

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jana Řeháková

Rekombinantní příprava transkripčního faktoru TEAD1

Recombinant expression of transcription factor TEAD1

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Růžena Lišková

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 22.5.2019

Podpis:

Abstrakt:

TEAD1 je jedním ze zástupců rodiny transkripčních faktorů TEAD. Tento transkripční faktor je velmi důležitý např. pro vývoj orgánů. Struktura celého transkripčního faktoru TEAD1 ještě není známa. Je známa struktura TEA vazebné domény, která je důležitá pro vazbu transkripčního faktoru TEAD1 na DNA, a transaktivační domény, na kterou se váží koaktivátory. TEAD1 se váže na DNA a po navázání koaktivátoru působí na transkripci různých genů. Mezi geny, které jsou ovlivňované transkripčním faktorem TEAD1, patří geny řídící proliferaci, diferenciaci a apoptosu buněk. TEAD1 je také posledním článkem Hippo signalizační dráhy, která je v dospělosti aktivní a zabraňuje zvýšenému růstu orgánů. Důležité pro aktivitu transkripčního faktoru TEAD1 jsou posttranslační modifikace, jako je palmitoylace a fosforylace.

Pro zjištění celé struktury transkripčního faktoru TEAD1 a způsobu, jakým interaguje s DNA, byl v této práci rekombinantně připraven transkripční faktor TEAD1 expresí v buňkách bakterie *Escherichia coli*. Byly nalezeny vhodné podmínky produkce transkripčního faktoru TEAD1. Rovněž bylo provedeno štěpení histidinové kotvy thrombinem a nakonec byl připravený protein izolován a purifikován.

Klíčová slova:

TEAD1, transkripční faktor, rekombinantní exprese, purifikace proteinu

Abstract:

TEAD1 is one of the members of the TEAD transcription factor family. This transcription factor is very important, for example for development of organs. The structure of the entire TEAD1 transcription factor is not now yet known. Nevertheless, structure of two important domains are known. The TEA binding domain, which is important for the binding of the transcription factor TEAD1 to DNA, and the transactivation domain, to which coactivators bind. TEAD1 binds to DNA and upon coactivator bind it affects the transcription of various genes. Genes, that are affected by the transcription factor TEAD1 includes genes regulating proliferation, differentiation and apoptosis of cells. TEAD1 is also the target of the Hippo signalling pathway, which is active in adulthood and prevents abnormal growth of organs. Important for the activity of transcriptional factor TEAD1 are post-translation modifications, such as palmitoylation and phosphorylation.

To discover the entire structure of the transcriptional factor TEAD1 and the way it interacts with DNA, the transcriptional factor TEAD1 was prepared recombinationally by expression in cells of *Escherichia coli* bacteria. Suitable conditions for production of the transcriptional factor TEAD1 were found and the cleavage of the histidine tag by thrombin was performed. The prepared protein was then isolated and purified.

Keywords:

TEAD1, transcriptional factor, recombinant expression, protein purification

(In Czech)

Poděkování

Ráda bych poděkovala školiteli RNDr. Petru Novákovi Ph.D. za vedení bakalářské práce, cenné rady a čas, který mi věnoval. Také bych ráda poděkovala konzultantce Mgr. Růženě Liškové za trpělivost, vstřícnost, cenné rady a čas, který mi věnovala.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem členům laboratoře za přátelské prostředí a rady.

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. Úvod	11
1.1. Transkripční faktory	11
1.1.1. Zinkový prst	12
1.1.2. Leucinový zip	12
1.1.3. Homeodoména	13
1.2. Struktura transkripčního faktoru TEAD1	13
1.2.1. N-koncová oblast	14
1.2.2. TEA vazebná doména	14
1.2.3. Doména bohatá na prolin	16
1.2.4. Transaktivační doména	16
1.3. Koaktivátory	17
1.3.1. YAP a TAZ	17
1.3.2. Vgll	18
1.4. Transkripční faktory rodiny TEAD	19
1.3.1. TEAD1	19
1.3.2. TEAD2	20
1.3.3. TEAD3	20
1.3.4. TEAD4	20
1.5. Cílové geny pro TEAD rodinu transkripčních faktorů a jejich funkce	20
1.6. Regulace aktivity TEAD transkripčních faktorů Hippo signální dráhou	21
1.7. Regulace TEAD transkripčních faktorů posttranslačními modifikacemi	22
2. Cíl práce	24
3. Materiál a metody	25
3.1. Přístroje a chemikálie	25
3.1.1. Přístroje	25
3.1.2. Chemikálie	25

3.1.3.	Enzymy	27
3.1.4.	Bakteriální kmen	27
3.1.5.	Plasmidy.....	27
3.1.6.	Kity	28
3.1.7.	Pufry a média	28
3.2.	Metody	29
3.2.1.	Výběr plasmidu pro produkci transkripčního faktoru TEAD1	29
3.2.1.1.	Transformace	29
3.2.1.2.	Příprava stacionární kultury	29
3.2.1.3.	Test produkce.....	29
3.2.2.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS	30
3.2.3.	Elektropřenos na nitrocelulosovou membránu.....	30
3.2.4.	Nalezení vhodných podmínek produkce transkripčního faktoru TEAD1	31
3.2.4.1.	Výběr vhodné koncentrace induktoru (IPTG).....	31
3.2.4.2	Výběr vhodné teploty produkce	31
3.2.4.3.	Výběr vhodného produkčního času.....	32
3.2.5.	Purifikace transkripčního faktoru TEAD1	32
3.2.5.1.	Produkce transkripčního faktoru TEAD1 ve velkém objemu.....	32
3.2.5.2.	Afinitní chromatografie.....	33
3.2.6.	Štěpení histidinové kotvy.....	33
3.2.7.	Gelová permeační chromatografie	34
3.2.8.	Peptidové mapování	34
3.2.8.1.	Odbarvení gelu.....	34
3.2.8.2.	Promytí gelu.....	34
3.2.8.3.	Redukce disulfidických můstků a alkylace cysteinů.....	34
3.2.8.4.	Promývání a vysušení gelu.....	35
3.2.8.5.	Štěpení trypsinem v gelu.....	35

3.2.8.6.	Hmotnostně spektrometrická analýza	35
4.	Výsledky	36
4.1.	Výběr plasmidu pro produkci transkripčního faktoru TEAD1	36
4.2.	Nalezení vhodných podmínek produkce transkripčního faktoru TEAD1	37
4.2.1.	Výběr vhodné koncentrace induktoru (IPTG).....	37
4.2.2	Výběr vhodné teploty produkce	38
4.2.3.	Výběr vhodného produkčního času.....	39
4.3.	Purifikace transkripčního faktoru TEAD1	40
4.3.1.	Afinitní chromatografie.....	40
4.4.	Štěpení histidinové kotvy	42
4.5.	Gelová permeační chromatografie	43
4.6.	Peptidové mapování.....	44
5.	Diskuze	52
6.	Závěr	55

Seznam použitých zkratk

ATTS	další název pro TEA doménu (zkratka složena z prvních písmen proteinů, ve kterých byla nalezena: AbaA, TEF-1, Tec-1, Scalloped)
AXL	cílový gen proteinu TEAD1
bHLH	DNA vazebná doména helix-loop-helix (z anglického „basic helix-loop-helix“)
bZIP	DNA vazebná doména leucinový zip (z anglického „basic leucine zipper“)
CCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
CC doména	strukturní motiv proteinu YAP a TAZ, který se skládá ze dvou nebo více α -helixů
CTGF	cílový gen proteinu TEAD1 (z anglického „connective tissue growth factor“)
C-MYC	transkripční regulátor (z anglického „cellular myelocytomatosis“)
Cyr61	cílový gen proteinu TEAD1 (z anglického „cysteine-rich angiogenic inducer“)
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiothreitol
FT-ICR	hmotnostní analyzátor (z anglického „fourier transform Ion cyclotron resonance“)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
LC/MS čistota	dostatečná čistota pro kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií
MALDI	iontový zdroj pro hmotnostní spektrometr (z anglického „matrix assisted laser desorption ionization“)
M-CAT	specifická sekvence DNA, kterou váže TEAD rodina transkripčních faktorů (z anglického „muscle cytosine, adenine, thymine“)
MRTF	transkripční koaktivátor na který se váže transkripční faktor SRF v rakoviných fibroblastech (z anglického „myocardin related transcription factor“)
Ni-NTA	nosič pro afinitní chromatografii (Nikalnaté ionty jsou vázány přes nitrilotriocetovou kyselinu NTA)
PDZ	strukturní motiv v aktivační doméně proteinu YAP a TAZ, název je utvořen z prvních písmen proteinů, u kterých byl poprvé nalezen
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS
SRF	transkripční faktor, který se vyskytuje v rakoviných fibroblastech (z anglického „serum response factor“)
SV40	simian virus 40

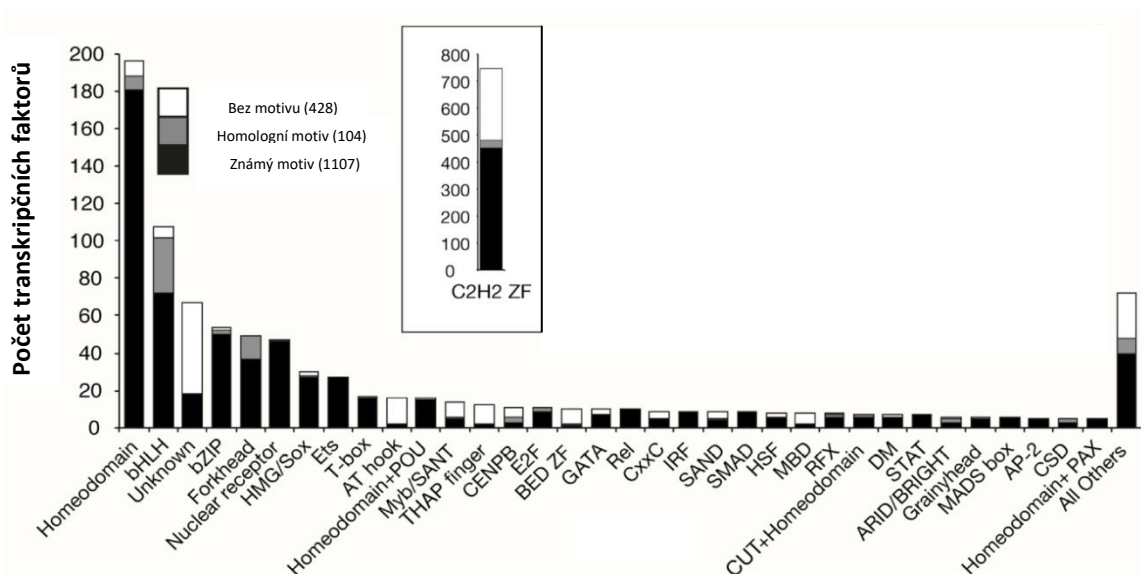
TAZ	koaktivátor TEAD proteinů (z anglického „transcriptional coactivator with PDZ-binding motif“)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TDU	tandemová doména Vgll proteinu
TEAD	rodina transkripčních faktorů obsahujících TEA doménu (z anglického „transcriptional enhancer aktivátor domain“)
TEF-1	další název pro TEAD1 (z anglického „transcriptional enhancer factor“)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan
Vg	Vestigial protein, koaktivátor Scallopedu u drosophily
Vgll	koaktivátor TEAD proteinů (z anglického „vestigial-like protein“)
WW doména	strukturní motiv proteinu YAP a TAZ, který obsahuje dva vysoce konzervované tryptofany
YAP	koaktivátor TEAD proteinů (z anglického „Yes-associated protein“)
ZF	struktura zinkového prstu vázající DNA (z anglického „zinc finger“)

1. Úvod

1.1. Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou proteiny, které rozeznávají specifické DNA sekvence a vážou se na ně. Touto vazbou ovlivňují transkripci a expresi různých genů. Jeden transkripční faktor může ovlivňovat expresi více genů. Mutace transkripčních faktorů nebo jejich vazebných míst způsobuje mnoho lidských onemocnění, např. rakovinu a vývojové vady¹.

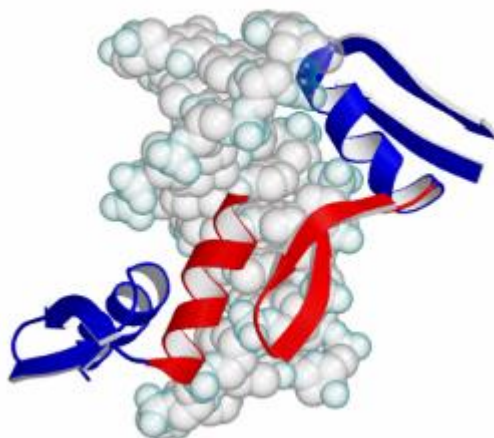
Základní rozdělení transkripčních faktorů je podle jejich DNA vazebné domény. DNA vazebná doména je důležitá pro vazbu transkripčního faktoru na cílovou sekvenci DNA. Zjištění struktury DNA vazebné domény a její vazby na DNA je velice důležité pro další zkoumání transkripčních faktorů². Transkripční faktory obsahující stejnou DNA vazebnou doménu a patřící tedy do jedné skupiny mají podobnou funkci v organismu. Mezi hlavní DNA vazebné domény patří zinkový prst (C2H2 ZF), homeodoména, helix-loop-helix (bHLH), leucinový zip (bZIP) a jaderné hormonální receptory (obr. 1). Nejvíce zastoupenou rodinou transkripčních faktorů je rodina obsahující zinkový prst jako DNA vazebnou doménu¹.



Obr. 1 – Počet známých členů jednotlivých rodin transkripčních faktorů k roku 2018. Nejvíce zastoupena je rodina transkripčních faktorů obsahující jako DNA vazebnou doménu zinkový prst (C2H2 ZF)¹.

1.1.1. Zinkový prst

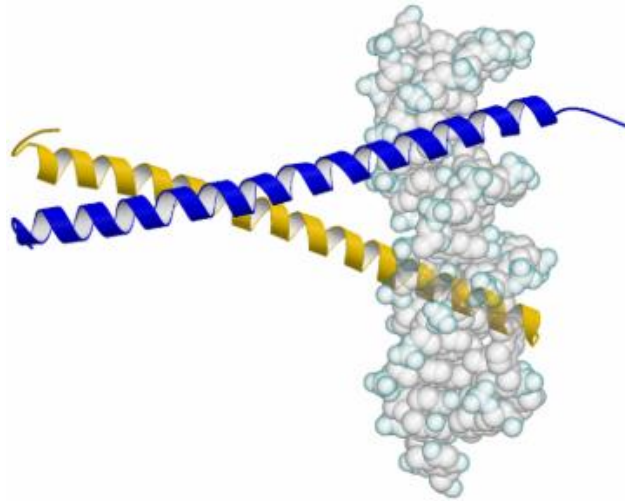
Zinkový prst se skládá z jednoho nebo dvou zinečnatých kationtů vázaných na cysteinové a histidinové zbytky. Zinkový prst se neuplatňuje pouze u vazby transkripčního faktoru na DNA, ale i u vazby proteinu na protein. Zinkový prst se váže do velkého žlábku DNA pomocí vodíkových můstků mezi bázemi DNA a aminokyselinami α -helixu. Struktury zinkových prstů jsou velice rozmanité, ale nejvíce zastoupenou strukturou je helix-turn-helix (HTH). Tento motiv se skládá ze tří α -helixů, které jsou propojeny β -otáčkou. Další velmi zastoupenou strukturou je $\beta\beta\alpha$ motiv, který se skládá ze dvou krátkých antiparalelních β -listů a α -helixu (obr. 2). V této struktuře je pouze jeden zinečnatý kationt koordinovaný přes dva histidinové a dva cysteinové zbytky α -helixu a β -listu³.



