 44. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 a 260 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.3A). Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 15% SDS-PAGE (viz obr. 6.3B). Frakce 9–18 byly

sjednoceny (10×1,5 ml) a zkoncentrovány na konečný objem 3 ml. Výtěžek purifikace byl vypočten dle vztahu (5.2), str. 45 a činil 3,0 mg. Purifikovaný FOXO4 byl rozdělen do 1 ml alikvót, zamražen a skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

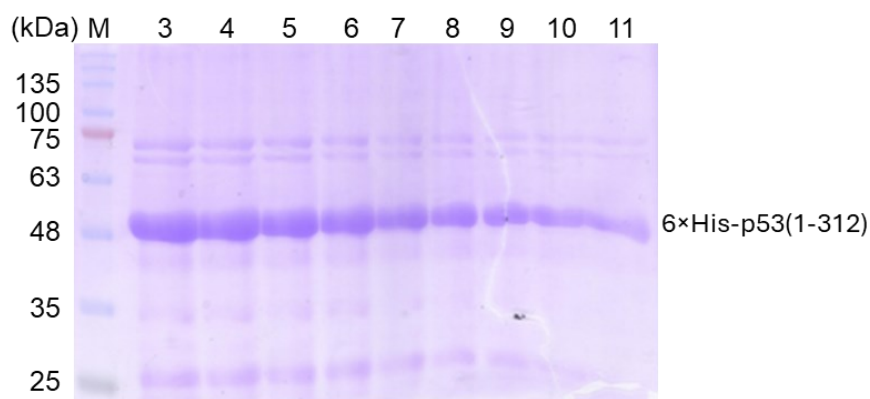


Obrázek 6.3: Purifikace FOXO4(15-217) gelovou permeační chromatografií. (A) Eluční profil FOXO4 (15-217) z gelové permeační chromatografie na koloně HiLoad 26/600 Superdex™ 75 pg. Fialová křivka odpovídá absorbanci při 260 nm a modrá křivka absorbanci při 280 nm. **(B)** Kontrola čistoty sbíraných frakcí FOXO4(15-217) pomocí 15% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

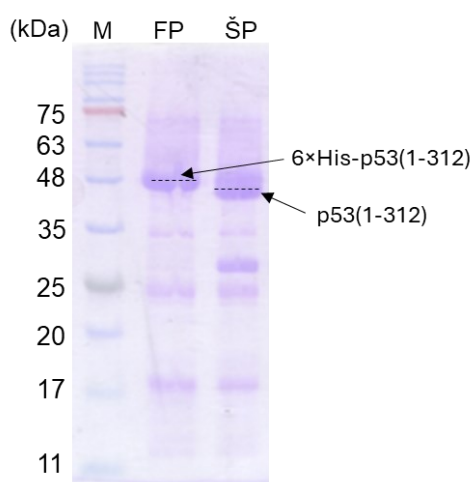
6.2 Purifikace p53(1-312) proteinu

6.2.1 Niklová chelatační chromatografie a štěpení afinitní kotvy

Eluovaný protein z niklové chelatační chromatografie byl sbírán po 2ml frakcích do zkumavek inkubovaných na ledu. Dohromady bylo posbíráno 12 frakcí. Přítomnost žádoucího proteinu v eluátu byla ověřena 12% SDS-PAGE (viz obr. 6.4). Všech 12 frakcí bylo sjednoceno pro další purifikační kroky. Pro dialýzu byla použita membrána propustná pro molekuly s molekulovou hmotností do 14 kDa. Dialýza probíhala po dobu 3 hodin a posléze ještě 12 hodin v novém pufru. Pro kvantitativní štěpení fúzního proteinu bylo k roztoku proteinu přidáno 7000 U TEV proteasy (200 U/mg rekombinantního proteinu). Z gelu na obr. 6.5 nebylo jasné, zda došlo ke kvantitativnímu odštěpení afinitní kotvy, přesto se pokračovalo dalšími purifikačními kroky.



Obrázek 6.5: 12% SDS-PAGE eluovaných frakcí fúzního proteinu 6×His-p53(1-312) po niklové chelatační chromatografii. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth). Dráhy 3–11 přísluší vzorkům sbíraných frakcí.

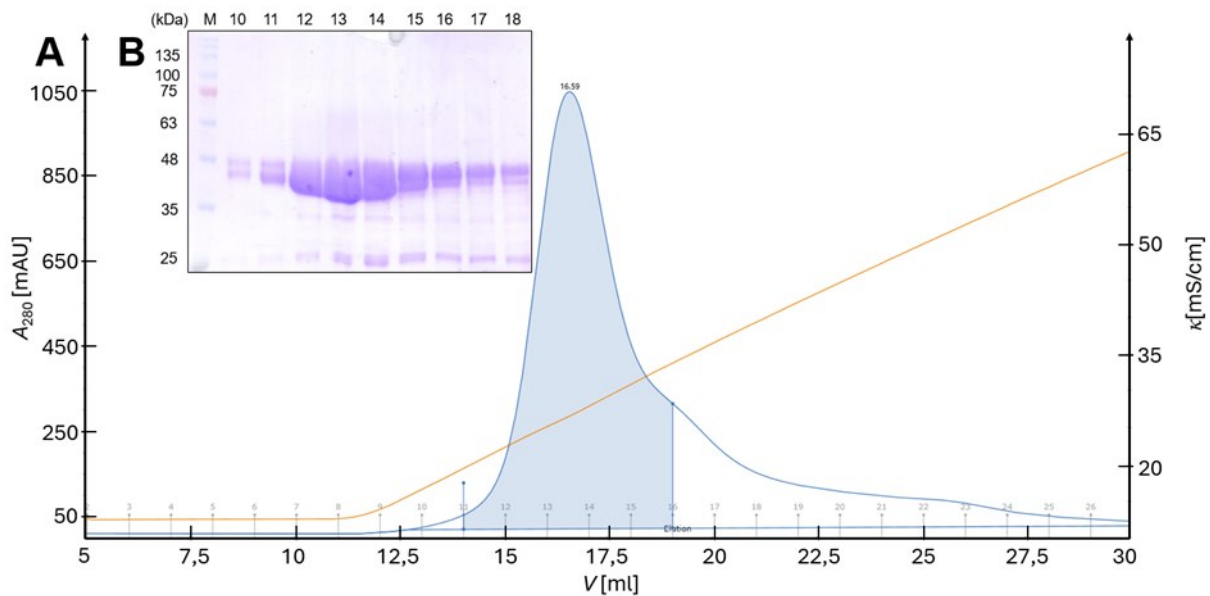


Obrázek 6.4: Ověření odštěpení afinitní kotvy pomocí 15% SDS-PAGE. Do dráhy označené FP (fúzní protein) byl pipetován vzorek vzatý z dialýzy před štěpením a do dráhy označené ŠP (štěpený protein) vzorek po proběhlé dialýze a po štěpení TEV proteasou.

6.2.2 Heparin-afinitní chromatografie

Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.6A). Eluované frakce byly jímány do plastových mikrozkrumavek po 1 ml a uchovány na ledu. Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 12% SDS-PAGE (viz obr. 6.6B). Z gelu je vidět zdvojení pásu při molekulové váze odpovídající p53(1-312). Toto zdvojení je zřejmě důsledkem nekompletního odštěpení afinitní značky. Sjedené frakce 11–16 byly proto před gelovou permeační chromatografií znovu dialyzovány proti pufru o složení viz tab. 10.13 a do dialýzy byla přidána

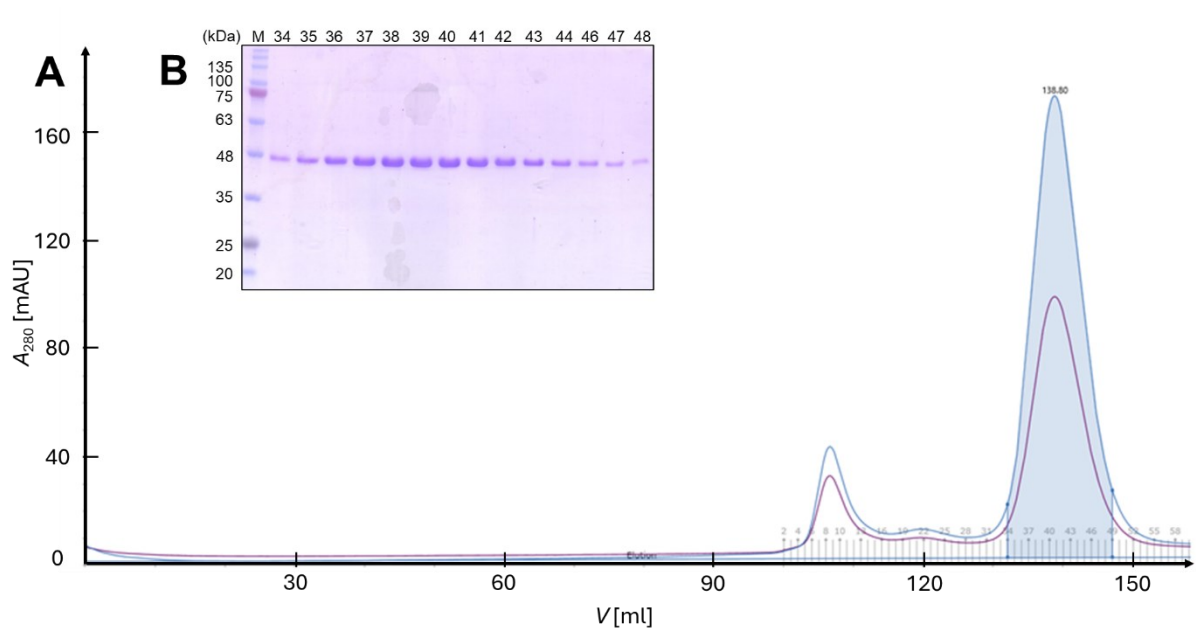
jiná alikvóta TEV proteasy. Kvantitativní průběh štěpení je tentokrát už jasný z gelu po gelové permeační chromatografii na obr. 6.7B.



Obrázek 6.6: Purifikace p53(1-312) heparin-afinitní chromatografií. (A) Eluční profil p53(1-312) z heparin-afinitní chromatografie na koloně HiTrap Heparin HP 5ml. Modrá křivka odpovídá absorbanci při 280 nm a oranžová křivka odpovídá konduktivitě. Vybarvená plocha pod křivkou odpovídá sesbíraným frakcím pro další purifikační krok. (B) Kontrola čistoty sbíraných frakcí p53(1-312) pomocí 12% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

6.2.3 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena dle postupu uvedeném v sekci Gelová permeační chromatografie na str. 48. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 a 260 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.7A). Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 15% SDS-PAGE (viz obr. 6.7B). Frakce 34–48 byly sjednoceny ($15 \times 1,5$ ml) a zkoncentrovány na konečný objem 6 ml. Výtěžek purifikace byl 6,6 mg.