Obr. 2 – Struktura komplexu vazebného motivu zinkového prstu (zobrazen červeně) s DNA³

1.1.2. Leucinový zip

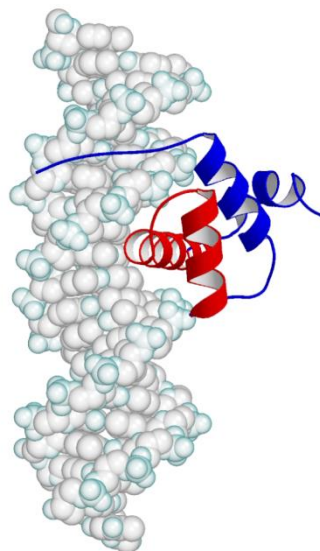
Strukturu vazebné domény leucinového zipu lze rozdělit na dvě podjednotky, jimiž jsou dimerizační oblast a DNA vázající oblast. Každá podjednotka leucinového zipu se skládá z jednoho α -helixu, který má délku přibližně 60 aminokyselin. DNA vázající oblast se nachází na N-konci a každá osmá aminokyselina je leucin nebo jiná hydrofobní aminokyselina. K dimerizaci dochází vytvořením spirálovitého vinutí 30 aminokyselin na C-konci každého α -helixu. DNA vázající oblast se váže do velkého žlábku DNA. Každá podjednotka se váže na dvoušroubovici z jedné strany (obr. 3, str. 13)³.



Obr. 3 – Struktura komplexu vazebného motívu leucínový zip s DNA³

1.1.3. Homeodoména

Rodina transkripčných faktorů obsahující homeodoménu je důležitá při vývoji a diferenciaci buněk. Homeodoména se skládá ze 4 α -helixů a nachází se u nich helix-turn-helix vazebná doména. Vazebná doména helix-turn-helix se váže na DNA do velkého žlábků pomocí druhého helixu, který musí být na povrchu proteinu přístupný pro interakci s DNA (obr. 4)³.

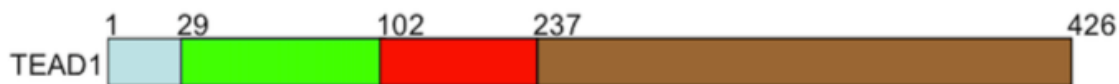


Obr.4 – Struktura komplexu vazebného motívu homeodomény (zobrazen červeně) s DNA³

1.2. Struktura transkripčního faktoru TEAD1

Transkripční faktor TEAD1 se skládá z N-koncové oblasti, TEA domény, domény bohaté na prolin a transaktivační domény (obr. 5, str. 14). Struktura N-koncové oblasti je velmi

proměnlivá a nebyla u ní vyřešena struktura. TEA doména je velmi konzervovaná a její struktura je známá, naopak doména bohatá na prolin nemá zjištěnou strukturu. Transaktivační doména je také velmi konzervovaná a její 3D struktura je známá i pro TEAD1⁴.



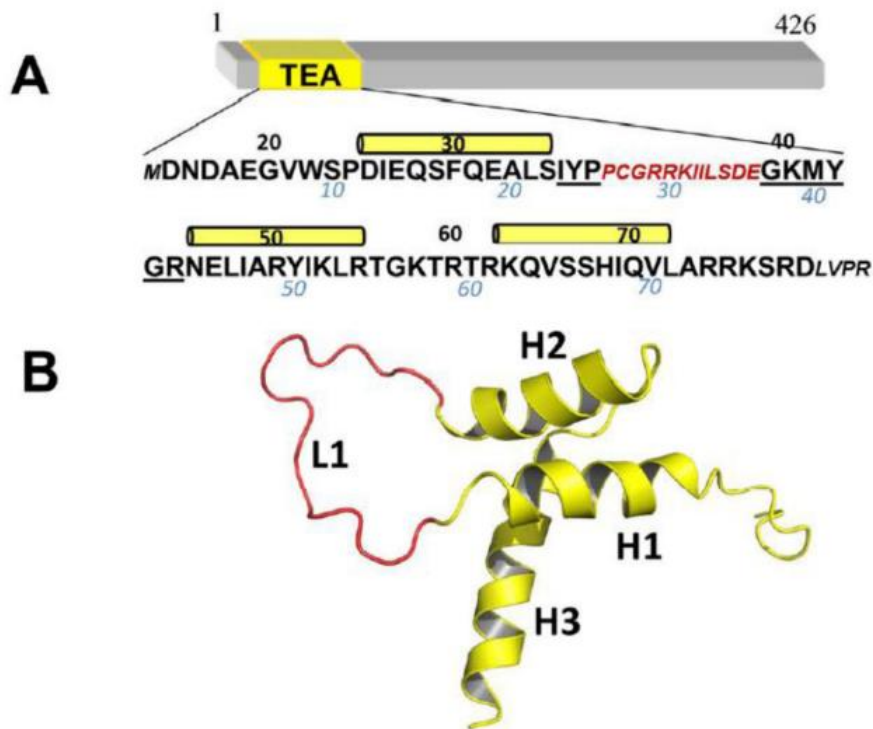
Obr. 5 – Schématická struktura transkripčního faktoru TEAD1 (světle modře je zobrazena N-koncová oblast, zeleně TEA doména, červeně doména bohatá na prolin a hnědě transaktivační doména)⁴

1.2.1. N-koncová oblast

Tato oblast u transkripčního faktoru TEAD1 obsahuje velké množství serinů, a má tedy záporný náboj. Aby docházelo k aktivaci transkripce, N-koncová oblast musí spolupracovat s oblastí bohatou na prolin a s transaktivační doménou⁴.

1.2.2. TEA vazebná doména

TEA vazebná doména je homologem homeodomény, která byla popsána v kapitole 1.1.3. Homeodoména. Vyskytuje se u transkripčních faktorů TEAD rodiny⁴, z nichž právě transkripční faktor TEAD1 byl produkován a purifikován v této práci. Vysoce evolučně konzervovaná TEA doména se skládá ze 77 aminokyselin a dříve byla nazývána ATTS doména podle proteinů, ve kterých byla poprvé nalezena. TEA doména má globulární strukturu skládající se ze tří α -helixů. Třetím α -helixem, který obsahuje tři seriny, se TEA doména váže na DNA⁴. Pokud jsou tyto seriny fosforylovány protein kinasami, dochází k zeslabení vazby na DNA⁵. TEA doména se váže na DNA s vysokou afinitou $K_d = 10^{-24}$ nM⁶. Struktura TEA domény byla zjištěna pomocí NMR (samotná TEA doména viz obr. 6, str. 15) a rentgenové krystalografie (v komplexu s DNA viz obr. 7, str. 16)⁶.



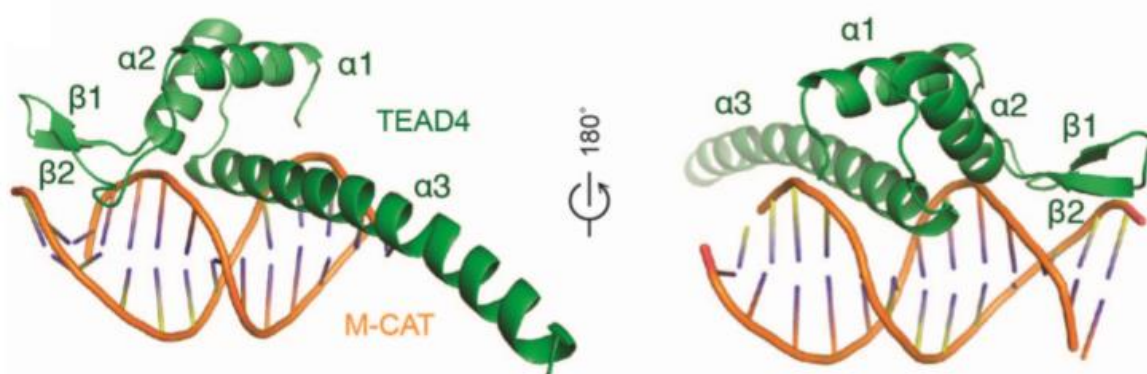
Obr. 6A – Aminokyselinová sekvence TEA domény v lidském transkripčním faktoru TEAD1⁶ Červeně je označena sekvence smyčky, která spojuje helixy 1 a 2. Černé číslování odpovídá číslování v celém transkripčním faktoru TEAD1 a modré číslování odpovídá číslování použité části transkripčního faktoru TEAD1 pro NMR měření⁶. 6B – Struktura TEA vazebné domény zjištěná pomocí NMR (červeně je znázorněna smyčka, která spojuje helixy 1 a 2)⁶

Pomocí dvou NMR struktur (jedné bez smyčky a druhé se smyčkou spojující helixy 1 a 2) bylo potvrzeno, že helix 3 je důležitý pro navázání na DNA, ale smyčka spojující helixy 1 a 2 je také velmi důležitá k zprostředkování kooperativní vazby k DNA, a pokud dojde k jejímu zkrácení, kooperativní vazba na DNA se zruší. Toto bylo zjištěno přípravou mutantu TEA vazebné domény, která měla zkrácenou smyčku spojující helixy 1 a 2. U takto připravených monomerů docházelo ke tvorbě dimerů, kde helix 1 byl zaměněn mezi monomery. V takovém dimeru nedocházelo právě ke kooperativní vazbě mutantních TEA vazebných domén na DNA. Proto se předpokládá, že by přechod mezi dimerní a monomerní formou mohl mít vliv na selektivitu vazby TEAD proteinů na DNA⁶. Již v roce 2006 byla pomocí NMR zjištěna struktura TEA vazebné domény⁷.

TEAD rodina transkripčních faktorů se váže na DNA sekvence zvané M-CAT elementy, jejichž název vychází z anglického „muscle cytosine, adenine, thymine“. M-

-CAT elementy mají sekvenci 5'-CATTCC-3'⁸. Členové TEAD rodiny se váží na dvouvláknovou DNA, nikoliv na jednovláknovou⁴.

Pro zjištění dalších informací o vazbě TEA domény na DNA byly purifikovány různé části TEA domény transkripčního faktoru TEAD4. Tyto části byly ponechány krystalizovat s různými fragmenty M-CAT elementu DNA. Nakonec byla získána krystalická struktura komplexu TEA domény s DNA viz obr. 7. Z této krystalické struktury bylo také zjištěno, že dochází ke konformační změně TEA domény při navázání na DNA. Bylo také zjištěno, že TEA doména se váže na dvě oddělená vazebná místa DNA, helix 3 se váže do velkého žlábků duplexu DNA a smyčka spojující helixy 1 a 2 se váže do malého žlábků. Z toho vyplývá, že je ke tvorbě komplexu TEA domény s DNA důležitý jak helix 3, tak i smyčka spojující helixy 1 a 2⁹.



Obr. 7 – Krystalická struktura komplexu TEA domény transkripčního faktoru TEAD4 s M-CAT elementem dvouvláknové DNA (TEA doména je znázorněna zeleně a DNA oranžově)⁹

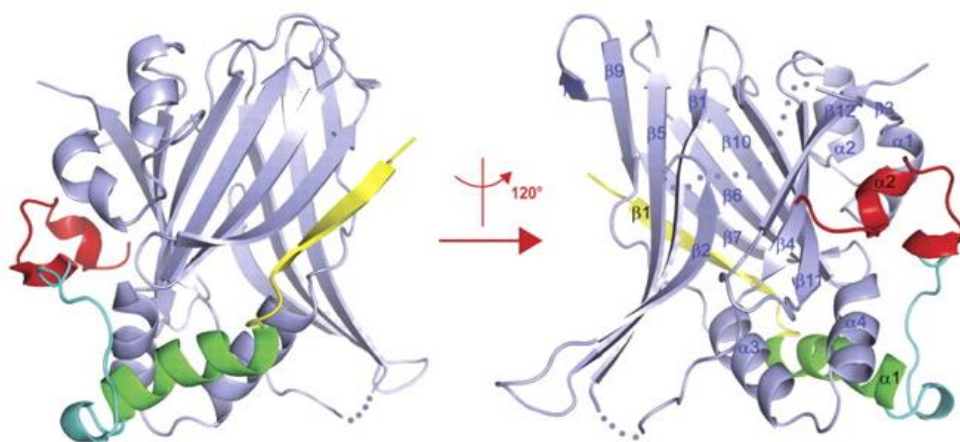
1.2.3. Doména bohatá na prolin

Tato doména je důležitá pro navázání koaktivátorů YAP/TAZ na transaktivační doménu a kvůli její odlišnosti u transkripčních faktorů TEAD rodiny dochází k rozdílným interakcím proteinů TEAD s YAP/TAZ. Pouze 20% této domény bohaté na prolin je stejných u myšího transkripčního faktoru TEAD1 a u myšího transkripčního faktoru TEAD4⁴.

1.2.4. Transaktivační doména

Samotné TEAD proteiny nejsou schopné aktivovat transkripci a potřebují koaktivátory, které se nemohou vázat na DNA, ale váží se na transkripční faktor a s ním pak mohou

aktivovat transkripci¹⁰. Velice důležitou částí TEAD transkripčních faktorů je transaktivační doména, která je vysoce konzervovaná, důležitá pro vazbu koaktivátorů a nachází se na C-konci⁴. Jsou již známé tři 3D struktury této transaktivační domény pro TEAD1,2 a TEAD4 (obr. 8). Mezi nejznámější koaktivátory vázající se na TEAD proteiny patří YAP (z anglického „Yes-associated protein“), TAZ (z anglického „transcriptional coactivator with PDZ-binding motif“), vgl proteiny a koaktivátor nukleárních receptorů p160. S pomocí těchto koaktivátorů hraje TEAD rodina transkripčních faktorů důležitou roli při fyziologických procesech a rakovině¹⁰.