Obrázek 6.7: Purifikace p53(1-312) gelovou permeační chromatografií. (A) Eluční profil p53(1-312) z gelové permeační chromatografie na koloně HiLoad 26/600 Superdex™ 75 µg. Fialová křivka odpovídá absorbanci při 260 nm a modrá křivka absorbanci při 280 nm. (B) Kontrola čistoty sbíraných frakcí p53(1-312) pomocí 15% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

6.3. Purifikace p53(1-393) proteinu

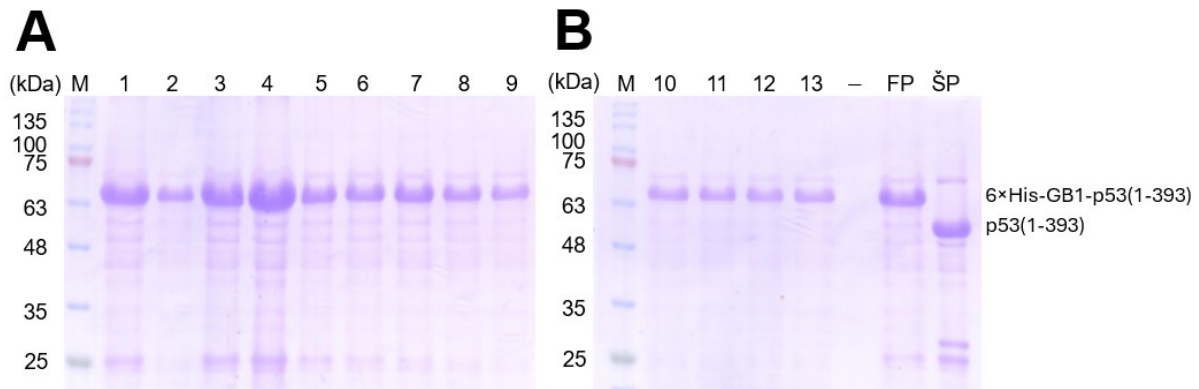
6.3.1 Niklová chelatační chromatografie

Eluovaný protein z niklové chelatační chromatografie byl sbírán po 2 ml frakcích do zkumavek inkubovaných na ledu. Dohromady bylo posbíráno 13 frakcí. Přítomnost žádoucího proteinu v eluátu byla ověřena 12% SDS-PAGE (viz obr. 6.8A,B). Všech 13 frakcí bylo sjednoceno pro další purifikační kroky. Pro dialýzu byla použita membrána propustná pro molekuly s molekulovou hmotností do 14 kDa. Dialýza probíhala po dobu 3 hodin a posléze ještě 12 hodin v novém pufru. Pro kvantitativní štěpení fúzního proteinu bylo k roztoku proteinu přidáno 4400 U TEV proteasy (250 U/mg rekombinantního proteinu). Z gelu na obr. 6.8B je patrné, že odštěpení 6×His-GB1 proběhlo kvantitativně.

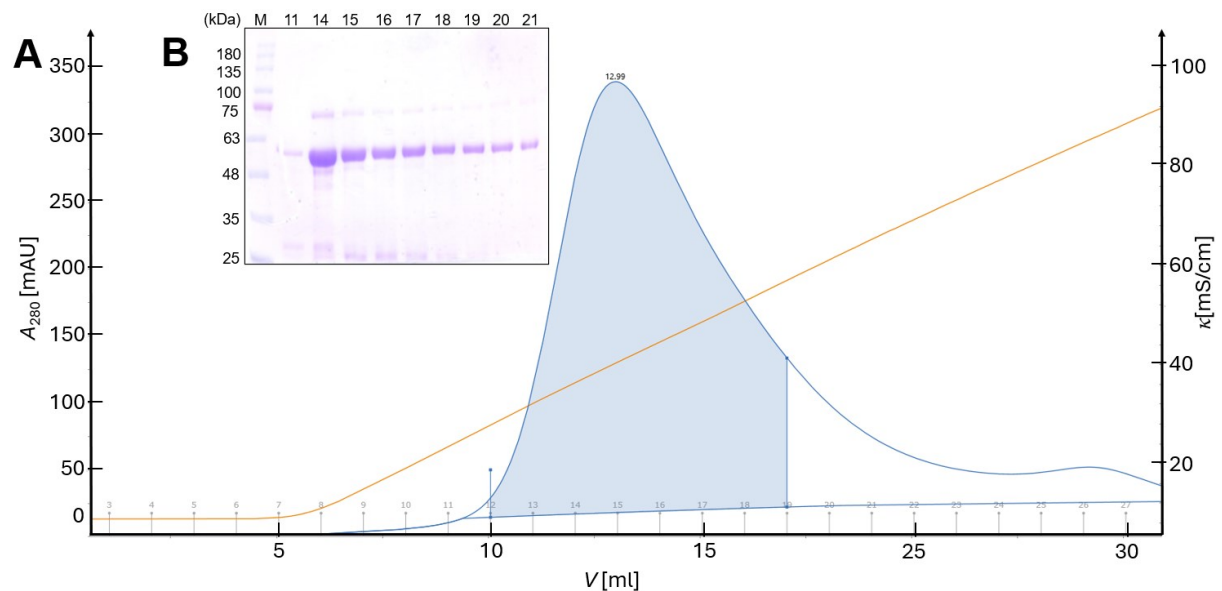
6.3.2 Aniontově výměnná chromatografie

Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.9A). Eluované frakce byly

jímány do plastových mikrozkuavek po 1 ml a uchovány na ledu. Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 12% SDS-PAGE (viz obr. 6.9B). Frakce 12-21 byly sjednoceny a vzaty k dalšímu purifikačnímu kroku.



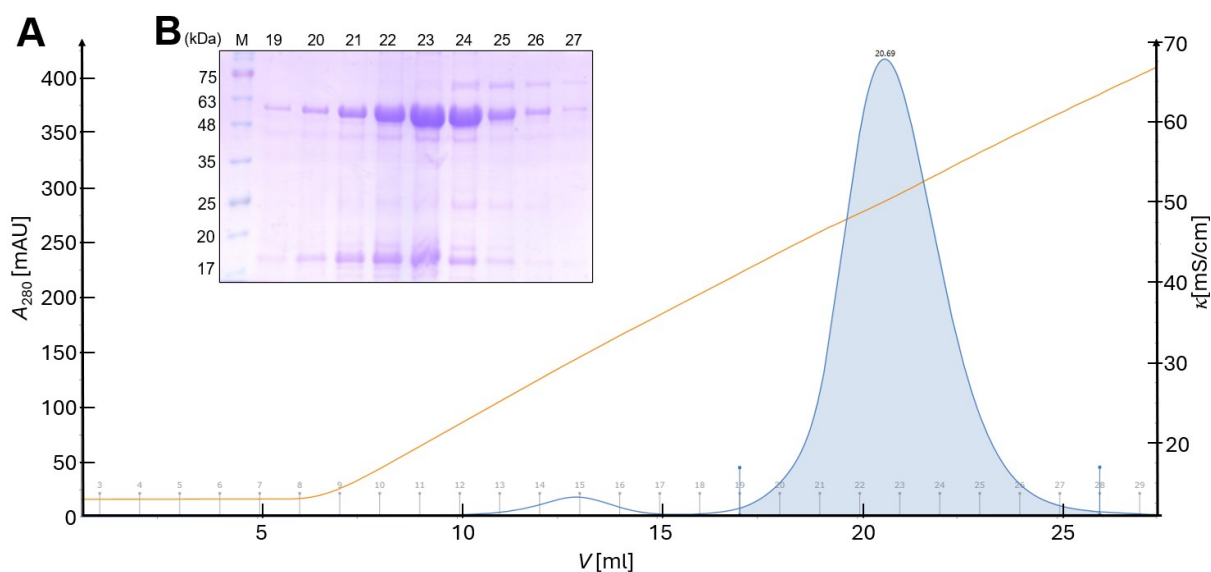
Obrázek 6.8: 12% SDS-PAGE eluovaných frakcí fúzního proteinu 6×His-GB1-p53(1-393) po niklové chelatační chromatografii. (A) První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth). Dráhy 1–9 přísluší vzorkům sbíraných frakcí. **(B)** Ověření odštěpení 6×His-GB1 pomocí 12% SDS-PAGE. Do dráhy označené FP (fúzní protein) byl pipetován vzorek vzatý z dialýzy před štěpením a do dráhy označené ŠP (štěpený protein) vzorek po proběhlé dialýze a po štěpení TEV proteasou. V gelu B jsou dále uvedeny vzorky frakcí sbíraných z niklové chelatační chromatografie v pokračujícím pořadí k gelu A (dráhy 10-13).



Obrázek 6.9: Purifikace p53(1-393) aniontově výměnnou chromatografií. (A) Eluční profil p53(1-393) z aniontově výměnné chromatografie na koloně MonoQ. Modrá křivka odpovídá absorbanci při 280 nm a oranžová křivka odpovídá konduktivitě. Vybarvená plocha pod křivkou odpovídá sesbíraným frakcím pro další purifikační krok. **(B)** Kontrola čistoty sbíraných frakcí p53(1-393) pomocí 12% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

6.3.3 Heparin-afinitní chromatografie

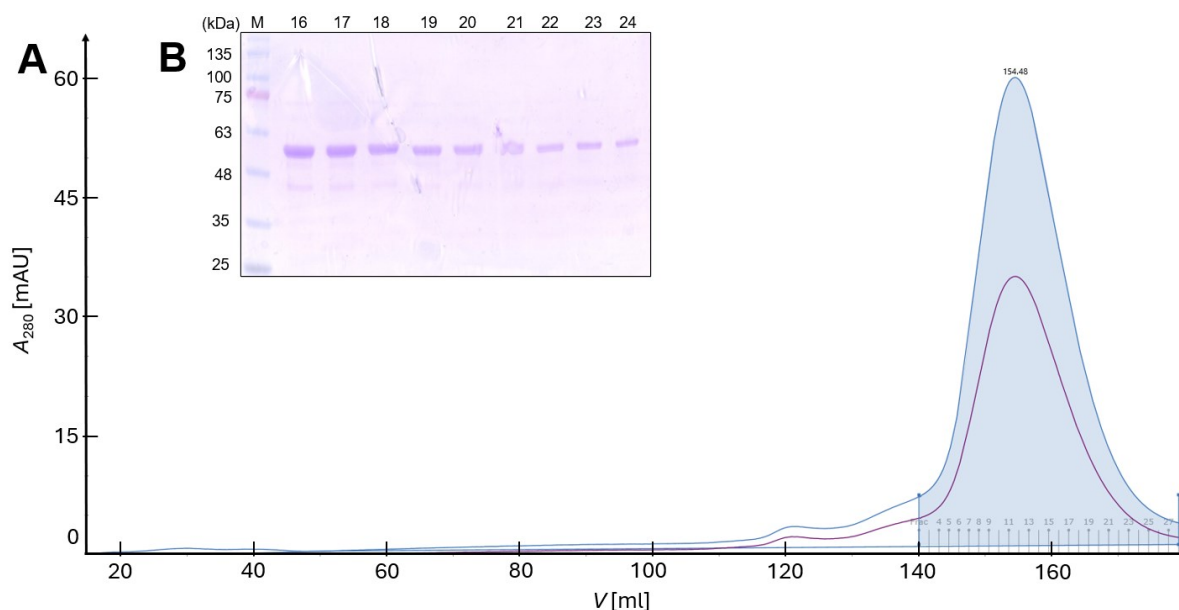
Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.10A). Eluované frakce byly jímány do plastových mikrozkuumavek po 1 ml a uchovány na ledu. Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 12% SDS-PAGE (viz obr. 6.10B). Frakce 19–27 byly sjednoceny a vzaty k dalšímu purifikačnímu kroku.



Obrázek 6.10: Purifikace p53(1-393) heparin-afinitní chromatografií. (A) Eluční profil p53(1-393) z heparin-afinitní chromatografie na koloně HiTrap Heparin HP 5ml. Modrá křivka odpovídá absorbanci při 280 nm a oranžová křivka odpovídá konduktivitě. Vybarvená plocha pod křivkou odpovídá sesbíraným frakcím pro další purifikační krok. (B) Kontrola čistoty sbíraných frakcí p53(1-393) pomocí 15% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

6.3.4 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena dle postupu uvedeném v sekci Gelová permeační chromatografie na str. 48. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 a 260 nm v ústí kolony v závislosti na elučním objemu (viz obr. 6.11A). Čistota sbíraných frakcí byla analyzována 12% SDS-PAGE (viz obr. 6.11B). Frakce 1–28 byly sjednoceny (28×1,5ml) a zkoncentrovány na konečný objem 2,5 ml. Výtěžek purifikace z 6 litrů bakteriální kultury byl 1,8 mg. Tetramerní p53(1-393) je při vyšších koncentracích náchylný k agregaci a precipitaci z roztoku, proto byl po purifikaci rozdělen do alikvót o koncentraci 0,7 mg/ml.



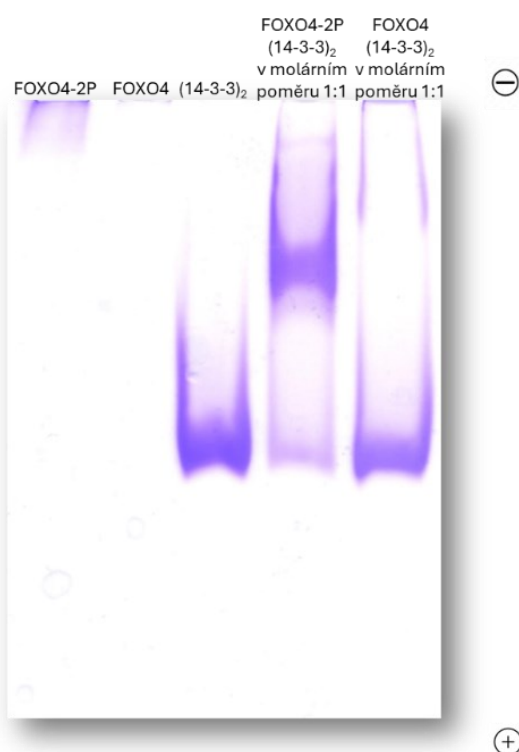
Obrázek 6.11: Purifikace p53(1-393) gelovou permeační chromatografií. (A) Eluční profil p53(1-393) z gelové permeační chromatografie na koloně HiLoad 26/600 Superdex™ 200 pg. Fialová křivka odpovídá absorbanci při 260 nm a modrá křivka absorbanci při 280 nm. **(B)** Kontrola čistoty sbíraných frakcí p53(1-393) pomocí 12% SDS-PAGE. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth).

6.4 Fosforylace FOX4 pomocí proteinkinasy AKT *in vitro*

6.4.1 Nativní elektroforéza

Vzorky pro nativní elektroforézu v 12% polyakrylamidovém gelu byly připraveny podle postupu uvedeném v sekci 5.4, na str. 50. Výsledný gel je na obr. 6.12. FOXO4 je bazický protein, jeho pI je 9,86 a při pH=8,3 ponese kladný náboj, takže migruje směrem ke katodě, která je při vertikálním uspořádání elektroforézy nahoře, proto FOXO4 nebude vstupovat do gelu. FOXO4-2P má sice menší, ale stále kladný, celkový náboj a taktéž téměř do gelu nevstupuje. Protein 14-3-3 nese při tomto pH záporný náboj, jeho pI je 4,77 a bude migrovat prostředím gelu směrem k anodě. FOXO4-2P tvoří s dimerem 14-3-3 ζ proteinu komplex ve stechiometrickém poměru 1:1 ($K_d \leq 30$ nM) [109]. Z gelu je patná pozice pásu pro samotný dimerní 14-3-3 protein, přibližně za polovinou třetí dráhy zleva. U čtvrté dráhy s FOXO4-2P a (14-3-3 ζ)₂ v molárním poměru 1:1 jsou vidět dva odlišené pásy. Jeden zhruba v čtvrtině dráhy gelu, který odpovídá stabilnímu komplexu FOXO4-2P:(14-3-3 ζ)₂, a dále také pás pro dimerní 14-3-3, přestože o mnohem nižší intenzitě než v dráze č. 3. Přítomnost pásu pro dimerní 14-3-3 může být vysvětlena buď nepřesností v dosažení molárního poměru 1:1, nebo

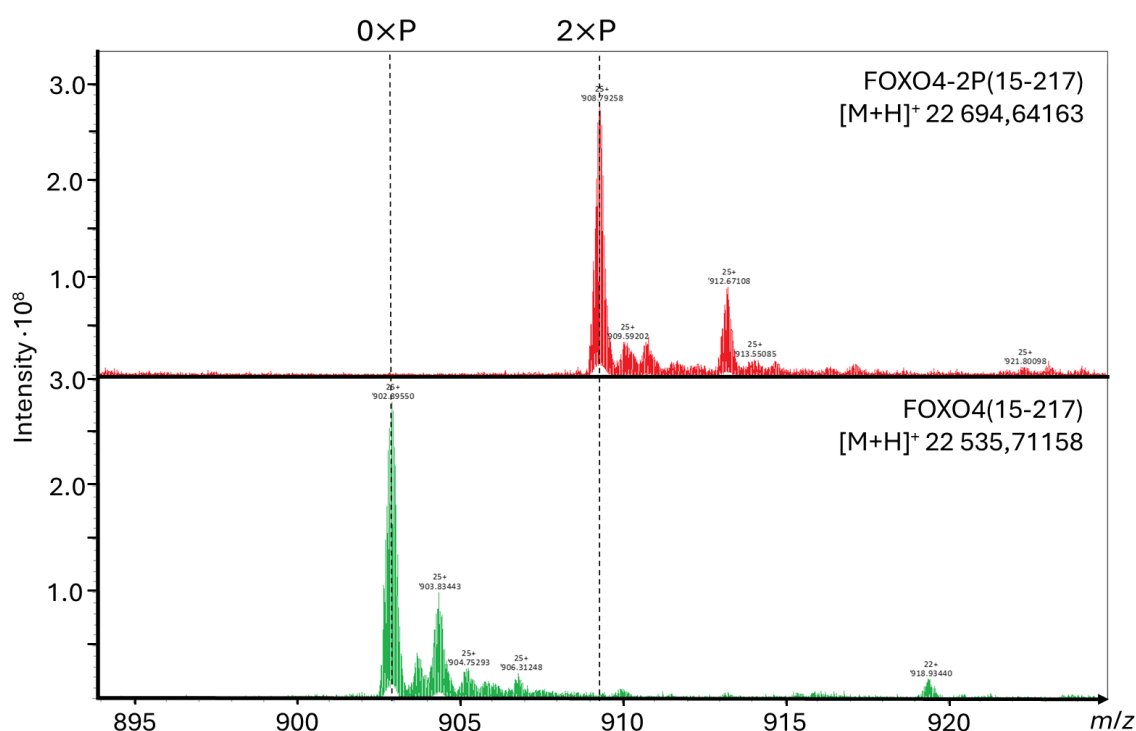
přítomnost minoritní frakce FOXO4 proteinu, který není fosforylovaný, a tak není schopný tvořit komplex s $(14-3-3\zeta)_2$ proteinem. Komplex FOXO4-2P: $(14-3-3\zeta)_2$ má nižší elektroforetickou mobilitu oproti samotnému dimeru 14-3-3, protože se jedná o molekulární celek o větší molekulové váze a/nebo celek s méně negativním nábojem. U poslední dráhy s FOXO4 a $(14-3-3\zeta)_2$ v molárním poměru 1:1 je opět vidět jediný pás odpovídající dimernímu 14-3-3 proteinu. Nepřítomnost pásu pro komplex reflektuje skutečnost, že fosforylovaný T32 a S197 tvoří vazebná místa pro dimerní 14-3-3 protein.



Obrázek 6.12: Nativní 12% PAGE dokazující interakci FOXO4-2P a dimerního 14-3-3 proteinu. Protein FOXO4 je při pH 8,3 kladně nabitý, takže nevstupuje do gelu (dráha 2). Fosforylovaný FOXO4, ačkoli je méně kladně nabitý kvůli záporně nabitým fosfátovým skupinám, do gelu téměř nevstupuje (dráha 1). Protein $(14-3-3)_2$ je záporně nabitý, proto migruje gelem směrem k anodě (dráha 3). Pro směs fosforylovaného FOXO4 s $(14-3-3)_2$ v molárním poměru 1:1 je vidět nový pás, který odpovídá komplexu $(14-3-3)_2$:FOXO4-2P (dráha 4). Interakce FOXO4 s $(14-3-3)_2$ proteinem je podmíněna fosforylací na dvou residuech, a proto směs nefosforylovaného FOXO4 s $(14-3-3)_2$ v molárním poměru 1:1 nevykazuje pás pro komplex (dráha 5).

6.4.2 Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací

Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací prokázala úplnost fosforylace FOXO4 proteinu na dvou residuích (viz hmotnostní spektra fosforylovaného a nefosforylovaného vzorku proteinu na obr. 6.13). Vzrůst molekulové váhy protonovaného iontu $[M+H]^+$ u vzorku fosforylovaného proteinu o ~ 160 Da odpovídá adici dvou fosfátových skupin. Navíc u vzorku fosforylovaného proteinu není vidět pík, který by odpovídal přítomnosti frakce nefosforylovaného FOXO4 (na pozici svislé přerušované čáry $0\times P$), ani pík pro FOXO4 fosforylovaný pouze na jednom ze dvou možných residuů.