Obr. 8 – Struktura komplexu YAP-transaktivační doména TEAD1 (transaktivační doména TEAD1 je zobrazena šedě a YAP je zobrazen barevně)¹¹

1.3. Koaktivátory

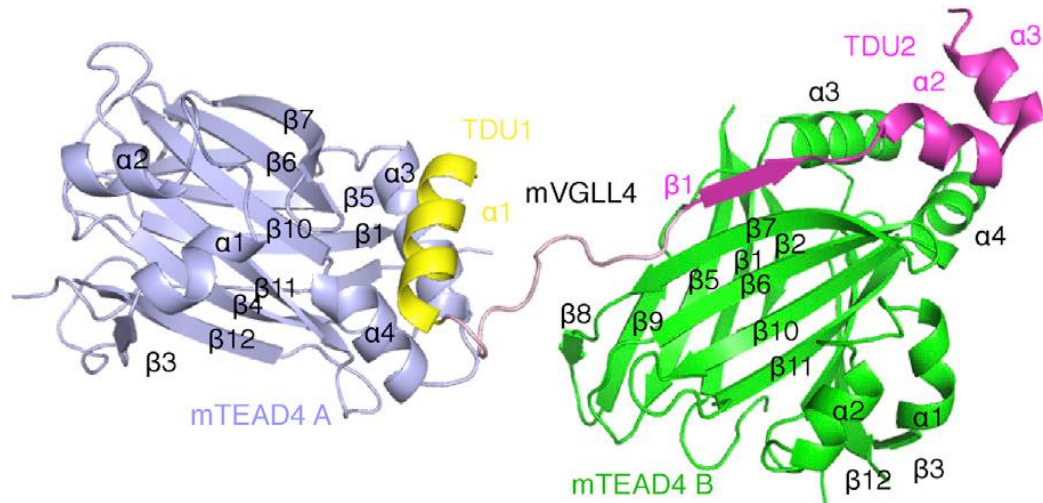
1.3.1. YAP a TAZ

YAP i TAZ se váží na TEAD proteiny svou TEAD vazebnou doménou, která se nachází na jejich N-konci. Obsahují také WW domény, které se nachází také na N-konci. Na C-konci je aktivační doména⁴. YAP byl nalezen u všech živočichů, ale TAZ byl nalezen pouze u obratlovců. YAP a TAZ jsou promotory proliferace buněk. Jejich vazbou s TEAD proteiny dochází k regulaci exprese několika různých růstových faktorů. Podle množství proteinu YAP dochází k regulaci velikosti orgánů. YAP a TAZ navázaný na TEAD proteiny jsou důležitými efekty Hippo signální dráhy¹². YAP protein hraje důležitou roli také v řízení apoptosy. Protože sám není schopen vázat se na DNA, potřebuje k této funkci proteiny TEAD. Pokud je proteinu YAP velké množství a váže se na TEAD, způsobuje

neregulovanou proliferaci buněk, zabraňuje apoptose a dochází k tvorbě nádorových onemocnění.¹³ Proto se stal komplex TEAD/YAP cílem pro léčbu rakoviny¹⁴. Látkou, jež zabraňuje vzniku nádorů v játrech, je verteporfin. Váže se na YAP-vazebnou doménu na TEAD proteinu, a zabraňuje tak vzniku komplexu YAP/TEAD¹⁴. Další látkou, která má schopnost se vázat na YAP vazebnou doménu, je kyselina flufonamová, jež se používá k léčbě zánětů. Také kyselina niflumová zabraňuje vazbě proteinu YAP na TEAD. Při vazbě těchto kyselin nedochází ke změně konformace TEAD proteinů¹⁵.

1.3.2. Vgll

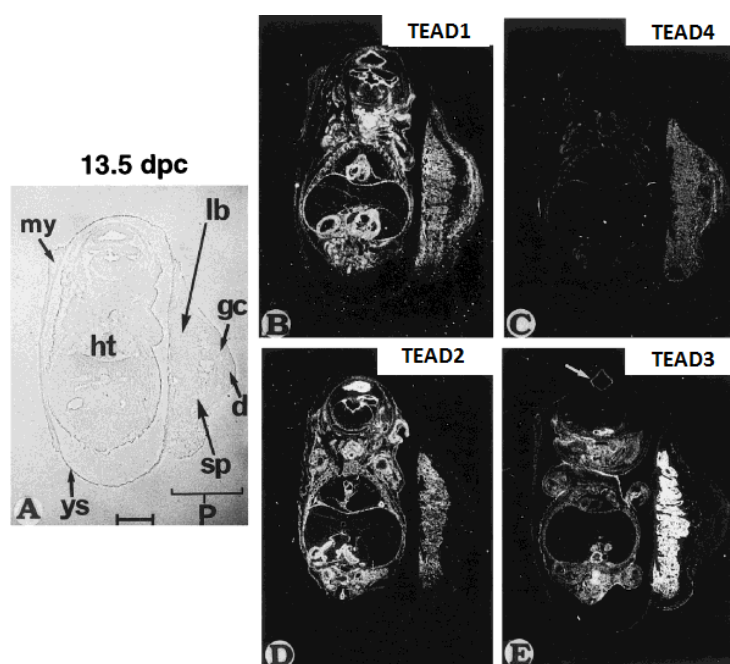
Vestigial-like (Vgll) proteiny jsou pojmenovány po transkripčním faktoru *Drosophily* Vestigial (Vg), který je důležitý pro regulaci růstu křídel. Vgll proteiny se váží na TEAD a spouštějí genovou expresi určitých genů¹². Vgll proteiny také svou vazbou na TEAD inhibují vznik komplexu YAP-TEAD, a tím potlačují vznik rakoviny¹⁰. Vgll soupeří s proteinem YAP o vazbu na TEAD. Jak je vidět na obr. 9, jedna molekula Vgll4 se váže na dvě molekuly TEAD4. Tandemová doména (TDU) Vgll proteinu dokáže bránit vzniku komplexu YAP/TEAD ještě lépe než celý Vgll protein. Proto byl navrhnout peptid zvaný super-TDU, který inhibuje vazbu proteinu YAP na TEAD¹⁶.



Obr. 9 – Celková struktura myšního Vgll4-Tead4 komplexu (TDU1 je žlutý a TDU2 růžový)¹⁶

1.4. Transkripční faktory rodiny TEAD

Do této rodiny u obratlovců patří čtyři členové transkripčních faktorů TEAD1, TEAD2, TEAD3 a TEAD4⁴. Jako první byl nalezen TEAD1 navázaný na enhancer viru SV40 v lidských HeLa buňkách.¹⁷ Každý člen TEAD rodiny je exprimován během vývoje v různých tkáních (obr. 10).



Obr. 10 – Exprese jednotlivých Tead proteinů v různých tkáních u myšičího embrya (A – histologický řez, P je placenta, my+d – buňky dělohy, ht – srdce, gc – buňky trofoblastu, sp – spongio trofoblast, lb – labyrintová vrstva trofoblastu, ys – žlutkový váček)¹⁸

1.3.1. TEAD1

TEAD1 reguluje vývoj srdečního svalu. Dále je TEAD1 důležitý pro regulaci vývoje a růstu kosterního svalstva, hladkého svalstva a nervové soustavy. TEAD1 je také důležitý pro diferenciaci myoblastu. TEAD1 se může vázat na M-CAT sekvenci v promotorech genů hladkého svalstva, α a β myosinu, kosterního svalstva a srdečního svalstva např. Troponinu T. Bylo zjištěno, že špatná funkce genu *Tead1* vede u myšičích embryí k srdečním onemocněním. U embryí je gen pro *Tead1* exprimován v myokardu. Exprese *Tead1* byla zjištěna v mnoha tkáních a orgánech, mezi ně patří srdce, plíce a placenta⁴.

1.3.2. TEAD2

TEAD2 je velmi silně exprimován během prvních sedmi dní vývoje myši a je velice důležitý pro vývoj mozku¹⁹. Exprese genu pro *Tead2* byla u myších embryí zjištěna v mozku, plicích a vaječnících. Bylo zjištěno, že TEAD proteiny se můžou ve svých funkcích zastupovat. Myši, které měly poškozený gen pro *Tead2*, se vyvíjely normálně, naopak myši s poškozeným genem pro *Tead1* i *Tead2* měly vývojové vady a některá embrya zemřela ještě před narozením⁴. TEAD2, který neobsahoval DNA vazebnou doménu, byl použit pro léčbu rakoviny a po navázání proteinu YAP nedocházelo k růstu nádorů. TEAD2 bez DNA vazebné domény byl produkován u mutantních myší a zastavil nadměrný růst jater a vznik nádorů¹⁴.

1.3.3. TEAD3

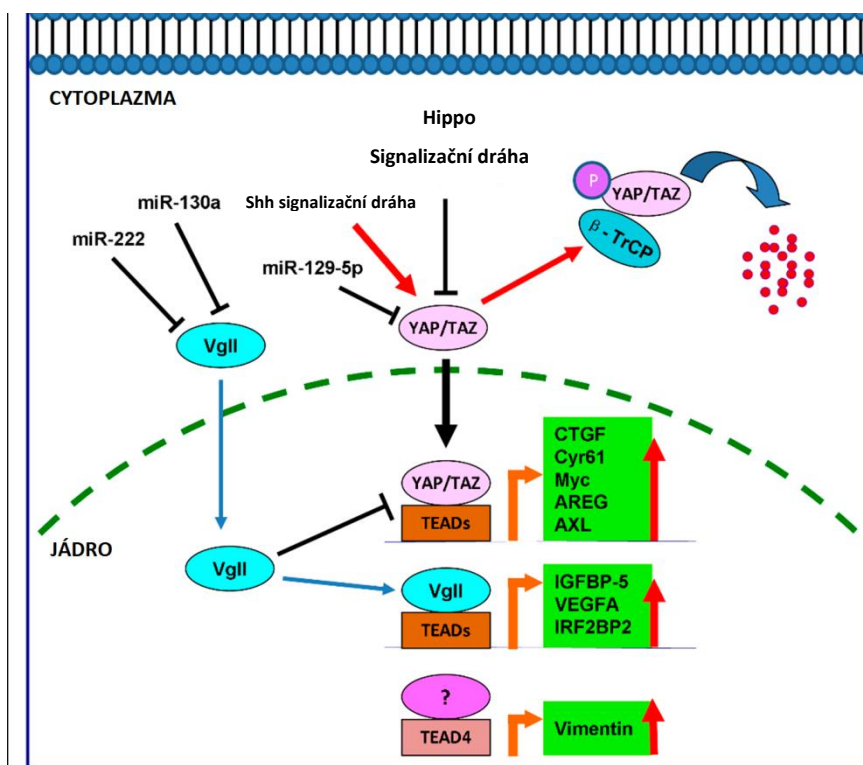
TEAD3 je poslední nalezený protein TEAD rodiny. Je exprimován v trofoblastu. Je jako jediný z rodiny TEAD exprimován až v pozdějším stádiu vývoje embrya, a to hlavně ve svalových a nervových buňkách¹⁸.

1.3.4. TEAD4

TEAD4 má vliv na diferenciaci buněk trofoektodermu na počátku vývoje embrya. U myších mutantních embryí, která měla gen pro *Tead4* poškozen, nedocházelo k vývoji blastocoel, diferenciaci buněk trofoektodermu a embrya umírala²⁰. Později je u myší *Tead4* exprimován hlavně v buňkách pankreatu, plic a kosterního svalstva²¹.

1.5. Cílové geny pro TEAD rodinu transkripčních faktorů a jejich funkce

Mezi první zjištěné cílové geny transkripčních faktorů rodiny TEAD patří *CTGF* a *Cyr61* (obr. 11, str. 21). Oba tyto proteiny ovlivňují proliferaci, diferenciaci a apoptosu. TAZ-TEAD aktivuje *CTGF* promotor, a tím spouští proliferaci buněk. Dalším genem, na který se může vázat komplex YAP-TEAD, a tím aktivovat expresi tohoto genu, je *AXL*. *AXL* podporuje tvorbu metastáz a zabraňuje apoptose. *C-MYC* je transkripční regulátor, který aktivuje spoustu cílových genů důležitých například pro proliferaci buněk. Jeho zvýšené množství bylo nalezeno u mnoha typů rakovin. Je také nezbytný pro růst buněk během vývoje. Společně s proteinem YAP způsobuje růst nádorů i u myší¹⁰.



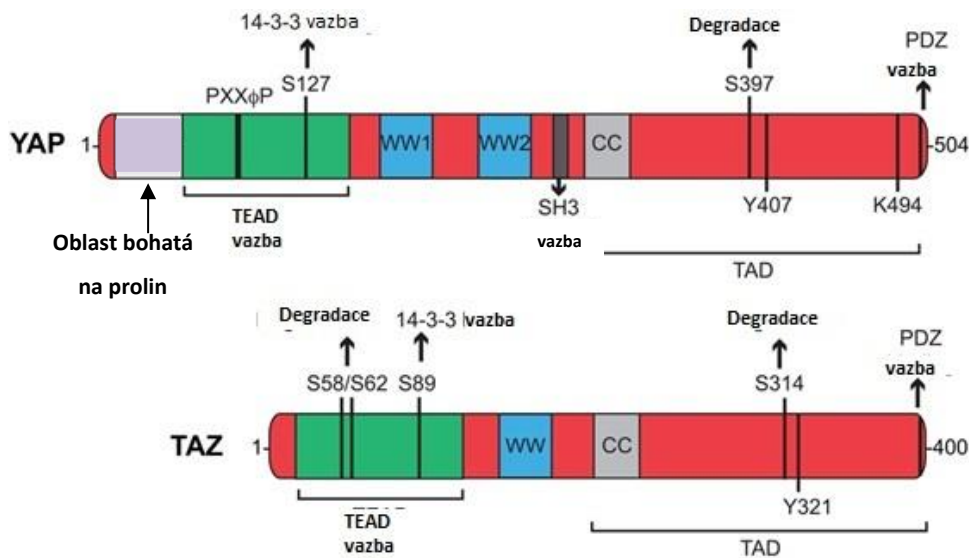
Obr. 11 – Regulační kroky rodiny transkripčních faktorů TEAD v rakovinných buňkách¹⁰
Čáry zakončené šipkami znázorňují aktivaci, naopak čáry zakončené rovně inhibici. Pokud se YAP/TAZ nebo Vgll proteiny vážou na TEAD, dochází k aktivaci transkripce. Pokud je na TEAD navázán YAP/TAZ, k navázání Vgll nedochází¹⁰.

Transkripční faktor SRF, který se váže na MRTF, se vyskytuje v rakovinných fibroblastech. Bylo zjištěno, že exprese cílových genů YAP-TEAD je závislá na MRTF-SRF a naopak. Cílové geny ovlivňované YAP-TEAD v lidských buňkách byly ovlivňovány MRTF-SRF v myších buňkách²².

1.6. Regulace aktivity TEAD transkripčních faktorů Hippo signální dráhou

Hippo signální dráha reguluje růst a diferenciaci buněk. TEAD je posledním článkem Hippo signální dráhy a nachází se v jádře. Pokud dochází v cytoplazmě k fosforylaci proteinu YAP na serinu 127, YAP se váže na protein 14-3-3, a je tak zabráněno vazbě na TEAD, a tedy nedochází k tvorbě komplexu. Pokud k fosforylaci nedochází, YAP se může dostat do jádra a tvořit s TEAD aktivní komplex. Stejně je to i s proteinem TAZ, u něhož dochází k fosforylaci serinu 89 a navázání na protein 14-3-3 (obr. 12, str. 22).

K fosforylaci dochází, pokud je Hippo signální dráha aktivní. Hippo signální dráha je aktivní v dospělosti a zabraňuje zvýšenému růstu orgánů a tvorbě nádorů²³.



Obr. 12 – Regulační domény efektorů Hippo signální dráhy YAP/TAZ²⁴

YAP i TAZ obsahují WW domény, CC domény, domény pro navázání transkripčních faktorů TEAD, domény pro aktivaci transkripce a PDZ domény. TAD je doména pro aktivaci transkripce. Fosforylaci proteinu YAP na serinu 127 dojde k navázání proteinu YAP na protein 14-3-3. Fosforylaci proteinu TAZ na serinu 89 dojde k navázání proteinu TAZ na protein 14-3-3. Pokud dojde k fosforylaci na jiných serinech uvedených na obrázku, dochází k degradaci proteinů YAP/TAZ²⁴.

1.7. Regulace TEAD transkripčních faktorů posttranslačními modifikacemi

Nově bylo zjištěno, že aktivita TEAD transkripčních faktorů je také regulována posttranslačními modifikacemi. Mezi tyto posttranslační modifikace patří fosforylace a palmitoylace. Protein kinasou A dochází k fosforylaci TEAD1 na serinu 102, a tím inhibuje schopnost TEAD1 vázat se na DNA. Také fosforylace protein kinasou C vede ke snížení schopnosti TEAD1 vázat se na DNA. Palmitoylace je důležitá pro stabilitu, správné sbalení a transkripční aktivitu TEAD proteinů²³. Palmitoylace je kovalentní modifikace, při níž dochází k připojení zbytku kyseliny palmitové na SH skupinu cysteinu. U proteinu TEAD1 dochází k navázání na cystein 344²⁵. K palmitoylaci TEAD proteinů dochází v savčích buňkách. Bylo zjištěno, že palmitoylace TEAD1 je důležitá pro vazbu YAP/TAZ. Pokud totiž k palmitoylaci nedošlo, velice se snížila schopnost vazby

YAP/TAZ na TEAD1, naopak schopnost vázat Vgll protein zůstala zachována. Účinek palmitoylace u TEAD proteinů není ještě úplně objasněn, ale je možné, že by se depalmitoylace mohla využít pro regulaci vazby TEAD koaktivátorů na TEAD, a tedy regulovat jeho aktivitu²³.

2. Cíl práce

- Nalezení vhodných podmínek produkce transkripčního faktoru TEAD1
- Nalezení vhodných podmínek štěpení histidinové kotvy thrombinem
- Izolace a purifikace transkripčního faktoru TEAD1

3. Materiál a metody

3.1. Přístroje a chemikálie

3.1.1. Přístroje

- Analytické váhy OHAUS Pioneer PA114C (OHAUS, USA)
- Automatické pipety (Gilson, USA)
- Centrifuga Avanti J-26 XP (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)
- Centrifugační koncentrátory (Millipore, USA)
- Detektor Spectrophotometric detector LCD 5000 (INGOS, ČR)
- Elektrody pro elektropřenos (Sigma-Aldrich, USA)
- Hmotnostní spektrometr 15T solariX XR s duálním zdrojem (Bruker Daltonics, Německo)
- Chromatografický systém NGC Quest 10 (Bio-Rad, USA)
- Kolona ENrich SEC 650 10 x 300 mm (Bio-Rad, USA)
- Magnetická míchačka IKA C-MAG HS10 digital (IKA, Německo)
- Ni-NTA kolona Bio-Scale Mini Nuvia IMAC Ni²⁺-Charged (Bio-Rad, USA)
- pH metr (Thermo Scientific, USA)
- Předvážky EMB (KERN, ČR)
- Pumpa Econo gradient pump (Bio-Rad, USA)
- Sonikační lázeň Sonorex digitec DT 1028 (BANDELIN, Německo)
- Sonikační sonda Ultrasonic Processor UP200S (Hielscher Ultrasonics, Německo)
- Souprava pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Spektrometr DeNovix DS-11 (DeNovix, USA)
- Termostat s třepačkou Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
- Vakuová odparka SpeedVac (Jouan, Francie)
- Vortex (VELP Scientifica, Itálie)
- Zdroj napětí MP-250 V (Clever Scientific Ltd, UK)

3.1.2. Chemikálie

- 1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)
- 1,4-dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

- Acetonitril (Merck, Německo)
- Agar (Oxoid, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Ampicilin (Jersey Lab Supply, USA)
- Azid sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Bacto-Trypton (Oxoid, USA)
- Bacto-Yeast extrakt (Oxoid, USA)
- Bromfenolová modř (Serva, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselná (Lach-ner, ČR)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Bio-Rad, USA)
- Dodekahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-ner, ČR)
- Ethanol (Lach-ner, ČR)
- Ethylmorfolin (Sigma-Aldrich, USA)
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol (Lach-ner, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Lach-ner, ČR)
- Hydroxid sodný (Lach-ner, ČR)
- Chloramfenikol (Jersey Lab Supply, USA)
- Chlorid draselný (Lach-ner, ČR)
- Chlorid sodný (Lach-ner, ČR)
- Imidazol (Sigma-Aldrich, USA)
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) (Sigma-Aldrich, USA)
- Kanamycin (Jersey Lab Supply, USA)
- Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina citronová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)
- Kyselina octová (Fluka, Švýcarsko)
- Leupeptin (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (Lach-ner, ČR)
- Monoklonální myšší Anti-polyhistidinová protilátka konjugovaná s peroxidasou (Sigma-Aldrich, USA)

- N,N-methylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- SeeBlue Pre-stained Protein standard (Life Technologies, USA)
- Sušené mléko (Bohemilk, ČR)
- Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris (Sigma-Aldrich, USA)
- Voda LC/MS čistota (Merck, Německo)

3.1.3. Enzymy

- Thrombin – Serinová proteasa thrombin z hovězí plazmy (Mr = 37000, c = 20 U/ml) (GE Healthcare Bio-Sciences, USA)
- Trypsin – Prasečí trypsin (Promega, USA)

3.1.4. Bakteriální kmen

- *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Stratagene, USA)
Genotyp: F⁻ *ompT hsdS*(r_B- m_B-) *dcm*⁺ Tet^r *gal λ*(DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam*^r] [*argU ileY LeuW Strep/Spec*^r]

3.1.5. Plasmidy

- pGEX – DNA sekvence TEAD1 vložena mezi restrikční místa *NdeI* a *EcoRI*
5'-ATTGAGCCCCAGCAGCTGGAGCGGCAGTGAGAGCCCTGCCGAAAACATGGAAAGGATGAGTGACTCTGCAGATAAGCCAA
TTGACAAATGATGCAGAAAGGGTCTGGAGCCCCGACATCGAGCAAAGCTTTCAGGAGGCCCTGGCTATCTATCCACCATGTGG
GAGGAGGAAAATCATCTTATCAGACGAAAGGCAAATGTATGGTAGGAATGAATTGATAGCCAGATACATCAAACCTCAGGACAG
GCAAGACGAGGACCAGAAAACAGGTGTCTAGTCACATTCAGGTTCTTGCCAGAAGGAAATCTCGTGATTTTCATTCCAAGCTA
AAGGATCAGACTGCAAAGGATAAAGCCCTGCAGCACATGGCGGCCATGTCTCAGCCCAGATCGTCTCGGCCACTGCCATT
CATAACAGCTGGGGCTGCCTGGGATTCCACGCCCCGACCTTCCCAGGGGCGCCGGGGTTCTGGCCGGGAATGATTCAAACA
GGGCAGCCAGGATCCTCACAAAGACGTCAAGCCTTTTGTGCAGCAGGCCTACCCATCCAGCCAGCGGTACAGCCCCCATT
CCAGGGTTTGAGCCTGCATCGGCCCCAGCTCCCTCAGTCCCTGCCTGGCAAGGTGCTCCATTGGCACAACCAAGCTTCGC
CTGGTGGAAATTTTCAGCTTTTCTCGAGCAGCAGCGAGACCCAGACTCGTACAACAAACACCTCTTCTGTCACATTGGGCATG
CCAACCTTCTTACAGTGACCCATTGCTTGAATCAGTGGACATTCGTGAGATTTATGACAAATTTCTGAAAAGAAAGGTGGCT
TAAAGGAACTGTTTGGAAAGGGCCCTCAAATGCCTTCTTCTCGTAAATTTCTGGGCTGATTTAAACTGCAATATTCAGATG
ATGCTGGGGCTTTTATGGTGTAAACAGTCAGTACGAGAGTTCTGAAAATATGACAGTACCTGTTCCACCAAAGTTTGTCTC
TTTGGGAAGCAAGTAGTAGAAAAAGTAGAGACGGAGTATGCAAGGTTTGAAGATGGCCGATTGTATACCGAATAAACCGCTC
CCAATGTGTGAATATATGATCAACTTCATCCACAAGCTCAAACACTTACCAGAGAAATATATGATGAACAGTGTGTTTGGAAAA
CTTCACAATTTTATGGTGGTAACAACAGGGATACACAAGAACTCTACTCTGCATGGCCTGTGTGTTTGAAGTTTCAAATAG
TGAACACGGAGCACA ACATCATATTTACAGGCTTGTAAAGGACTGA-3'

Plasmid byl připraven RNDr. Hynkem Mrázkem, Ph.D.

- pET-28a(+) – DNA sekvence TEAD1 vložena mezi restrikční místa *NdeI* a *EcoRI*
5'-ATTGAGCCCCAGCAGCTGGAGCGGCAGTGAGAGCCCTGCCGAAAACATGGAAAGGATGAGTGACTCTGCAGATAAGCCAA
TTGACAAATGATGCAGAAAGGGTCTGGAGCCCCGACATCGAGCAAAGCTTTCAGGAGGCCCTGGCTATCTATCCACCATGTGG
GAGGAGGAAAATCATCTTATCAGACGAAAGGCAAATGTATGGTAGGAATGAATTGATAGCCAGATACATCAAACCTCAGGACAG
GCAAGACGAGGACCAGAAAACAGGTGTCTAGTCACATTCAGGTTCTTGCCAGAAGGAAATCTCGTGATTTTCATTCCAAGCTA
AAGGATCAGACTGCAAAGGATAAAGCCCTGCAGCACATGGCGGCCATGTCTCAGCCCAGATCGTCTCGGCCACTGCCATT
CATAACAGCTGGGGCTGCCTGGGATTCCACGCCCCGACCTTCCCAGGGGCGCCGGGGTTCTGGCCGGGAATGATTCAAACA
GGGCAGCCAGGATCCTCACAAAGACGTCAAGCCTTTTGTGCAGCAGGCCTACCCATCCAGCCAGCGGTACAGCCCCCATT

CCAGGGTTTGAGCCTGCATCGGCCCCAGCTCCCTCAGTCCCTGCCTGGCAAGGTCGCTCCATTGGCACAACCAAGCTTCGC
CTGGTGGAATTTTCAGCTTTTCTCGAGCAGCAGCGAGACCCAGACTCGTACAACAAACACCTCTTCGTGCACATTGGGCATG
CCAACCATTCTTACAGTGACCCATTGCTTGAATCAGTGGACATTCGTGAGATTTATGACAAAATTTCTGAAAAGAAAGGTGGCT
TAAAGGAACTGTTTGGAAAGGGCCCTCAAATGCCTTCTCCTCGTAAAATTCTGGGCTGATTTAACTGCAATATTTCAAGATG
ATGCTGGGGCTTTTTATGGTGTAAACAGTCAGTACGAGAGTTCTGAAAATATGACAGTCACCTGTTCCACCAAAGTTTGTCTCC
TTTGGGAAGCAAGTAGTAGAAAAGTAGAGACGGAGTATGCAAGGTTTGAGAATGGCCGATTGTATACCGAATAAACCGCTC
CCCAATGTGTGAATATATGATCAACTTCATCCACAAGCTCAAACACTTACCAGAGAAATATATGATGAACAGTGTTTTGGAAAA
CTTCACAATTTTATTGGTGGTAACAAACAGGGATACACAAGAACTACTCTGCATGGCCTGTGTGTTGAAGTTTCAAATAG
TGAACACGGAGCACA ACATCATATTTACAGGCTTGTAAAGGACTGA-3'

Plasmid byl připraven Mgr. Růženou Liškovou²⁶.

3.1.6. Kity

- Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA)

3.1.7. Pufry a média

- 30% akrylamidová směs pro SDS-PAGE
70% (v/v) H₂O, 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N,N-methylen-bis-akrylamid
- Barvicí roztok pro gely po SDS-PAGE
45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
- Ethylmorfolinový pufr – 100mM ethylmorfolin, pH 8,4
- LB Agar
1,25% (w/v) agar, 1% (w/v) bacto-trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) bacto-yeast extrakt, sterilizováno
- LB médium
1% (w/v) bacto-trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) bacto-yeast extrakt, pH = 7,4, sterilizováno
- Odbarvovací roztok pro gely po SDS-PAGE
55% (v/v) H₂O, 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová
- PBS pufr – 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH 7,4, sterilizováno
- Roztok protilátky pro imunodetekci – 1:4000 (v/v) monoklonální myší protilátka konjugovaná s peroxidasou v PBS pufru
- TGS (Tris-Glycin-SDS) pufr
10 mM Tris, 250 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE
100 mM DTT, 50 mM Tris, 12% (v/v) glycerol, 4% (v/v) SDS, 0,1% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8

3.2. Metody

3.2.1. Výběr plasmidu pro produkci transkripčního faktoru TEAD1

Nejprve byly použity dva plasmidy: vektory pGEX a pET-28a(+), do kterých byl vložen gen kódující lidský protein TEAD1. Těmito dvěma plasmidy byly transformovány bakterie *E. coli* kmene BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL.