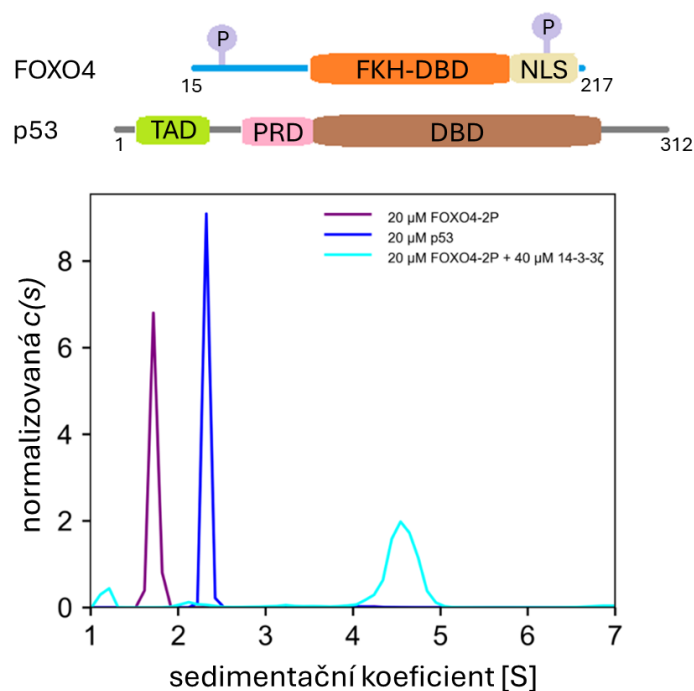
Obrázek 6.13: Hmotnostní spektrum získané metodou ESI-MS dokazující úplnost fosforylace *in vitro*. (A) Hmotnostní spektrum FOXO4-2P(15-217) proteinu (tj. FOXO4(15-217) fosforylované na dvou residuích). (B) Hmotnostní spektrum FOXO4(15-217) proteinu (tj. nefosforylované FOXO4). Molekulová váha protonovaného iontu $[M+H]^+$ vzorku fosforylovaného FOXO4 je o ~ 160 Da vyšší oproti váze $[M+H]^+$ píku vzorku nefosforylovaného FOXO4, což odpovídá adici dvou fosfátových skupin.

ESI-MS dále pomohla charakterizovat a kvantifikovat frakci C-koncově degradovaného FOXO4 proteinu zastoupeného v proteinovém vzorku. Z kompletních ESI-MS dat pro vzorek nefosforylovaného FOXO4 totiž vyplývá přítomnost protonovaného iontu $[M+H]^+$ o molekulové váze 20 365,20169 Da, která při porovnání se sekvencí FOXO4 odpovídá FOXO4(15-197) o relativním zastoupení 2,3 % a dále iontu $[M+H]^+$ o molekulové váze 20 207,8673 Da, která odpovídá FOXO4(15-195) o relativním zastoupení 3,7 %.

Tzn. již před fosforylací se v proteinovém vzorku vyskytuje ~ 6 % C-koncově degradovaného FOXO4, přičemž u FOXO4(15-195) dokonce chybí S197, a tak může být fosforylován pouze na T32. C-koncová degradace FOXO4 je časově závislý proteolytický proces, a proto je nutné, aby purifikace a následná fosforylace FOXO4 proběhla v co nejkratším možném čase, tak aby zastoupení FOXO4(15-217) Δ C bylo co nejnižší. Přítomnost frakce C-koncově degradovaného FOXO4-2P byla vzata v potaz pro průběh následných experimentů. Je důležité zmínit, že FOXO4(15-217) s bodovou mutací S197A po fosforylaci proteinkinasou AKT na T32, rovněž váže dimerní 14-3-3 protein, pouze s nižší afinitou (K_d komplexu je ~650 nM) [109].

6.5 Měření sedimentační rychlosti analytickou ultracentrifugací

Plošně normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů (dále jen normalizovaná $c(s)$) vzorků samotného FOXO4-2P, samotného p53 a komplexu FOXO4-2P:(14-3-3 ζ)₂ je uvedena na obr. 6.14. Normalizace je docílena přeškálováním distribuce tak, aby integrovaná plocha pod křivkou byla úměrná velikosti signálu. Získané sedimentační koeficienty (viz tab. 6.1) a pozice píků slouží jako reference pro další série měření. Normalizovaná $c(s)$ pro sérii vzorků s konstantní koncentrací p53(1-312) (20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) a rostoucí koncentrací FOXO4-2P(15-217) (v rozsahu koncentrací 2–200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ odpovídající molárním poměrům FOXO4-2P:p53 0,1:1; 0,3:1; 1:1; 3:1; 10:1) je uvedena na obr. 6.15.



Obrázek 6.14: Normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů vzorků 20 μM FOXO4-2P, 20 μM p53 a 20 μM FOXO4-2P + 40 μM 14-3-3ζ. FOXO4-2P tvoří s 14-3-3ζ komplex v stechiometrickém poměru 1:2. Nad distribucí jsou schématicky znázorněny použité konstrukty FOXO4-2P a p53 proteinů, které byly společně pro všechny SV AUC měření. Protein 14-3-3ζ byl použit o plné délce 245 aminokyselin.

Tabulka 6.1: Hydrodynamické parametry získané analýzou $c(s)$ SV AUC dat pomocí programu SEDFIT.

	s [S]	$s(20\text{ °C, dH}_2\text{O})$ [S]	$M_{w,\text{odhad}}$ [kDa]	f/f_0	$M_{w,\text{sekvence}}$ [kDa]
p53	2,324	2,413	36,7	1,652	34,7
FOXO4-2P	1,722	1,788	24,1	1,683	22,7
FOXO4-2P:(14-3-3ζ) ₂	4,552	4,724	82,1	1,441	78,3

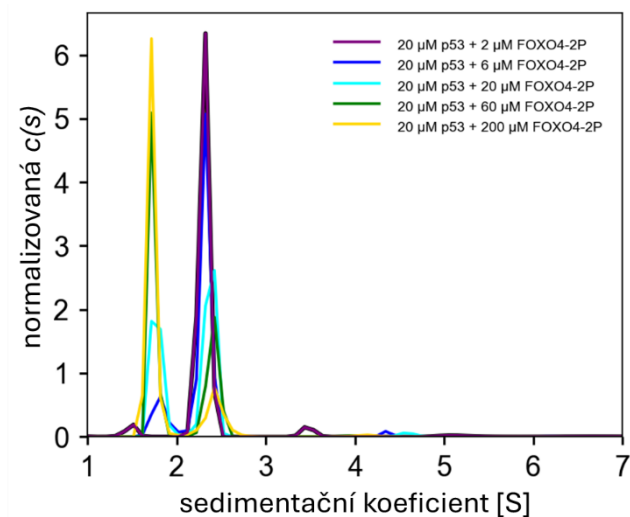
f/f_0 – frikční poměr (definovaný jako poměr pozorovaného frikčního koeficientu a frikčního koeficientu pro ideální sférickou částici o stejném objemu); „best-fit value“

s – experimentálně stanovený sedimentační koeficient

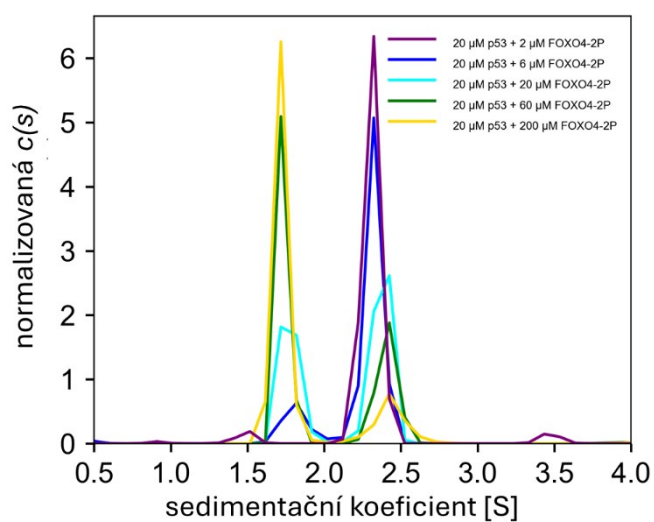
$s(20\text{ °C, dH}_2\text{O})$ – sedimentační koeficient upravený na teplotu 20 °C v deionizované vodě

$M_{w,\text{odhad}}$ – odhadovaná molekulová váha

$M_{w,\text{sekvence}}$ – molekulová váha získaná ze sekvence pomocí programu ProtParam, dostupného z [104]

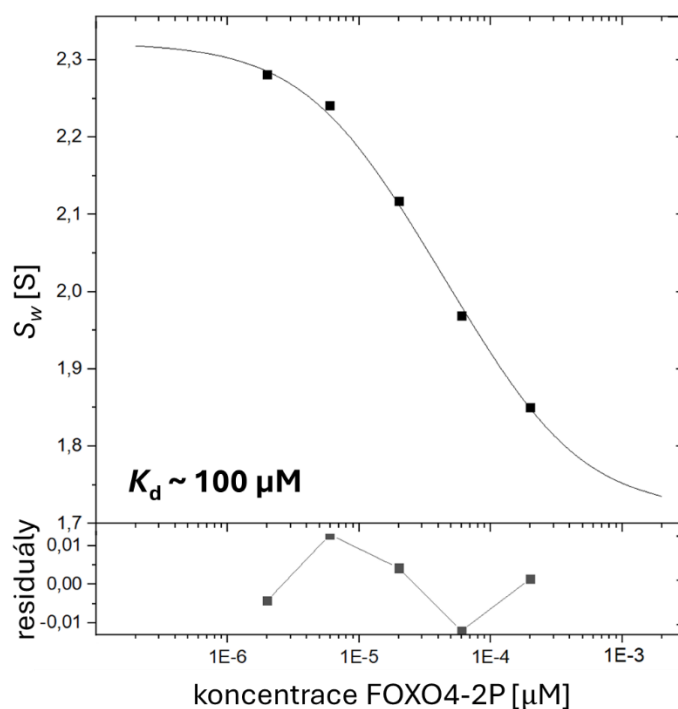


Obrázek 6.15: Plošně normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro sérii směsných vzorků o konstantní koncentraci p53 a rostoucí koncentraci FOXO4-2P:p53.



Obrázek 6.16: Detail jemného posunu p53 píku k vyšším sedimentačním koeficientům při vzrůstající koncentraci FOXO4-2P.