3.2.1.1. Transformace

Buňky *E. coli* byly ponechány z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rozmraznout na ledu. Poté bylo k této 100 μl buněčné suspenzi přidáno 0,3 μl roztoku plasmidu pGEX o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A stejné množství plasmidu pET-28a(+) bylo přidáno do druhé 100 μl buněčné suspenze. Po přidání plasmidu byla směs ponechána 20 minut inkubovat na ledu a byl proveden teplotní šok při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 sekund. Dále byl rychle přidán 1 ml sterilního LB média a buňky byly ponechány inkubovat při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dobu 1 h a při třepání 550 rpm. Po této inkubaci byly buněčné suspenze centrifugovány po dobu 4 min při $1\ 600\times\text{ g}$. Bylo odebráno 900 μl supernatantu a ve zbytku byla resuspendována vzniklá peleta. Z této buněčné suspenze bylo 30 μl nanášeno a rozetřeno na petriho misku s LB agarem. LB agar, na který byly nanášeny buňky s plasmidem pGEX, obsahoval ampicilin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a chloramfenikol (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a LB agar, na který byly nanášeny buňky s plasmidem pET-28a(+) obsahoval kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a chloramfenikol (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Misky byly ponechány inkubovat přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.2. Příprava stacionární kultury

Další den byly z každé misky vybrány čtyři kolonie, přeneseny do zkumavek se 2 ml sterilního LB média s příslušnými antibiotiky a ponechány inkubovat za stálého třepání přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.3. Test produkce

Pro každý plasmid bylo připraveno 8 zkumavek, které obsahovaly 1 ml sterilního LB média s příslušnými antibiotiky. Z každé zkumavky se stacionární kulturou bylo dvakrát odebráno 5 μl kultury a přidáno k 1 ml sterilního LB média s příslušnými antibiotiky. Všech šestnáct zkumavek se nechalo třepat (250 otáček/min) po dobu 1,5 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do osmi zkumavek označených + bylo přidáno IPTG tak, aby koncentrace v celém objemu byla 1 mM, a dalších osm zkumavek s buněčnou kulturou označených – nebylo

indukováno a sloužilo jako kontrola. Všechny zkumavky byly ponechány inkubovat při teplotě 30 °C po dobu 3 h za stálého třepání (250 otáček/min). Dále byly buněčné kultury centrifugovány po dobu 5 min při 3000× g a vzniklá peleta byla resuspendována ve 100 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu.

3.2.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS

Byly připraveny polyakrylamidové gely, které se skládaly z 10% separačního gelu a 5% zaostřovacího gelu. Složení separačního a zaostřovacího gelu je uvedeno v tabulce 1. Vzorky byly se vzorkovým pufrem 5 minut povařeny a poté 5 minut centrifugovány při 8000× g. Do první jamky bylo nanášeno 5 µl standardu obsahujícího proteiny o známé molekulové hmotnosti a do dalších jamek bylo nanášeno 10 µl vzorků. Pro zaputování do zaostřovacího gelu probíhala elektroforéza při konstantním proudu 15 mA na jeden gel o rozměrech 8,5×7,5×0,1 cm. Po zaputování elektroforéza probíhala při konstantním proudu 25 mA na jeden gel o rozměrech 8,5×7,5×0,1 cm. Souprava pro SDS-PAGE byla naplněna TGS (Tris-Glycin-SDS) pufrem.

Tab. 1 – Složení gelů pro SDS-PAGE

Složky	Objem [ml]	
	10% separační gel	5% zaostřovací gel
H ₂ O	1,9	0,68
30% akrylamidová směs	1,7	0,17
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	0,13
10% Dodecylsírán sodný (SDS)	0,05	0,01
Teramethylendiamin (TEMED)	0,002	0,001
10% Peroxodisírán amonný (APS)	0,05	0,01

Po skončení elektroforézy byly dva gely použity pro elektropřenos na nitrocelulosovou membránu a další dva byly barveny barvicím roztokem Coomassie Brilliant Blue po dobu 10 minut. Poté byl gel odbarven odbarvovacím roztokem a bylo možné odečíst přibližné molekulové hmotnosti proteinů porovnáním se standardem o známé molekulové hmotnosti.

3.2.3. Elektropřenos na nitrocelulosovou membránu

Gely po elektroforéze byly společně s filtračními papíry a nitrocelulosovou membránou namočený do TGS (Tris-Glycin-SDS) pufru s 20 % methanolem a naskládány mezi elektrody. Po dobu 1,5 hodiny docházelo k elektropřenosu proteinů z gelu na membránu za

konstantního proudu 0,8 mA na 1 cm² membrány. Po skončení elektropřenosu byla volná místa na membráně blokována 1 % roztokem sušeného odtučněného mléka v PBS pufru. Toto blokování probíhalo 20 h a poté byla membrána promyta PBS pufrem 4× 10 minut. Po dokonalém vymytí roztoku sušeného mléka byly přidány myší protilátky proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidasou. Po 90 minutách byly membrány opět promyty PBS pufrem 3× 10 minut. Místa přítomnosti protilátky byla detekována pomocí ECL kitu. Membrány byly pokryty směsí roztoků peroxidu vodíku a luminolu v poměru 1:1. Byla pořízena fotodokumentace luminescence.

3.2.4. Nalezení vhodných podmínek produkce transkripčního faktoru TEAD1

3.2.4.1. Výběr vhodné koncentrace induktoru (IPTG)

Plasmid pET-28a(+) byl transformován do buněk bakterie *E. Coli* kmene BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL stejným způsobem jako v kapitole 3.2.1. Po vybrání jedné kolonie z agaru, přenesením do sterilního LB média a inkubaci přes noc při 37 °C ve sterilním LB médiu s antibiotiky kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml) bylo připraveno 7 zkumavek s 1 ml sterilního LB média s příslušnými antibiotiky. Do každé bylo přidáno 50 µl buněčné kultury. Zkumavky byly ponechány za stálého třepání rychlostí 250 otáček/min po dobu 1,5 hodiny při 37°C. Poté bylo přidáno rozdílné množství IPTG tak, aby koncentrace byly v každé zkumavce rozdílné. Byly testovány koncentrace IPTG ve zkumavkách 0 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM. Po indukci byly kultury inkubovány při 37 °C po dobu 3 h při stálém třepání rychlostí 250 otáček/min. Poté byly kultury centrifugovány při 3000× g po dobu 5 minut. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 100 µl vzorkového pufru na SDS elektroforézu. Všechny vzorky byly poté analyzovány pomocí SDS elektroforézy tak, jak je uvedeno v kapitole 3.2.2. Byl také proveden elektropřenos a imunodekce tak, jak je popsáno v kapitole 3.2.3.

3.2.4.2 Výběr vhodné teploty produkce

Jako u předchozího výběru bylo do 3 zkumavek s 1 ml sterilního LB média a příslušnými antibiotiky přidáno 50 µl kultury transformovaných buněk BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Zkumavky byly ponechány 1,5 hodiny třepat rychlostí 250 otáček/min při 37 °C a poté byly jednotlivé zkumavky vytemperovány na 25 °C, 30 °C a 37 °C. Bylo přidáno IPTG tak, aby jeho koncentrace ve zkumavce byla 0,2 mM. Zkumavky byly ponechány třepat 3 h při těchto teplotách rychlostí třepání 250 otáček/min. Poté byly kultury centrifugovány při

3000× g po dobu 5 minut. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 100 µl vzorkového pufru na SDS elektroforézu. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí (kap. 3.2.2. a 3.2.3).

3.2.4.3. Výběr vhodného produkčního času

Jako u předchozích výběrů bylo do 6 zkumavek s 1 ml sterilního LB média a příslušnými antibiotiky přidáno 50 µl kultury transformovaných buněk BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Zkumavky byly ponechány 1,5 hodiny třepat rychlostí 250 otáček/min při 37°C. Bylo přidáno IPTG tak, aby jeho koncentrace ve zkumavce byla 0,2 mM. Byly testovány produkční časy 1, 2, 3, 6, 8 a 18 hodin. Zkumavky byly ponechány třepat při 37 °C rychlostí třepání 250 otáček/min po dobu těchto časů. Poté byly kultury centrifugovány při 3000× g po dobu 5 minut. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 100 µl vzorkového pufru na SDS elektroforézu. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí (kap. 3.2.2. a 3.2.3).

3.2.5. Purifikace transkripčního faktoru TEAD1

3.2.5.1. Produkce transkripčního faktoru TEAD1 ve velkém objemu

Plasmid pET-28a(+) byl transformován do buněk bakterie *E. Coli* kmene BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL stejným způsobem jako v kapitole 3.2.1.1. Byla vybrána jedna kolonie z agaru a přenesena do 100 ml sterilního LB média s antibiotiky kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml). Tato buněčná kultura byla ponechána inkubovat 16 h při 37 °C. Dále produkce probíhala v osmi Erlenmayerových baňkách o objemu 2 l, které obsahovaly 0,5 l sterilního LB média s příslušnými antibiotiky. Do každé z Erlenmayerových baňek bylo přidáno 5 ml buněčné kultury. Erlenmayerovy baňky byly ponechány třepat rychlostí 250 otáček/min při 37°C. Během třepání byla měřena optická denzita buněčné suspenze při 600 nm, která když dosáhla hodnoty 0,6, byla provedena indukce IPTG tak, aby koncentrace v celkovém objemu byla 0,2 mM. Poté byly Erlenmayerovy baňky dále třepány rychlostí 250 otáček/min po dobu 1 h při 37 °C. Nakonec byly buněčné kultury centrifugovány po dobu 15 minut při 3000× g a 4 °C. Pelety byly ponechány přes noc při 4 °C. Další den byla peleta resuspendována ve 20 ml pufru A pro afinitní chromatografii (složení pufrů na afinitní chromatografii viz. Tab. 2, str. 33 v kapitole 3.2.5.2.). Na 0,5 l média bylo použito 20 ml pufru. Také byly přidány inhibitory proteas, přesněji 4 µl 10mM PMSF a 100 µl 0,4 mM leupeptinu, které byly přidány do 40 ml pufru. Vzniklé suspenze byly sonikací lyzovány 3× 5 minut na ledu. Poté

byl buněčný lyzát centrifugován 20 minut při 4 °C při 40000× g. Supernatant byl ihned oddělen od pelety a sloužil jako vzorek, s nímž se dále pracovalo.

3.2.5.2. Afinitní chromatografie

K afinitní chromatografii byla použita kolona s Ni-NTA nosičem. Průtok mobilní fáze po celou dobu afinitní chromatografie byl 1 ml/min. Nejprve byla kolona promyta po dobu 15 minut pufrém A. Na kolonu byl nanesen celý supernatant. Kolona byla promyta pufrém A. Byla měřena absorbance při 280 nm vycházejícího roztoku. Když hodnota absorbance klesla na nulu, byla kolona promývána pufrém B po dobu 20 minut. Poté byla kolona promývána pufrém C, který obsahoval větší koncentraci imidazolu. Všechna kapalina vytékající z kolony byla zachytávána tak, že vznikly frakce při nanášení vzorku a frakce při eluci. Z těchto frakcí bylo odebráno 10 µl a k nim bylo přidáno 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí (popsány v kapitolách 3.2.2. a 3.2.3)

Tab. 2 – Složení pufrů pro afinitní chromatografii

Pufr	pH	Složení			
Pufr A	6,6	0,01 M kys. Citronová	0,07 M Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	1 mM 2-merkptoethanol	-
Pufr B	6,6	0,01 M kys. Citronová	0,07 M Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	1 mM 2-merkptoethanol	30 mM imadazol
Pufr C	6,6	0,01 M kys. Citronová	0,07 M Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	1 mM 2-merkptoethanol	0,5 M imidazol

3.2.6. Štěpení histidinové kotvy

Vybraná frakce z afinitní chromatografie, jež obsahovala protein TEAD 1, byla rozdělena na dva vzorky po 3 ml. Do obou vzorků byl přidán thrombin tak, aby jeho aktivita v roztoku činila 1 U/mg proteinu. Jeden vzorek s thrombinem byl ponechán v lednici (4 °C) a druhý při pokojové teplotě (25 °C). Z těchto dvou vzorků s přidáním thrombinem bylo odebíráno 40 µl po uplynutí 1 hodiny, 2 hodin, 4 hodin, 8 hodin a 20 hodin. Hned k nim bylo přidáno 10 µl 5× koncentrovaného vzorkového pufru. Takto připravené vzorky byly ihned se vzorkovým pufrém povařeny po dobu 5 minut a dány zmrazit. Další den byly takto připravené vzorky analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí (popsány v kapitolách 3.2.2. a 3.2.3)

3.2.7. Gelová permeační chromatografie

Dalším krokem purifikace byla gelová permeační chromatografie, která byla využita pro oddělení transkripčního faktoru TEAD1 od oddělené histidinové kotvy a dalších bakteriálních proteinů. Byla použita kolona ENrich SEC 70 10×300 mm. Dva vzorky po odštěpení histidinové kotvy a jeden vzorek s histidinovou kotvou byly koncentrovány pomocí centrifugačního koncentrátoru s membránou o velikosti pórů 10 kDa. Koncentrátor se vzorkem byl centrifugován při 3000× g do té doby, než objem vzorku činil 800 μl. Kolona i dávkovací smyčka o objemu 1 ml byly nejprve promyty pufrům o složení 0,01M kyselina citronová, 0,07 M Na₂HPO₄×12H₂O a 1 mM 2-merkptoethanol, pH 6,6. Poté byl nanesen vzorek při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Pokud absorbance při 280 nm přesáhla hodnotu 0,01, byly frakce jímány do připravených zkumavek. Z těchto frakcí bylo vždy odebráno 10 μl vzorku a přidáno 10 μl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Takto připravené vzorky byly poté analyzovány pomocí SDS elektroforézy (popsáno v kapitolách 3.2.2.). Gelová permeační chromatografie byla provedena pro všechny tři vzorky samostatně.

3.2.8. Peptidové mapování

3.2.8.1. Odbarvení gelu

Proužky proteinů na gelu po SDS elektroforéze byly nejprve vyříznuty skalpelem, nasekány na malé kostky 1×1 mm a přeneseny do zkumavek, kde byly převrstveny 50 μl ethylmorfolinového pufru a 50 μl acetonitrilu. Zkumavky s tímto roztokem byly sonikovány do doby, než došlo k úplnému odbarvení kostek gelu.

3.2.8.2. Promytí gelu

Poté byl odbarvovací roztok odstraněn a bylo přidáno 30 μl acetonitrilu pro vysušení gelu. Po úplném zbělení gelu byl acetonitril odsán a bylo přidáno 30 μl ethylmorfolinového pufru. Ten byl ponechán po dobu 5 minut. Tento postup byl opakován ještě dvakrát. Takto promyté kousky gelu byly ponechány na vzduchu vyschnout.

3.2.8.3. Redukce disulfidických můstků a alkylace cysteinů

K vysušeným gelům bylo přidáno 40 μl 20 mM Tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP). Poté byly zkumavky zahřívány po dobu 3 minut při 70 °C. Roztoky byly pipetou odstraněny a bylo přidáno 30 μl acetonitrilu. Zkumavky byly sonikovány do doby, než došlo ke zbělení

gelů. Roztoky byly opět pipetou odstraněny. Poté byla provedena reakce po dobu 30 minut ve tmě s přidáním 50 μ l 50 mM iodacetamidu v ethylmorfolinovém pufru.

3.2.8.4. Promývání a vysušení gelu

3 \times byly gely promývány střídavě ethylmorfolinovým pufrům a acetonitrilem. Vždy byly roztoky sonikovány a pipetou odstraněny. Nakonec bylo ke gelům přidáno 20 μ l ethylmorfolinového pufru a 20 μ l acetonitrilu. Gely byly ponechány vysušit po dobu 30 minut ve vakuové odparce.

3.2.8.5. Štěpení trypsinem v gelu

K vysušeným gelům bylo přidáno 100 μ l ethylmorfolinového pufru s 10 % acetonitrilem o pH 8,3 a 1 μ l trypsinu. Výsledná koncentrace trypsinu byla tedy 1 μ g/ μ l. Směs byla inkubována přes noc při 37°C. Peptidy byly poté uvolněny z gelů sonikací po dobu 20 minut.

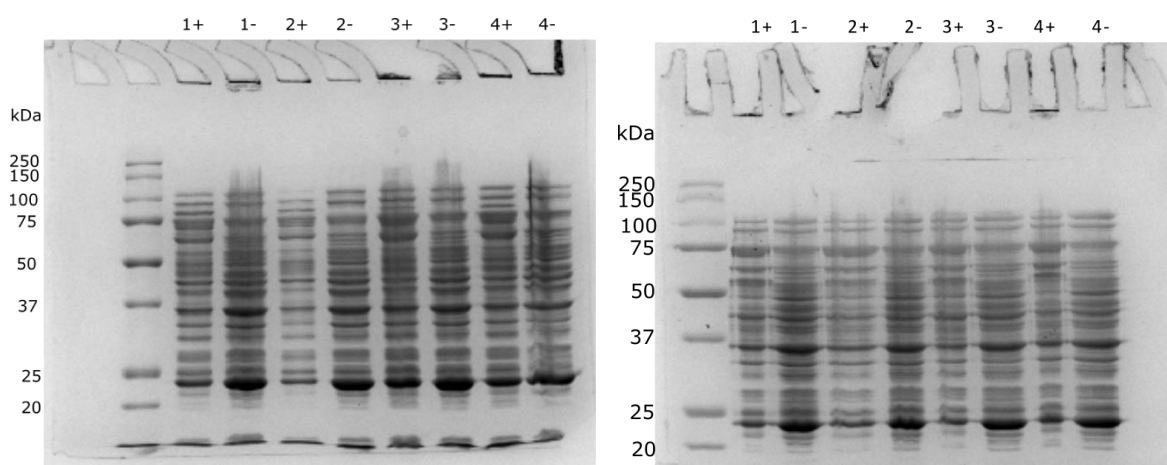
3.2.8.6. Hmotnostně spektrometrická analýza

Na MALDI terč byl nanesen 1 μ l získaného roztoku a po zaschnutí byl převrstven 1 μ l kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové (CCA) matrice. Molekulové hmotnosti tryptických štěpů byly získány pomocí hmotností spektrometrie MALDI/FT-ICR (MALDI je iontový zdroj pro hmotnostní spektrometr z anglického „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization“, FT-ICR je hmotnostní analyzátor z anglického „Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance“). Měření provedl RNDr. Petr Novák, Ph.D. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí ProteinScape a spektra byla algoritmem Mascot 2.0 porovnána oproti lidské a prokaryotické databázi SwissProt. Nastavení algoritmu Mascot 2.0 bylo následující: chyba měření do 5 ppm, použita proteasa trypsin, která mohla vynechat maximálně jedno zásahové místo, fixní karbamidomethylace cysteinu a variabilní oxidace metioninu.

4. Výsledky

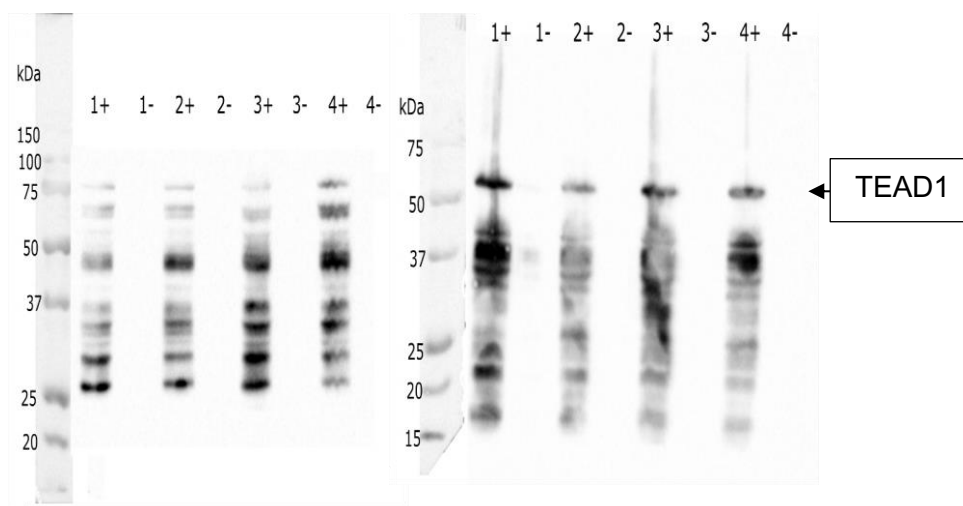
4.1. Výběr plasmidu pro produkci transkripčního faktoru TEAD1

V této práci byl nejprve vybrán vhodný plasmid pro produkci transkripčního faktoru TEAD1. Byly použity dva plasmidy: vektory pGEX a pET-28a(+), do kterých byl vložen gen kódující lidský protein TEAD1. Těmito dvěma plasmidy byly transformovány bakterie *E. coli* kmene BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Poté ke vzorkům označených + bylo přidáno IPTG a docházelo k produkci transkripčního faktoru TEAD1 s polyhistidinovou kotvou. Naopak ke vzorkům označeným – se IPTG nepřidalo a k produkci nedocházelo. Proteiny v takto získaných vzorcích byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy (obr. 13). Na gelu po SDS elektroforéze nebyl vidět rozdíl v produkci proteinu TEAD1, proto byl proveden i elektropřenos s imunodetekcí protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr. 14, str. 37). Celková molekulová hmotnost produkovaného transkripčního faktoru TEAD1 s polyhistidinovou kotvou je 49,827 kDa.



Obr. 13 – SDS-PAGE gely pro výběr vhodného plasmidu

Na levém gelu vzorky s plasmidem pGEX a na pravém gelu vzorky s plasmidem pET-28a(+). Symbolem + jsou označeny vzorky indukované IPTG. Symbolem – jsou označeny vzorky, které nebyly indukovány IPTG.



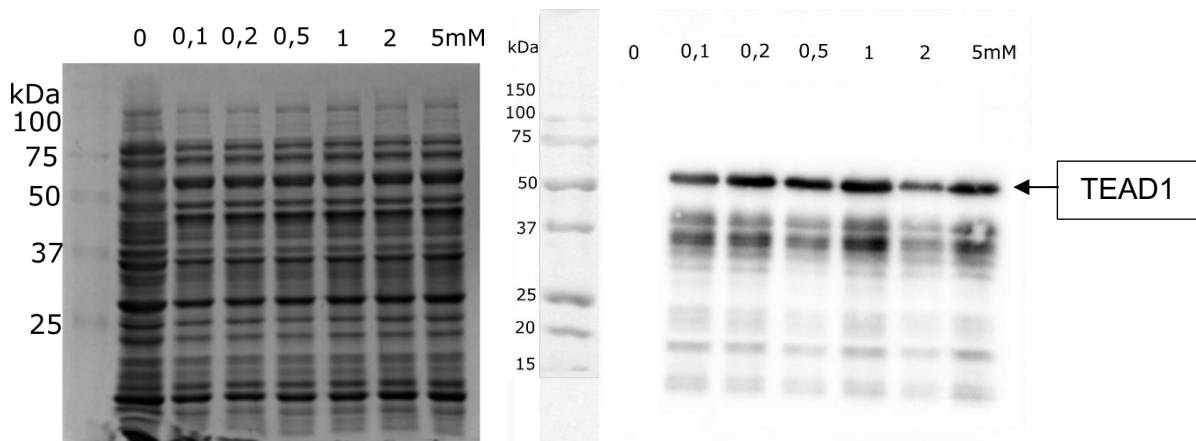
Obr. 14 – Elektropřenos po imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě
 Na levé membráně vzorky s plasmidem pGEX a na pravé membráně vzorky s plasmidem pET-28a(+). Symbolem + jsou označeny vzorky indukované IPTG. Symbolem – jsou označeny vzorky, které nebyly indukovány IPTG.

Nejvíce se velikosti proteinu TEAD1 blíží proužek proteinu nacházející se u standardu velikosti 50 kDa. Při porovnání elektropřenosů je vidět, že k produkci proteinu TEAD1 dochází mnohem více při použití plasmidu pET-28a(+). Pro další produkce byl tedy používán pouze plasmid pET-28a(+).

4.2. Nalezení vhodných podmínek produkce transkripčního faktoru TEAD1

4.2.1. Výběr vhodné koncentrace induktoru (IPTG)

Produkce probíhala po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C a byly testovány koncentrace IPTG 0 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM a 5 mM. Získané proteiny byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr. 15, str. 38).



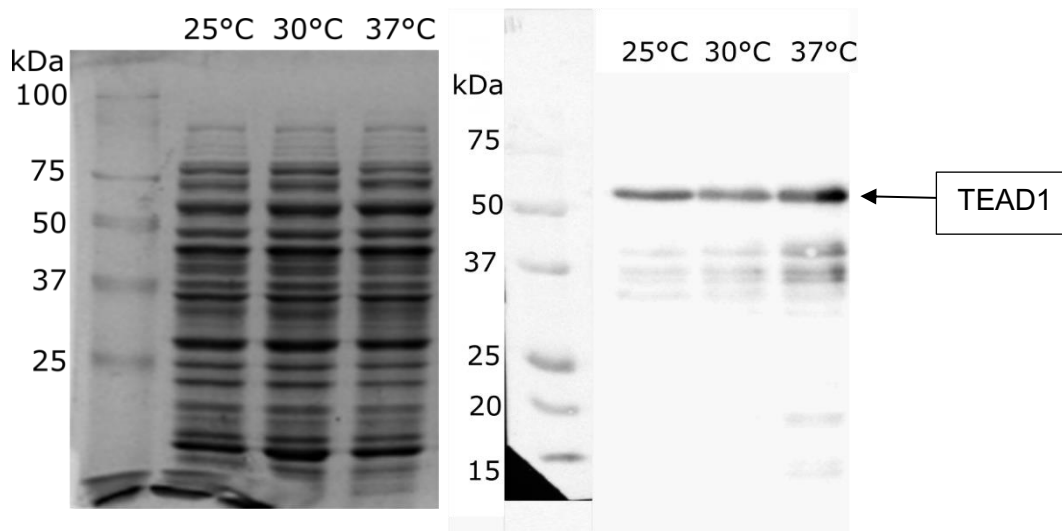
Obr. 15 – Výběr vhodné koncentrace induktoru

Vlevo gel po SDS-PAGE pro různé koncentrace IPTG. Vpravo membrána po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě pro různé koncentrace IPTG.

Na elektropřenosu je vidět, že od koncentrace 0,2 mM až 1 mM IPTG je vznik proteinu TEAD1 přibližně stejný. Proto jako vhodná koncentrace induktoru byla zvolena koncentrace 0,2 mM IPTG.

4.2.2 Výběr vhodné teploty produkce

Byly testovány tři teploty produkce: 25, 30 a 37°C. Produkce probíhala po dobu 3 hodin a koncentrace induktoru byla 0,2 mM. Získané proteiny byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr. 16, str. 39).



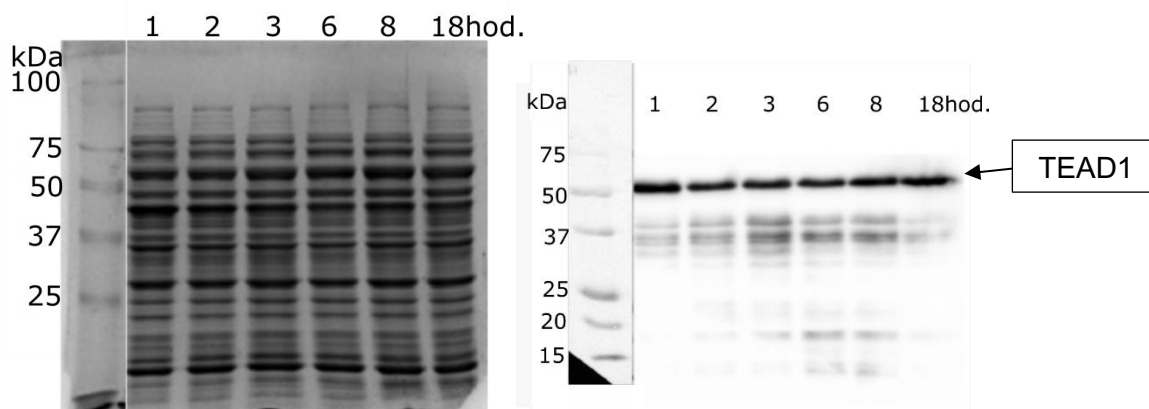
Obr. 16 – Výběr vhodné teploty produkce

Vlevo gel po SDS-PAGE pro různé teploty produkce. Vpravo membrána po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě pro různé teploty produkce.

Při porovnání gelu a membrány je vidět, že při rozdílných teplotách produkce dochází ke vzniku přibližně stejného množství proteinu TEAD1. Proto jako vhodná teplota produkce bylo dále ponecháno 37 °C.

4.2.3. Výběr vhodného produkčního času

Bylo testováno 6 různých časů produkce: 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 8 h a 18 h. Při produkci byla teplota 37 °C a koncentrace IPTG 0,2 mM. Takto získané proteiny byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr. 17, str. 40).