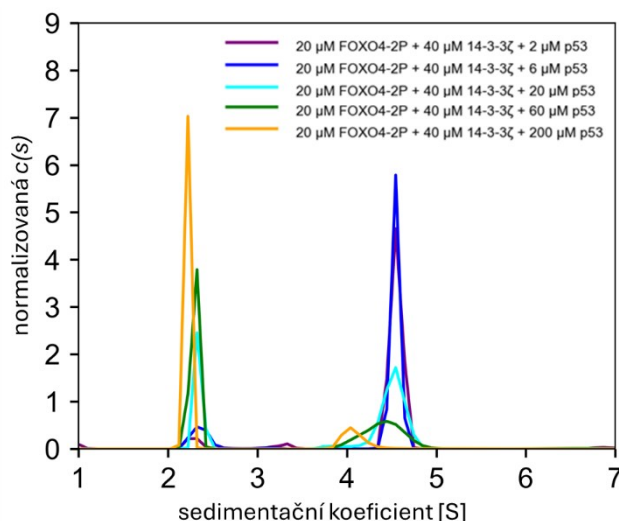
Při detailním zkoumání získaných $c(s)$ distribucí (viz obr. 6.16) si lze všimnout, že s rostoucí koncentrací FOXO4-2P dochází k jemnému posunu píku (odpovídající proteinu p53) k vyšším sedimentačním koeficientům. Tento posun píku je způsoben tvorbou komplexu FOXO4-2P:p53 při jeho postupném sycení. Analýzou vážených sedimentačních koeficientů (s_w) jakožto funkcí koncentrace FOXO4-2P byla zkonstruována vazebná izoterma (angl. termín s_w isotherm) pomocí programu SEDPHAT [110] a získána jí odpovídající hodnota rovnovážné disociační konstanty $K_d = 89 \pm 9 \mu\text{M}$ (viz obr. 6.17) pro 68,2% interval spolehlivosti.



Obrázek 6.17: Vazebná izoterma vážených sedimentačních koeficientů s_w pro komplex FOXO4-2P:p53. Izoterma byla konstruována na základě série měření SV AUC se směsmi obsahujícími konstantní koncentraci p53 ($20 \mu\text{mol dm}^{-3}$) a rostoucí koncentraci FOXO4-2P (v rozmezí 2–200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ na základě kterých byly získány datové body s_w jsou uvedeny na obr. 6.16. Izoterma byla konstruována pomocí Langmuirova vazebného modelu $A + B \rightleftharpoons AB$, za předpokladu, že stechiometrie FOXO4-2P:p53 komplexu je 1:1.

Porovnáním získané K_d komplexu fosforylovaného FOXO4-2P s p53 s dříve publikovanou hodnotou $K_d \sim 100 \mu\text{M}$ pro komplex nefosforylovaného FOXO4 s p53 [82] (při zachování stejných proteinových konstruktů p53(1-312) a FOXO4(15-217) a stejné metody stanovení, tj. z s_w izotermie na základě SV AUC dat), lze učinit závěr, že současná fosforylace FOXO4 na T32 a S197 nemá vliv na stabilitu komplexu FOXO4:p53.

Pro charakterizaci vlivu vazby dimeru 14-3-3 na fosforylované FOXO4 na schopnost FOXO4 tvořit komplex s p53 byla naměřena série směsných vzorků s totožnou koncentrací FOXO4-2P ($20 \mu\text{mol dm}^{-3}$) a 14-3-3 ($40 \mu\text{mol dm}^{-3}$) a rostoucí koncentrací p53 (opět v rozsahu koncentrací 2–200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, odpovídající molárním poměrům FOXO4-2P:p53 1:0,1; 1:0,3; 1:1; 1:3; 1:10). Získané normalizované distribuce sedimentačních koeficientů jsou uvedeny na obr. 6.18.



Obrázek 6.18: Plošně normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro sérii směsných vzorků o konstantní koncentraci FOXO4-2P a 14-3-3 ζ a rostoucí koncentraci p53.

Na základě úplné absence píků pro FOXO4-2P ($s \approx 1,7$ S) a volný $(14-3-3\zeta)_2$ ($s \approx 3,7$ S; viz [111]) a naopak přítomnosti píku pro komplex FOXO4-2P:(14-3-3 ζ)₂ ($s \approx 4,5$ S), pro srovnání viz obr. 6.14, lze provést tyto závěry: 1) v přítomnosti 14-3-3 ζ nedochází k tvorbě ternárního komplexu FOXO4-2P:(14-3-3 ζ)₂:p53 (nevyskytuje se žádná sedimentující částice s sedimentačním koeficientem vyšším, nežli odpovídá komplexu FOXO4-2P:(14-3-3 ζ)₂); a 2) vazba dimerního proteinu 14-3-3 ζ na FOXO4-2P znemožňuje tvorbu komplexu FOXO4:p53, pravděpodobně díky blokaci vazebného povrchu pro p53.

7 Diskuze

Vzájemná souhra transkripčních faktorů FOXO4 a p53, zejména pak jejich protein-proteinová interakce se ukázala být stěžejní v regulaci buněčné senescence [15]. Výzkumy na zvířatech za dobu posledních patnácti let prokázaly, že selektivní eliminace senescentních buněk (tzv. „senolýza“) prodlužuje dobu, po kterou organismus žije bez chronických onemocnění způsobených stárnutím [3]. Tato zjištění společně s konkrétními důkazy zdůrazňujícími přínos rozrušení FOXO4:p53 komplexu pro selektivní odstranění senescentních buněk učinila z této interakce slibný terapeutický cíl pro léčbu celé řady onemocnění, jejichž hlavním rizikovým faktorem je pokročilý věk (angl. termín „age-related diseases“) [102]. V této souvislosti je proto velmi žádoucí zkoumat potenciální strategie inhibice komplexu FOXO4:p53, ať už prostřednictvím specifických inhibitorů, nebo skrze regulaci jejich přidružených signálních drah.

Oba proteiny sestávají z několika domén a vnitřně neuspořádaných segmentů, přičemž vazebné rozhraní jejich komplexu zahrnuje komplexní vzorec kontaktů mezi různými oblastmi obou proteinů [84], [112]. Aktivita FOXO4 i p53 je přísně regulována prostřednictvím četných posttranslačních modifikací, jako je fosforylace, acetylace, ubikvitinace, metylace a glykosylace. Ačkoli jednotlivé modifikace obou proteinů jsou předmětem důkladných studií, a je známo, že ovlivňují jejich stabilitu, lokalizaci, transkripční aktivitu a interakce s jinými proteiny, tak úloha těchto modifikací v jejich vzájemné interakci a udržování senescence je značně neprobádaná [84], [15].

Jednou z klíčových posttranslačních modifikací FOXO4 je fosforylace zprostředkovaná proteinkinásou AKT. Signální dráha PI3K/AKT hraje zásadní roli v regulaci buněčného přežití, růstu a metabolismu, přičemž její aktivace vede k fosforylaci FOXO proteinů [113]. Tato fosforylace obvykle vede k 14-3-3 zprostředkovanému exportu FOXO proteinů do cytoplasmy a inhibici jejich transkripční aktivity [54]. Existují však i četné důkazy o zapojení dráhy PI3K/AKT do buněčné senescence. Předchozí studie ukázaly, že AKT indukuje senescenci lidských buněk prostřednictvím aktivace mTORC1 signální dráhy a zvýšení buněčné koncentrace proteinů p53 a p21 i v nepřítomnosti poškození buněčné DNA [114], [115]. Další studie ukázala, že aktivní PI3K/AKT/mTOR signalizace vede ke zvýšení zánětu vyvolaného senescencí [116]. Naproti tomu, studie na kožních buňkách naznačila, že aktivace PI3K/AKT signální dráhy senescenci blokuje a indukuje tak obnovu tkáně [117]. Tato studie také zjistila, že součástí tohoto procesu je snížení transkripční aktivity FOXO3. Jiná studie zase uvádí,

že abnormální aktivace PI3K/AKT signální dráhy může přispívat k udržování senescence prostřednictvím zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) [118], což může být částečně důsledkem inhibice exprese cílových genů FOXO (např. antioxidantních enzymů superoxid dismutasy a katalasy) [119]. Je však známo, že oxidační stres aktivuje FOXO4 prostřednictvím fosforylace proteinkinasou JNK, která není konzervována mezi ostatními členy FOXO, což by mohlo vést k odlišným aktivačním stavům FOXO4 ve srovnání s FOXO1 a FOXO3 [15]. To je v souladu se zjištěním, že hladina FOXO4 je v senescentních buňkách lidských fibroblastů zvýšena, zatímco hladina ostatních FOXO proteinů se výrazně nemění. Proteinkinasa JNK rovněž fosforyluje a aktivuje p53 [97], a lze tak spekulovat, že signalizace zprostředkovaná JNK by se proto mohla podílet na p53:FOXO4 udržované senescenci. V dalších studiích by proto bylo vhodné charakterizovat vliv fosforylace FOXO4 a fosforylace p53 proteinkinasou JNK na stabilitu komplexu p53:FOXO4. Každopádně je pravděpodobné, že fosforylace FOXO proteinů proteinkinasou AKT a následná interakce s proteiny 14-3-3 je součástí mechanismu udržování senescence. Nicméně přesné určení úlohy PI3K/AKT signální dráhy a interakce mezi FOXO a 14-3-3 v regulaci senescence bude vyžadovat další studie.

Za účelem charakterizace vlivu fosforylace FOXO4 proteinkinasou AKT a následné vazby 14-3-3 proteinu na stabilitu komplexu FOXO4:p53 byly exprimovány a purifikovány lidské proteiny FOXO4, p53 a 14-3-3 ζ (konstrukty FOXO4(15-217), p53(1-312), p53(1-393) a 14-3-3 ζ (1-245)). Studované proteiny byly připraveny pomocí série chromatografických metod včetně niklové chelatační chromatografie nebo GST-afinitní chromatografie, heparinové afinitní chromatografie, iontově výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie. Přípravu FOXO4(15-217) komplikovala C-koncová proteolytická degradace, která nevyhnutelně snižovala výtěžek purifikace proteinu. Nicméně frakce obsahující vyšší podíl FOXO4(15-217) Δ C nebyly použity pro následné interakční studie. Typický výtěžek tohoto konstruktu činil 0,5 mg na 1 l bakteriální kultury. FOXO4(15-217) byl po purifikaci fosforylován proteinkinasou AKT *in vitro*. Kvantitativní průběh fosforylační reakce byl ověřen hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací a funkčnost připraveného proteinu byla testována pomocí nativní PAGE. Nativní elektroforéza potvrdila tvorbu komplexu FOXO4:(14-3-3 ζ)₂ podmíněnou fosforylací FOXO4 na residuech T32 a S197. Hmotnostní spektrometrie potvrdila úplnost fosforylace na obou residuech a dále pomohla charakterizovat a kvantifikovat FOXO4(15-217) Δ C. Přestože se u purifikovaného FOXO4 proteinu vyskytovala minoritní frakce FOXO4(15-217) Δ C, která sice narůstá při provádění následných kroků (před fosforylací 6 % FOXO4, po fosforylací 10 %), tak by její přítomnost neměla

výrazně ovlivnit interakční studie pomocí SV AUC, protože analýza distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ se relativně dobře dokáže vypořádat s polydisperzitou vzorku [106]. Teoreticky však důsledkem mikroheterogenit vzorku dochází k výraznějšímu rozmytí sedimentačního rozhraní, protože se sedimentující částice (např. FOXO4(15-217) a FOXO4(15-217) Δ C) budou v detailech lišit např. co se týče tvaru a velikosti, budou se proto lišit i v sedimentačních rychlostech, což se také může projevit rozšířením píku ve výsledné $c(s)$ distribuci.