Obr. 17 - Výběr vhodného produkčního času

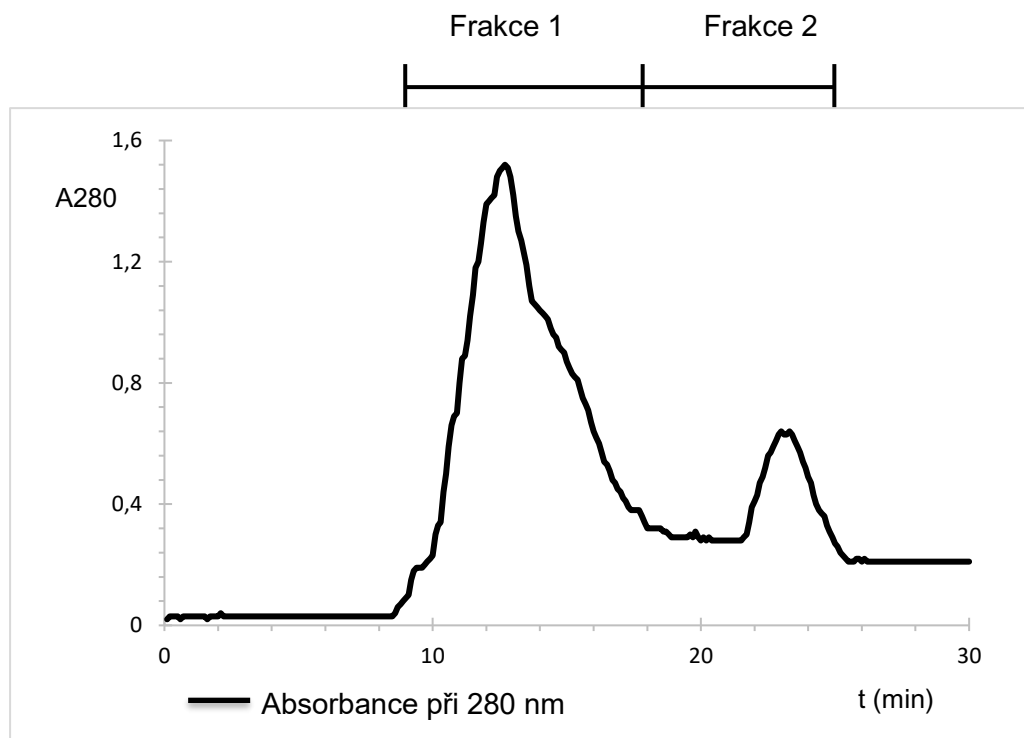
Vlevo gel po SDS-PAGE pro různé časy produkce. Vpravo membrána po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě pro různé časy produkce.

Z membrány po elektropřenosu je patrné, že k největší produkci proteinu TEAD1 dochází po jedné hodině produkce. Proto jako vhodná doba produkce proteinu TEAD1 byla dále použita 1 hodina.

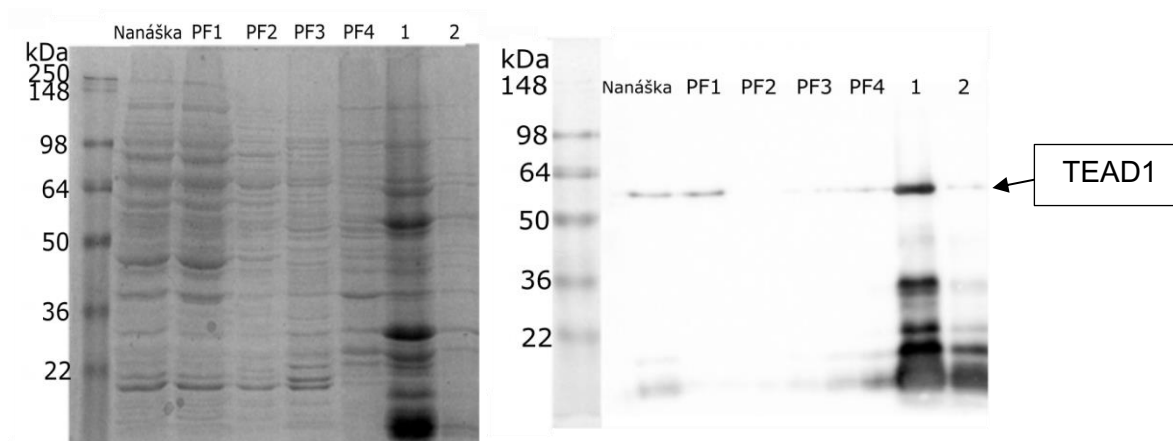
4.3. Purifikace transkripčního faktoru TEAD1

4.3.1. Afinitní chromatografie

Po nalezení vhodných podmínek produkce byl protein TEAD1 produkován ve velkém objemu živného média. Byla provedena produkce při 37 °C po dobu 1 hodiny a koncentrace induktoru byla 0,2 mM. Získaný buněčný lyzát byl nanesen na chromatografickou kolonu s Ni-NTA nosičem. Proteiny s polyhistidinovou kotvou se přes Ni²⁺ ionty navázaly na kolonu a poté byly imidazolem eluovány. Byl získán záznam průběhu eluce proteinů pomocí imidazolu podle měření absorbance roztoku vycházejícího z kolony při 280 nm (obr. 18, str. 41). Po celou dobu afinitní chromatografie byly sbírány frakce proteinů, které byly poté vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE (obr. 19, str. 41)



Obr. 18 – Záznam průběhu eluce proteinů z kolony Ni-NTA imidazolem
 Frakce 1 je při promývání kolony 30 mM imidazolem. Frakce 2 je při promývání kolony 0,5 M imidazolem.



Obr. 19 – Frakce z afinitní chromatografie

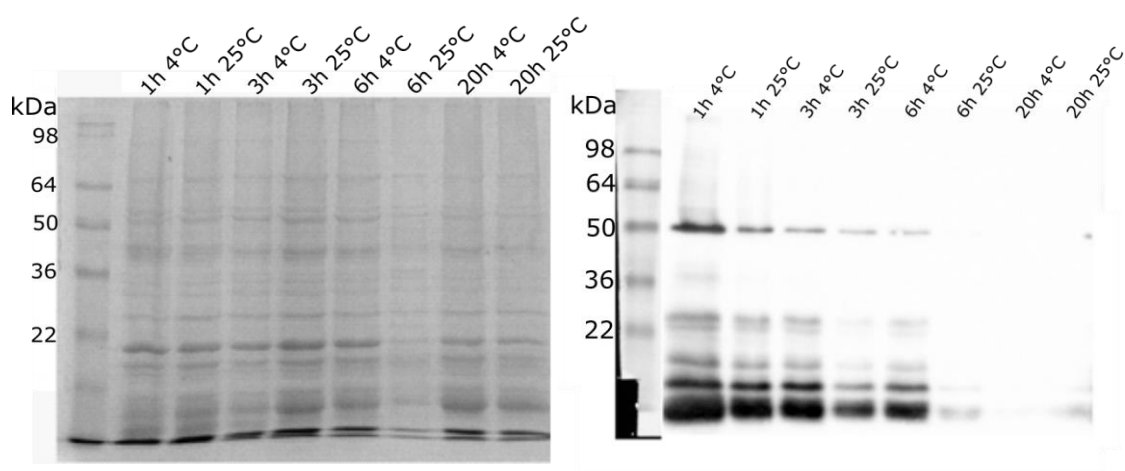
Nanáška – nanáška na kolonu, **PF 1,2,3,4** – frakce, které nebyly zachyceny na koloně, **1** – Frakce při promývání kolony 30 mM Imidazolem, **2** – Frakce při promývání kolony 0,5 M imidazolem. Vlevo gel po SDS-PAGE a vpravo membrána po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě.

Na membráně je vidět, že část proteinu TEAD1 prošla, ale většina se zachytila na kolonu a byla eluována pufrem s 30 mM imidazolem. Také je na membráně vidět, že se protilátka buď nespecificky váže i na další proteiny, které obsahují několik histidinů za

sebou, nebo se TEAD1 rozpadá a protilátka se váže na jeho menší části. Poté byl použit ještě další purifikační krok a před ním byla odštěpena polyhistidinová kotva.

4.4. Štěpení histidinové kotvy

Pomocí thrombinu byla při dvou různých teplotách (4 °C, 25 °C) odštěpena polyhistidinová kotva. Štěpení probíhalo po dobu pěti různých časů (1, 3, 6 a 20 hodin). Poté bylo vždy štěpení zastaveno přidáním vzorkového pufru a povařením vzorku. Všechny tyto vzorky byly podrobeny SDS-PAGE a elektropřenosu s imunodetekcí protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr. 20).



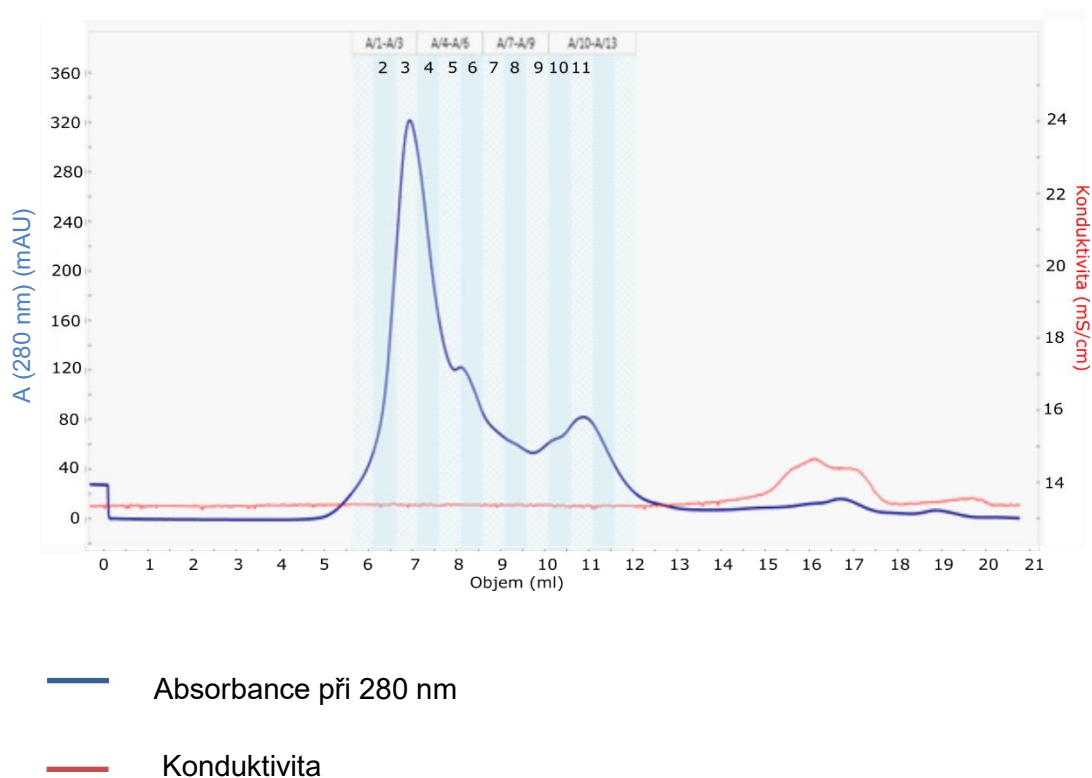
Obr. 20 – Štěpení polyhistidinové kotvy thrombinem

Vlevo gel po SDS-PAGE a vpravo membrána po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě.

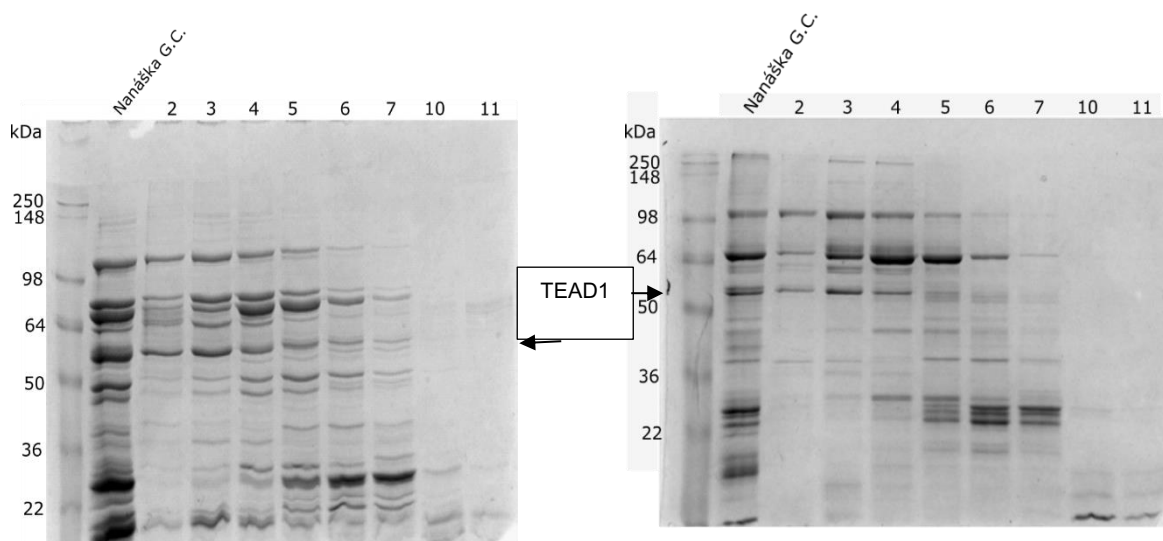
Na membráně po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr. 20) je vidět, že po 20 hodinách je při obou teplotách polyhistidinová kotva úplně odštěpena. Jako vhodnější teplota pro štěpení polyhistidinové kotvy byla zvolena teplota 4 °C, protože při 25 °C proteiny precipitovaly.

4.5. Gelová permeační chromatografie

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie. Tato metoda se používá k oddělení proteinů podle jejich velikosti. Velké proteiny prochází kolonou nejrychleji a malé proteiny jsou zpomalovány v pórech gelu, a procházejí tedy kolonou pomaleji. Tohoto principu bylo použito především k odstranění v předchozím kroku odštěpené polyhistidinové kotvy a zbyvajících bakteriálních proteinů. Vzorek po odštěpení polyhistidinové kotvy byl koncentrován a nanesen na kolonu. Po celou dobu průběhu chromatografie byla měřena konduktivita a absorbance při 280 nm roztoku vytékajícího z kolony (obr. 21). Konduktivita byla měřena pro zjištění, kdy z kolony začnou vycházet soli. Vytékající roztok byl sbírán po frakcích a poté byly vybrané frakce naneseny na SDS-PAGE k analýze získaných proteinů (obr. 22, str. 44).