Výtěžky přípravy konstruktů p53(1-393) a p53(1-312) se výrazně lišily. Zatímco výtěžek p53(1-312) byl obvykle 1,1 mg na 1 l bakteriální kultury, tak pro konstrukt p53(1-393) byl výtěžek pouhých 0,3 mg na 1 l bakteriální kultury a příprava tohoto konstruktu nebyla snadná, zejména kvůli jeho nestabilitě v roztoku, ale také vzhledem k počtu purifikačních kroků. S konstruktem p53(1-393) se nepodařilo získat data metodou SV AUC, při analýze $c(s)$ byla patrná přítomnost agregátů.

Prvním cílem interakčních studií bylo charakterizovat vliv fosforylace FOXO4 na stabilitu jeho komplexu s p53. Adice objemné záporně nabitě fosfátové skupiny PO_4^{3-} může v proteinu vyvolat konformační změny, které poodhalují nebo maskují interakční povrch s jinými proteiny, a tím stabilizovat/destabilizovat tvorbu jejich komplexu. Dále, prostřednictvím alosterického efektu může také docházet ke konformačním změnám na vzdálených oblastech proteinu [28]. Fosforylované aminokyselinové zbytky také často tvoří nová vazebná místa nebo narušují ty stávající prostřednictvím elektrostatické interakce (tvorbou solných můstků, které mohou být jak stabilizující, tak destabilizující v závislosti na geometrické orientaci nabitých skupin) [120]. Fosforylace může také mít i nepřímý vliv na tvorbu určitého komplexu, a to tak, že způsobí přednostní vazbu jednoho vazebného partnera před druhým, a *in vivo* dále tak, že ovlivní vnitrobuněčnou lokalizaci proteinu, čímž efektivně pozmění jeho interakční partnery [121].

Na základě série měření SV AUC směsných vzorků p53 s FOXO4-2P byla konstruována vazebná isoterma vážených sedimentačních koeficientů s_w pro komplex FOXO4-2P:p53 a stanovena disociační konstanta tohoto komplexu $K_d = 89 \pm 9 \mu\text{M}$. Porovnáním s hodnotou disociační konstanty pro komplex nefosforylovaného FOXO4 s p53 v literatuře ($K_d \sim 100 \mu\text{M}$) [84], získané stejnou metodou, za stejných podmínek měření a se stejnými konstrukty, lze učinit závěr, že fosforylace na residuech T32 a S197 nemá vliv na stabilitu komplexu FOXO4:p53. Následně byla měření SV AUC směsných vzorků proteinů FOXO4-2P, p53 a 14-3-3 ζ charakterizována vazba 14-3-3 proteinů na fosforylovaný FOXO4. Výsledky měření ukazují, že vazba dimerního proteinu 14-3-3 na fosforylovaný FOXO4 brání

vzniku komplexu FOXO4:p53, pravděpodobně díky blokaci vazebného povrchu pro p53. Závěrem tak lze konstatovat, že fosforylace T32 a S197 sice nemá vliv na stabilitu komplexu FOXO4:p53, ale její efekt spočívá v tom, že FOXO4 přednostně váže proteiny 14-3-3 před proteinem p53, čímž je účinně přesměrována jeho interakční cesta a *in vivo* také vnitrobuněčná lokalizace. Na základě těchto výsledků však nelze tvrdit, že fosforylace FOXO proteinkinasou AKT a následný export FOXO proteinů do cytoplasmy představuje nevratnou inhibici jejich transkripční aktivity, protože vazba 14-3-3 proteinů na FOXO může být zvrácena fosforylací 14-3-3ζ proteinkinasou JNK na S184 [122], což vyvolává další otázky ohledně přesné úlohy proteinkinas JNK a AKT v regulaci senescence udržované interakcí FOXO4:p53 proteinů, jejichž zodpovězení bude vyžadovat další studie.

8 Závěr

1. Proteiny FOXO4(15-217), p53(1-312) a p53(1-393) byly exprimovány a purifikovány v dostačujícím mg množství a čistotě pro následné experimenty provedené v této práci.
2. Protein FOXO4(15-217) byl kvantitativně fosforylován pomocí proteinkinasy AKT.
3. Byla ověřena tvorba komplexu FOXO4-2P s dimerním 14-3-3 proteinem pomocí nativní elektroforézy a SV AUC, stejně tak jako tvorba komplexu FOXO4-2P s p53 pomocí SV AUC.
4. Pomocí SV AUC bylo ukázáno, že fosforylace FOXO4(15-217) na residuech T32 a S197 neovlivňuje vazebnou afinitu k p53(1-312).
5. Pomocí SV AUC bylo ukázáno, že vazba dimerního proteinu 14-3-3 na FOXO4-2P znemožňuje tvorbu komplexu FOXO4:p53.

9 Seznam citované literatury

- [1] P. de C. Ruy, R. Torrieri, J. S. Toledo, V. de S. Alves, A. K. Cruz, and J. C. Ruiz, “Intrinsically disordered proteins (IDPs) in trypanosomatids,” *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, p. 1100, 2014.
- [2] G. S. Rule and T. K. Hitchens, Eds., “NMR Spectroscopy,” in *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2006, pp. 1–27.
- [3] B. G. Childs *et al.*, “Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 10, pp. 718–735, 2017.
- [4] L. Hayflick and P. S. Moorhead, “The serial cultivation of human diploid cell strains,” *Exp. Cell Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 585–621, 1961.
- [5] L. Hayflick, “The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains,” *Exp. Cell Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 614–636, 1965.
- [6] J. W. Shay and W. E. Wright, “Hayflick, his limit, and cellular ageing,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, Art. no. 1, 2000.
- [7] S. He and N. E. Sharpless, “Senescence in Health and Disease,” *Cell*, vol. 169, no. 6, pp. 1000–1011, 2017.
- [8] A. G. Bodnar *et al.*, “Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells,” *Science*, vol. 279, no. 5349, pp. 349–352, 1998.
- [9] Van Deursen and J. M., “The role of senescent cells in ageing,” *Nature*, vol. 509, no. 7501, pp. 439–446, 2014.
- [10] S. Rajagopalan and E. O. Long, “Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 50, pp. 20596–20601, 2012.
- [11] D. Muñoz-Espín *et al.*, “Programmed cell senescence during mammalian embryonic development,” *Cell*, vol. 155, no. 5, pp. 1104–1118, 2013.
- [12] J.-I. Jun and L. F. Lau, “The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 7, pp. 676–685, 2010.
- [13] D. J. Baker *et al.*, “Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 7, pp. 825–836, 2008.
- [14] A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato, L. Pellegrini, M. Demaria, and A. Alimonti, “Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury,” *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 2, pp. 1047–1078, 2019.
- [15] B. Bourgeois and T. Madl, “Regulation of cellular senescence via the FOXO4-p53 axis,” *FEBS Lett.*, vol. 592, no. 12, pp. 2083–2097, 2018.

- [16] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, “The hallmarks of aging,” *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1194–1217, 2013.
- [17] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, “Hallmarks of aging: An expanding universe,” *Cell*, vol. 186, no. 2, pp. 243–278, 2023.
- [18] F. Rodier *et al.*, “Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 973–979, 2009.
- [19] E. Wanner, H. Thoppil, and K. Riabowol, “Senescence and Apoptosis: Architects of Mammalian Development,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 620089, 2020.
- [20] A. Kale, A. Sharma, A. Stolzing, P.-Y. Desprez, and J. Campisi, “Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells,” *Immun. Ageing*, vol. 17, no. 1, p. 16, 2020.
- [21] M. Xu *et al.*, “Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age,” *Nat. Med.*, vol. 24, no. 8, pp. 1246–1256, 2018.
- [22] P. D. Robbins *et al.*, “Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 61, pp. 779–803, 2021.
- [23] E. O. Wissler Gerdes, A. Misra, J. M. E. Netto, T. Tchkonja, and J. L. Kirkland, “Strategies for late phase preclinical and early clinical trials of senolytics,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 200, p. 111591, 2021.
- [24] R. Di Micco, V. Krizhanovsky, D. Baker, and F. d’Adda di Fagagna, “Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 22, no. 2, pp. 75–95, 2021.
- [25] J. Chen, “The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 3, p. a026104, 2016.
- [26] J. W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge, “The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases,” *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 805–816, 1993.
- [27] A. Hernandez-Segura, J. Nehme, and M. Demaria, “Hallmarks of Cellular Senescence,” *Trends Cell Biol.*, vol. 28, no. 6, pp. 436–453, 2018.
- [28] B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 7th edition. W. W. Norton & Company., 2022.
- [29] W. Brown and S. Clancy, “Translation: DNA to mRNA to Protein,” 2008. [Online], [cit. 07.08.2024] Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Translation%3A-DNA-to-mRNA-to-Protein-Brown-Clancy/47c2de42fb5c28ba9ff9c0ef49f5e40605e4ac85>
- [30] H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, 8th edition. W. H. Freeman and Company., 2016.

- [31] N. J. Proudfoot, “Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut,” *Science*, vol. 352, no. 6291, p. aad9926, 2016.
- [32] M. Kodíček, O. Valentová, and R. Hynek, *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015.
- [33] I. Williamson, R. E. Hill, and W. A. Bickmore, “Enhancers: From Developmental Genetics to the Genetics of Common Human Disease,” *Dev. Cell*, vol. 21, no. 1, pp. 17–19, 2011.
- [34] B. A. Bouwman and W. de Laat, “Getting the genome in shape: the formation of loops, domains and compartments,” *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, p. 154, 2015.
- [35] S. Hirose, “Chromatin remodeling and transcription,” *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 124, no. 6, pp. 1060–1064, 1998.
- [36] E. W.-F. Lam, J. J. Brosens, A. R. Gomes, and C.-Y. Koo, “Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 7, pp. 482–495, 2013.
- [37] K. L. Clark, E. D. Halay, E. Lai, and S. K. Burley, “Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5,” *Nature*, vol. 364, no. 6436, pp. 412–420, 1993.
- [38] E. Boura, L. Rezaczkova, J. Brynda, V. Obsilova, and T. Obsil, “Structure of the human FOXO4-DBD–DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA,” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 12, pp. 1351–1357, 2010.
- [39] D. Weigel, G. Jürgens, F. Küttner, E. Seifert, and H. Jäckle, “The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo,” *Cell*, vol. 57, no. 4, pp. 645–658, 1989.
- [40] G. Calissi, E. W.-F. Lam, and W. Link, “Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 1, pp. 21–38, 2021.
- [41] F. Wang, C. B. Marshall, and M. Ikura, “Forkhead followed by disordered tail: The intrinsically disordered regions of FOXO3a,” *Intrinsically Disord. Proteins*, vol. 3, no. 1, p. e1056906, 2015.
- [42] D. R. Calnan and A. Brunet, “The FoxO code,” *Oncogene*, vol. 27, no. 16, pp. 2276–2288, 2008.
- [43] T. Furuyama, T. Nakazawa, I. Nakano, and N. Mori, “Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues,” *Biochem. J.*, vol. 349, no. 2, pp. 629–634, 2000.
- [44] A. van der Horst and B. M. T. Burgering, “Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 6, Art. no. 6, 2007.

- [45] B. F. Santos, I. Grenho, P. J. Martel, B. I. Ferreira, and W. Link, “FOXO family isoforms,” *Cell Death Dis.*, vol. 14, no. 10, p. 702, 2023.
- [46] W. Link, “Introduction to FOXO Biology,” *FOXO Transcr. Factors*, vol. 1890, pp. 1–9, 2019.
- [47] J.-H. Paik *et al.*, “FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and critical regulators of endothelial cell homeostasis,” *Cell*, vol. 128, no. 2, pp. 309–323, 2007.
- [48] B. M. T. Burgering, “A brief introduction to FOXOlogy,” *Oncogene*, vol. 27, no. 16, pp. 2258–2262, 2008.
- [49] A. Borkhardt *et al.*, “Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23),” *Oncogene*, vol. 14, no. 2, pp. 195–202, 1997.
- [50] A. K. Brown and A. E. Webb, “Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 127, pp. 165–192, 2018.
- [51] I. K. Guttilla and B. A. White, “Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 35, pp. 23204–23216, 2009.
- [52] W. Liu, Y. Li, and B. Luo, “Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 4, pp. 651–663, 2020.
- [53] A. M. Brownawell, G. J. P. L. Kops, I. G. Macara, and B. M. T. Burgering, “Inhibition of Nuclear Import by Protein Kinase B (Akt) Regulates the Subcellular Distribution and Activity of the Forkhead Transcription Factor AFX,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 10, pp. 3534–3546, 2001.
- [54] B. D. Hopkins, M. D. Goncalves, and L. C. Cantley, “Insulin–PI3K signalling: an evolutionarily insulated metabolic driver of cancer,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 16, no. 5, pp. 276–283, 2020.
- [55] L. Yu, J. Wei, and P. Liu, “Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 85, pp. 69–94, 2022.
- [56] A. Brunet, J. Park, H. Tran, L. S. Hu, B. A. Hemmings, and M. E. Greenberg, “Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a),” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 3, pp. 952–965, 2001.
- [57] V. Obsilova *et al.*, “14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4,” *Biochemistry*, vol. 44, no. 34, pp. 11608–11617, 2005.
- [58] G. Tzivion, M. Dobson, and G. Ramakrishnan, “FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 11, pp. 1938–1945, 2011.

- [59] A. Brunet *et al.*, “14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport,” *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 5, pp. 817–828, 2002.
- [60] G. Rena, A. R. Prescott, S. Guo, P. Cohen, and T. G. Unterman, “Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targetting,” *Biochem. J.*, vol. 354, no. Pt 3, pp. 605–612, 2001.
- [61] Z. Wang, T. Yu, and P. Huang, “Post-translational modifications of FOXO family proteins (Review),” *Mol. Med. Rep.*, vol. 14, no. 6, pp. 4931–4941, 2016.
- [62] S. Du and H. Zheng, “Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases,” *Cell Biosci.*, vol. 11, p. 188, 2021.
- [63] M. Fukuoka, H. Daitoku, M. Hatta, H. Matsuzaki, S. Umemura, and A. Fukamizu, “Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 503–508, 2003.
- [64] A. Brunet *et al.*, “Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase,” *Science*, vol. 303, no. 5666, pp. 2011–2015, 2004.
- [65] A. van der Horst *et al.*, “FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 1064–1073, 2006.
- [66] S.-R. Ho *et al.*, “O-GlcNAcylation enhances FOXO4 transcriptional regulation in response to stress,” *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 1, pp. 49–54, 2010.
- [67] N. G. Jayaprakash and A. Surolia, “Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability,” *Biochem. J.*, vol. 474, no. 14, pp. 2333–2347, 2017.
- [68] D. Hoogeboom, M. A. G. Essers, P. E. Polderman, E. Voets, L. M. M. Smits, and B. M. Th. Burgering, “Interaction of FOXO with β -Catenin Inhibits β -Catenin/T Cell Factor Activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 14, pp. 9224–9230, 2008.
- [69] M. Putker *et al.*, “Redox-dependent control of FOXO/DAF-16 by transportin-1,” *Mol. Cell*, vol. 49, no. 4, pp. 730–742, 2013.
- [70] A. B. Brenkman *et al.*, “The peptidyl-isomerase Pin1 regulates p27kip1 expression through inhibition of Forkhead box O tumor suppressors,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 18, pp. 7597–7605, 2008.
- [71] A. B. Brenkman, N. J. F. van den Broek, P. L. J. de Keizer, D. C. van Gent, and B. M. T. Burgering, “The DNA damage repair protein Ku70 interacts with FOXO4 to coordinate a conserved cellular stress response,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 4271–4280, 2010.
- [72] O. W. McBride, D. Merry, and D. Givol, “The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13),” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 1, pp. 130–134, 1986.

- [73] D. P. Lane and L. V. Crawford, "T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells," *Nature*, vol. 278, no. 5701, pp. 261–263, 1979.
- [74] "Hereditární nádorové syndromy | Genetika - Biologie." [Online], [cit. 09.08.2024] Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/hereditarni-nadorove-syndromy>
- [75] T. Barnoud, A. Indeglia, and M. E. Murphy, "Shifting the paradigms for tumor suppression: lessons from the p53 field," *Oncogene*, vol. 40, no. 25, pp. 4281–4290, 2021.
- [76] A. J. Levine and M. Oren, "The first 30 years of p53: growing ever more complex," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 749–758, 2009.
- [77] C. A. Finlay, P. W. Hinds, and A. J. Levine, "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation," *Cell*, vol. 57, no. 7, pp. 1083–1093, 1989.
- [78] O. Halevy, J. Rodel, A. Peled, and M. Oren, "Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma," *Oncogene*, vol. 6, no. 9, pp. 1593–1600, 1991.
- [79] B. J. Aubrey, G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold, and A. Strasser, "How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?," *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 1, pp. 104–113, 2018.
- [80] A. M. Boutelle and L. D. Attardi, "p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network," *Trends Cell Biol.*, vol. 31, no. 4, pp. 298–310, 2021.
- [81] D. R. Green and G. Kroemer, "Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53," *Nature*, vol. 458, no. 7242, pp. 1127–1130, 2009.
- [82] S. Kearns, R. Lurz, E. V. Orlova, and A. L. Okorokov, "Two p53 tetramers bind one consensus DNA response element," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 13, pp. 6185–6199, 2016.
- [83] A. C. Joerger and A. R. Fersht, "The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 6, p. a000919, 2010.
- [84] R. Mandal *et al.*, "FOXO4 interacts with p53 TAD and CRD and inhibits its binding to DNA," *Protein Sci.*, vol. 31, no. 5, 2022.
- [85] A. S. Krois, H. J. Dyson, and P. E. Wright, "Long-range regulation of p53 DNA binding by its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 48, pp. E11302–E11310, 2018.
- [86] C. Venot, M. Maratrat, C. Dureuil, E. Conseiller, L. Bracco, and L. Debussche, "The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression," *EMBO J.*, vol. 17, no. 16, pp. 4668–4679, 1998.
- [87] Y. Liu, O. Tavana, and W. Gu, "p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 564–577, 2019.

- [88] M. Kitayner *et al.*, “Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers,” *Mol. Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 741–753, 2006.
- [89] A. V. Follis, F. Llambi, L. Ou, K. Baran, D. R. Green, and R. W. Kriwacki, “The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 535–543, 2014.
- [90] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, and K. W. Kinzler, “Cancer genome landscapes,” *Science*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546–1558, 2013.
- [91] E. H. Baugh, H. Ke, A. J. Levine, R. A. Bonneau, and C. S. Chan, “Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers?,” *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 1, pp. 154–160, 2018.
- [92] A. C. Joerger and A. R. Fersht, “Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants,” *Adv. Cancer Res.*, vol. 97, pp. 1–23, 2007.
- [93] M. H. G. Kubbutat, S. N. Jones, and K. H. Vousden, “Regulation of p53 stability by Mdm2,” *Nature*, vol. 387, no. 6630, pp. 299–303, 1997.
- [94] A. J. Giaccia and M. B. Kastan, “The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals,” *Genes Dev.*, vol. 12, no. 19, pp. 2973–2983, 1998.
- [95] “The TP53 Website - MDM2 and MDM4 (MDMX).” [Online], [cit. 10.08.2024] Dostupné z: <https://p53.fr/tp53-information/tp53-knowledge-center/26-knowledge-center/37-mdm2-mdmx-mdm4#mdm2-and-mdmx-genes>
- [96] B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine, “Surfing the p53 network,” *Nature*, vol. 408, no. 6810, pp. 307–310, 2000.
- [97] Q.-B. She, W.-Y. Ma, and Z. Dong, “Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20,” *Oncogene*, vol. 21, no. 10, pp. 1580–1589, 2002.
- [98] A. M. Bode and Z. Dong, “Post-translational modification of p53 in tumorigenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 10, pp. 793–805, 2004.
- [99] M. Mijit, V. Caracciolo, A. Melillo, F. Amicarelli, and A. Giordano, “Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence,” *Biomolecules*, vol. 10, no. 3, p. 420, 2020.
- [100] S. Nemoto, M. M. Fergusson, and T. Finkel, “Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway,” *Science*, vol. 306, no. 5704, pp. 2105–2108, 2004.
- [101] F. Wang *et al.*, “Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53,” *J. Mol. Biol.*, vol. 384, no. 3, pp. 590–603, 2008.

- [102] M. P. Baar *et al.*, “Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging,” *Cell*, vol. 169, no. 1, pp. 132-147.e16, 2017.
- [103] V. Nogueira *et al.*, “Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis,” *Cancer Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 458–470, 2008.
- [104] ExPASy - ProtParam tool [Online], [cit. 12.8.2024], dostupné z:
<https://web.expasy.org/protparam/>
- [105] O. Vaněk a K. Bezouška, „Analytická centrifuga a její využití v biochemické laboratoři,” *Chem. listy*, vol. 104, pp. 1155-1162, 2010.
- [106] P. Shuck, H. Zhao, C. A. Brautigam, R. Ghirlando, *Basic principles of Analytical Ultracentrifugation*, 1st edition, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016.
- [107] P. Schuck, “Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling,” *Biophys J*, vol. 78, pp. 1606-1619, 2000.
- [108] T. M. Laue, B. D. Shah, T. M. Ridgeway, and S. L. Pelletier, “Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins,” in *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, S. E. Harding, A. J. Rowe, and J. C. Horton, Eds. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1992, pp. 90-125.
- [109] T. Obsil, R. Ghirlando, D. E. Anderson, A. B. Hickman, and F. Dyda, “Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 51, pp. 15264–15272, 2003.
- [110] P. Schuck, “On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation,” *Anal. Biochem.*, vol. 320, pp. 104-124, 2003.
- [111] L. Rezabkova *et al.*, “Structural Modulation of Phosducin by Phosphorylation and 14-3-3 Protein Binding,” *Biophys. J.*, vol. 103, no. 9, pp. 1960–1969, 2012.
- [112] J. Kim, D. Ahn, and C.-J. Park, “Biophysical investigation of the dual binding surfaces of human transcription factors FOXO4 and p53,” *FEBS J.*, vol. 289, no. 11, pp. 3163–3182, 2022.
- [113] K. T. Chan *et al.*, “A functional genetic screen defines the AKT-induced senescence signaling network,” *Cell Death Differ.*, vol. 27, no. 2, pp. 725–741, 2020.
- [114] M. V. Astle *et al.*, “AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy,” *Oncogene*, vol. 31, no. 15, pp. 1949–1962, 2012.

- [115] T. Minamino, H. Miyauchi, K. Tateno, T. Kunieda, and I. Komuro, “Akt-induced cellular senescence: implication for human disease,” *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 3, no. 4, pp. 449–451, 2004.
- [116] E. H. Bent, L. A. Gilbert, and M. T. Hemann, “A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses,” *Genes Dev.*, vol. 30, no. 16, pp. 1811–1821, 2016.
- [117] S. Liu *et al.*, “The PI3K-Akt pathway inhibits senescence and promotes self-renewal of human skin-derived precursors in vitro,” *Aging Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 661–674, 2011.
- [118] V. Nogueira *et al.*, “Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis,” *Cancer Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 458–470, 2008.
- [119] L.-O. Klotz, C. Sánchez-Ramos, I. Prieto-Arroyo, P. Urbánek, H. Steinbrenner, and M. Monsalve, “Redox regulation of FoxO transcription factors,” *Redox Biol.*, vol. 6, pp. 51–72, 2015.
- [120] P. Kumar *et al.*, “Multisite Phosphorylation Disrupts Arginine-Glutamate Salt Bridge Networks Required for Binding of Cytoplasmic Linker-associated Protein 2 (CLASP2) to End-binding Protein 1 (EB1),” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 21, pp. 17050–17064, 2012.
- [121] H. Nishi, A. Shaytan, and A. R. Panchenko, “Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation,” *Front. Genet.*, vol. 5, 2014.
- [122] J. Sunayama, F. Tsuruta, N. Masuyama, and Y. Gotoh, “JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3,” *J. Cell Biol.*, vol. 170, no. 2, pp. 295–304, 2005.

10 Přílohy

10.1 Tabulky se složením použitých roztoků a pufřů

Tabulka 10.1: Složení LB média, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
kvasinkový extrakt	5,0 g

Tabulka 10.2: Složení lyzačního pufřu pro FOXO4 protein (pH = 7,4)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
10×PBS (složení viz Tabulka 10.3)	2×PBS
DTT	10 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.3: Složení 10× koncentrovaného PBS pufřu (pH = 7,4), 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	14,4 g
NaN ₃	0,4 g

Tabulka 10.4: Složení pufřu pro GST-afinitní chromatografii (pH = 8,0)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	0,5 mol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³
DTT	10 mmol dm ⁻³
glycerol	10% (w/v)

Tabulka 10.5: Složení 1. dialyzačního pufřu pro FOXO4 protein (pH = 7,5)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	100 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³
DTT	1 mmol dm ⁻³
glycerol	10 % (w/v)

Tabulka 10.6: Složení 2. dialyzačního pufru pro FOXO4 protein (pH = 6,3)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
kyselina citrónová/citrát sodný	50 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³
DTT	2 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.7: Složení pufrů E a F pro kationově výměnnou chromatografií (pH = 6,3)

Pufř E		Pufř F	
Chemikálie	Výsledná koncentrace	Chemikálie	Výsledná koncentrace
kyselina citrónová/citrát sodný	50 mmol dm ⁻³	kyselina citrónová/citrát sodný	50 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³	EDTA	1 mmol dm ⁻³
DTT	2 mmol dm ⁻³	DTT	2 mmol dm ⁻³
NaCl	–	NaCl	1 mol dm ⁻³

Tabulka 10.8: Složení pufru pro Gelovou permeační chromatografií FOXO4 proteinu (pH = 7,5)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	100 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³
DTT	2 mmol dm ⁻³
glycerol	10 % (w/v)

Tabulka 10.9: Složení lyzačního pufru pro p53(1-312) protein (pH = 7,4)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
10×PBS (složení viz Tabulka 10.3)	1×PBS
NaCl	1 mol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	4 mmol dm ⁻³
imidazol	2 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.10: Složení lyzačního pufru pro p53(1-393) protein (pH = 8,0)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	40 mmol dm ⁻³
NaCl	1 mol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	4 mmol dm ⁻³
imidazol	4 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.11: Složení 1. dialyzačního pufru pro p53(1-312) protein (pH = 7,5)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	100 mmol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³
glycerol	10 % (w/v)

Tabulka 10.12: Složení 1. dialyzačního pufru pro p53(1-393) protein (pH = 8,0)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	200 mmol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³
glycerol	10 % (w/v)

Tabulka 10.13: Složení 2. dialyzačního pufru pro p53(1-312) a p53(1-393) proteiny (pH = 8,0)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	100 mmol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.14: Složení pufrů pro niklovou chelatační chromatografii p53(1-312) proteinu (pH = 8,0)

Pufř E		Pufř F	
Chemikálie	Výsledná koncentrace	Chemikálie	Výsledná koncentrace
10×PBS (složení viz Tabulka 10.3)	1×PBS	10×PBS (složení viz Tabulka 10.3)	1×PBS
NaCl	0,5 mol dm ⁻³	NaCl	0,5 mol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³	2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³
imidazol	1 mmol dm ⁻³	imidazol	0,5 mol dm ⁻³

Tabulka 10.15: Složení pufrů pro niklovou chelatační chromatografii p53(1-393) proteinu (pH = 8,0)

Pufř E		Pufř F	
Chemikálie	Výsledná koncentrace	Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	40 mmol dm ⁻³	Tris-HCl	40 mmol dm ⁻³
NaCl	1 mol dm ⁻³	NaCl	1 mol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³	2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³
imidazol	1 mmol dm ⁻³	imidazol	0,6 mol dm ⁻³

Tabulka 10.16: Složení pufrů pro aniontově výměnnou a heparin-afinitní chromatografii (pH = 8,0)

Pufř E		Pufř F	
Chemikálie	Výsledná koncentrace	Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³	Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	0,1 mol dm ⁻³	NaCl	1 mol dm ⁻³
2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³	2-merkaptoethanol	2 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.17: Složení pufrů pro gelovou permeační chromatografii pro p53(1-312) a p53(1-393) proteiny (pH = 7,5)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	150 mmol dm ⁻³
DTT	5 mmol dm ⁻³
glycerol	10 % (w/v)

Tabulka 10.18: Složení 12% a 15% polyakrylamidového separačního gelu

12% separační gel		15% separační gel	
Chemikálie	Odměřené množství	Chemikálie	Odměřené množství
Rotiphorese Gel 30 pufr pro separační gel (viz tab. 10.20)	4,50 ml	Rotiphorese Gel 30 pufr pro separační gel (viz tab. 10.20)	5,625 ml
dH ₂ O	3,0 ml	dH ₂ O	3,0 ml
TEMED	3,75 ml	TEMED	2,625 ml
10% (w/v) persulfát amonný	67,5 μl	10% (w/v) persulfát amonný	67,5 μl
	7,5 μl		7,5 μl

Připravené množství polymerizačního roztoku stačí na přípravu dvou gelů.

Tabulka 10.19: Složení 4% polyakrylamidového zaostřovacího gelu

Chemikálie	Odměřené množství
Rotiphorese Gel 30 pufr pro zaváděcí gel (viz tab. 10.20)	0,5 ml
dH ₂ O	1,0 ml
TEMED	2,25 ml
10% (w/v) persulfát amonný	5 μl
	45 μl

Připravené množství polymerizačního roztoku stačí na přípravu dvou gelů.

Tabulka 10.20: Složení pufrů pro přípravu zaostřovacího a separačního gelu

Pufr pro zaostřovací gel		Pufr pro separační gel	
Chemikálie/zásobní roztok	Odměřené množství	Chemikálie/zásobní roztok	Odměřené množství
1 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH = 6,8)	50 ml	2 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH = 8,8)	75 ml
10% (w/v) SDS	4 ml	10% (w/v) SDS	4 ml
dH ₂ O	46 ml	dH ₂ O	21 ml

Tabulka 10.21: Složení 5×SDS vzorkového pufru

Chemikálie/zásobní roztok	Odměřené množství
1 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH = 6,8)	0,6 ml
50% (w/v) glycerol	5,0 ml
10% (w/v) SDS	2,0 ml
2-merkapt ethanol	0,5 ml
1% (w/v) bromfenolová modř	1,0 ml
dH ₂ O	0,9 ml

Tabulka 10.22: Složení 10×koncentrovaného pufru pro SDS elektroforézu

Chemikálie	Odměřené množství
Tris	30 g
glycin	144 g
SDS	10 g

Chemikálie byly rozpuštěny v malém množství dH₂O a doplněny deionizovanou vodou do 1 l.

Tabulka 10.23: Složení barvicího roztoku pro vizualizaci proteinů po SDS-PAGE a nativní PAGE.

Chemikálie	Odměřené množství
CBB G-250	80 mg
35% HCl	3 ml

Roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 1 l.

Tabulka 10.24: Složení 10×koncentrovaného TBE pufru (pH = 8,3)

Chemikálie/zásobní roztok	Odměřené množství
Tris	54,0 g
H ₃ BO ₃	27,5 g
0,5 mol dm ⁻³ EDTA (pH = 8,0)	20,0 ml

Roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 500 ml.

Tabulka 10.25: Složení vzorkového pufru pro nativní elektroforézu (pH = 8,3)

Chemikálie/zásobní roztok	Odměřené množství
10×TBE	1 ml
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml

Roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 10 ml.

Tabulka 10.26: Dialyzační pufr pro SV AUC experimenty (pH = 7,5)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol dm ⁻³
NaCl	150 mmol dm ⁻³
TCEP	1 mmol dm ⁻³

Tabulka 10.27: Dialyzační pufr pro SAXS měření (pH = 7,5)

Chemikálie	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	25 mmol dm ⁻³
NaCl	150 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³
TCEP	1 mmol dm ⁻³
glycerol	3 % (w/v)

NSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDTQGDEAEAGEGGE
N

Pozůstatek histidinové afinitní kotvy po jejím odštěpení je zvýrazněn zeleně.

Parametry proteinu byly získány ze sekvence pomocí programu ProtParam dostupném z [104]:

14-3-3ζ: $M_w = 27\,939,30$ Da; $\epsilon_{280} = 27\,390$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹; pI = 4,77