Obr. 21 – Průběh eluce gelové permeační chromatografie



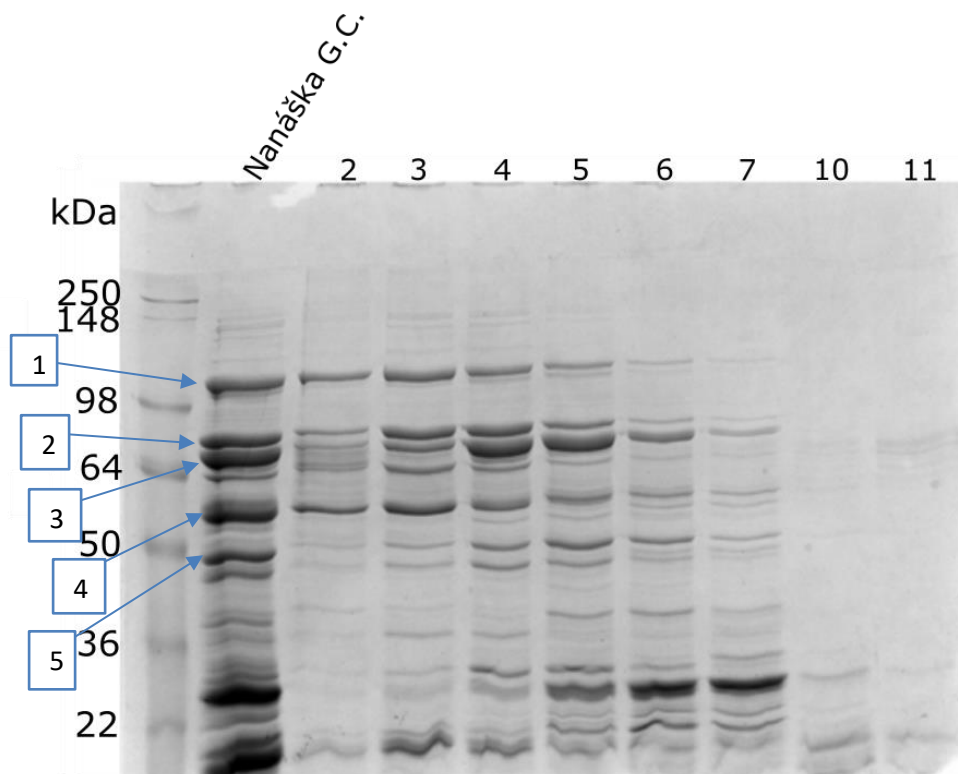
Obr. 22 – Vzorky z gelové permeační chromatografie

Vlevo redukující gel po SDS-PAGE vybraných frakcí z gelové permeační chromatografie. Vpravo neredukující gel po SDS-PAGE vybraných frakcí z gelové permeační chromatografie. Nanáška G.C. – nanáška na gelovou permeační chromatografii. 2 a 3 – vzrůst prvního vrcholu. 4,5,6 a 7 klesání prvního vrcholu. 10 a 11 - malý vrchol.

Na obrázku redukujícího gelu (obr. 22) je vidět, že se protein TEAD1 eluuje dříve než jiné větší proteiny, což by mohlo být způsobeno tvorbou kovalentního dimeru proteinu TEAD1, který by na redukujícím gelu nebyl vidět. Proto byly vzorky nanášeny ještě na neredukující gel, kde je vidět, že k eluci proteinu TEAD1 dochází také dříve, ale ostatní proteiny se elují podle velikosti. Tento problém může být způsoben tím, že TEAD1 tvoří nekovalentní komplex s nějakými jinými proteiny nebo sám se sebou, ale tento nekovalentní komplex není vidět ani na neredukujícím gelu.

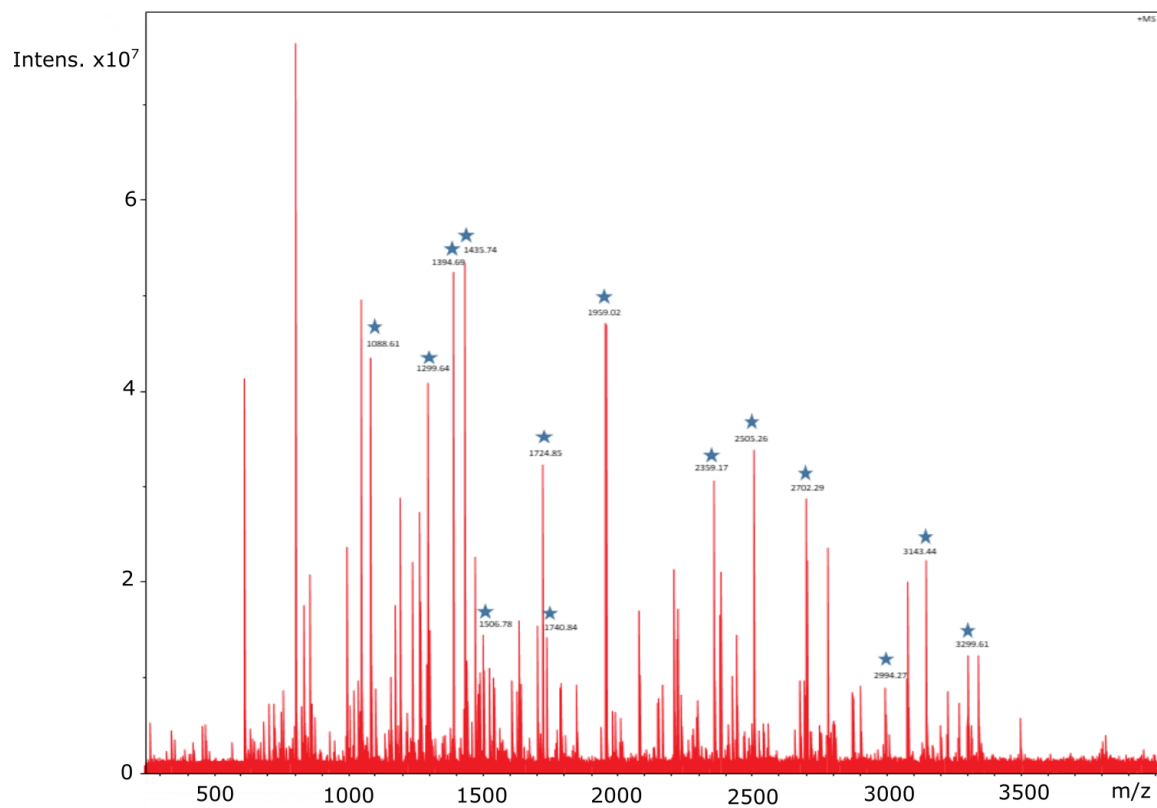
4.6. Peptidové mapování

Byly vyříznuty proužky z gelu po SDS-PAGE podle Obr. 23 na straně 45, proteiny v nich obsažené byly štěpeny trypsinem a vzniklé peptidy byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.



Obr. 23 – Gel po SDS-PAGE vybraných frakcí z gelové permeační chromatografie. Šipkami a přiřazenými čísly jsou označeny vyřiznuté proužky, u nichž bylo provedeno štěpení trypsinem a hmotnostní spektrometrie v uspořádání MALDI/FT-ICR. Proužek 4 byl vyhodnocen jako protein TEAD1.

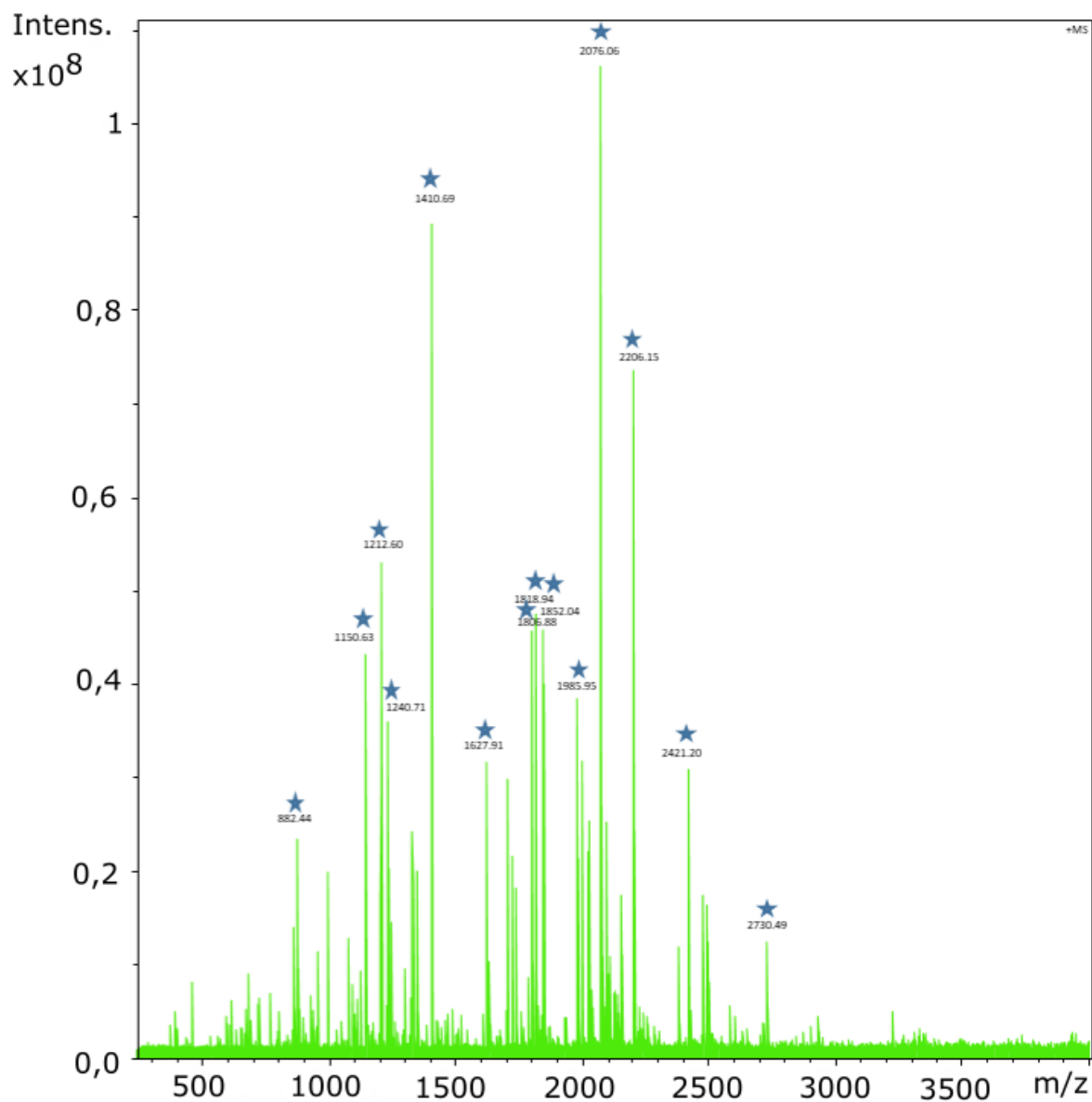
Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu ProteinScape a spektra byla algoritmem Mascot 2.0 porovnána proti lidské a prokaryotické databázi SwissProt. K proužku 1 byl přiřazen protein 2-oxoglutarát dehydrogenáza složka E1 (*E.Coli*) viz obr. 24 str. 46.



Obr. 24 - Hmotnostní spektrum proužku 1

Modrými hvězdičkami jsou označeny signály přiřazené proteinu 2-oxoglutarát dehydrogenáza složka E1 (*E.Coli*).

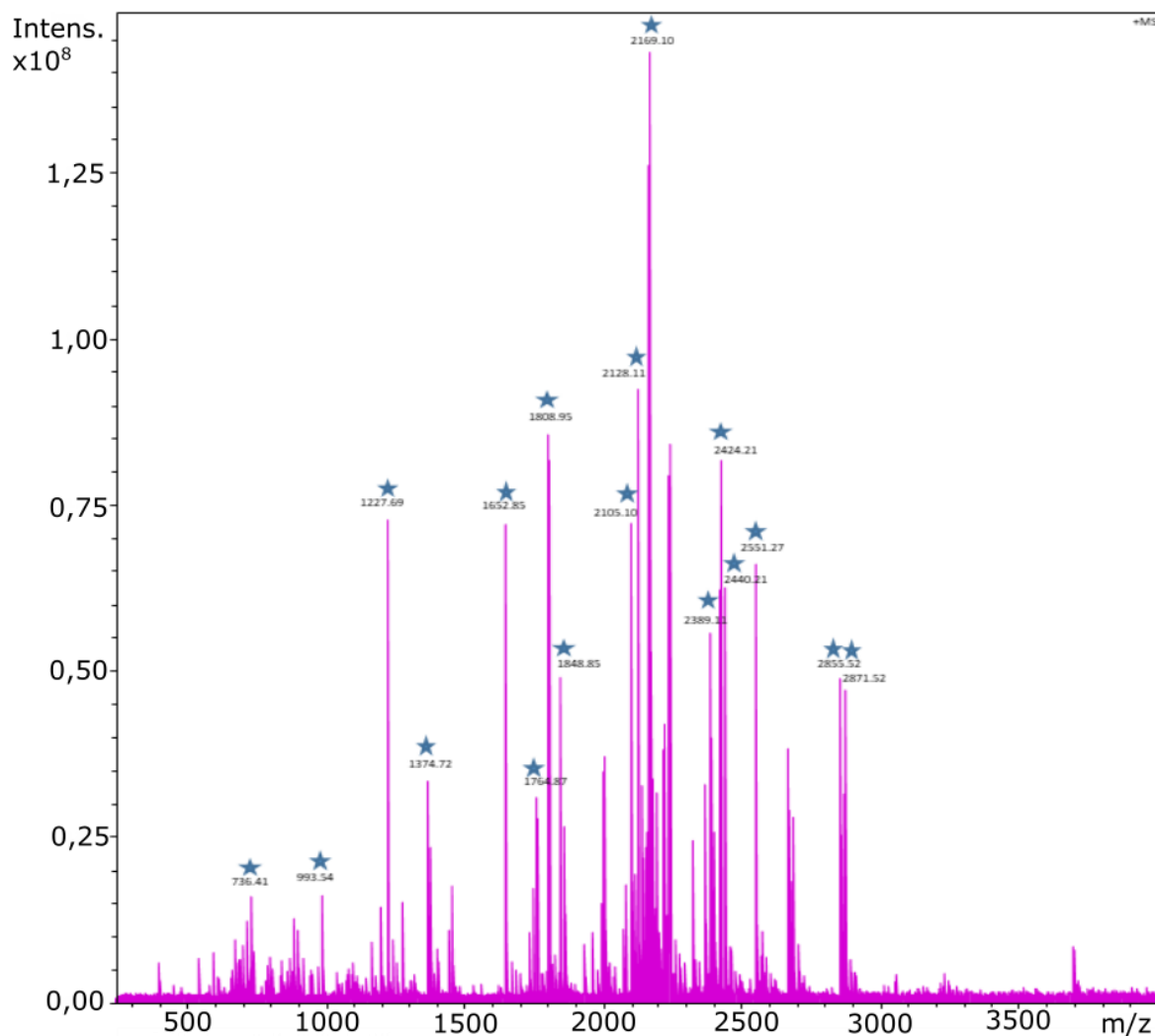
K proužku 2 byl přiřazen Bifunkční polymyxin rezistentní protein ArnA (*E.Coli*) viz Obr. 25, str. 47.



Obr. 25 - Hmotnostní spektrum proužku 2

Modrými hvězdičkami jsou označeny signály přiřazené Bifunkčnímu polymyxin rezistentnímu proteinu ArnA (*E. Coli*).

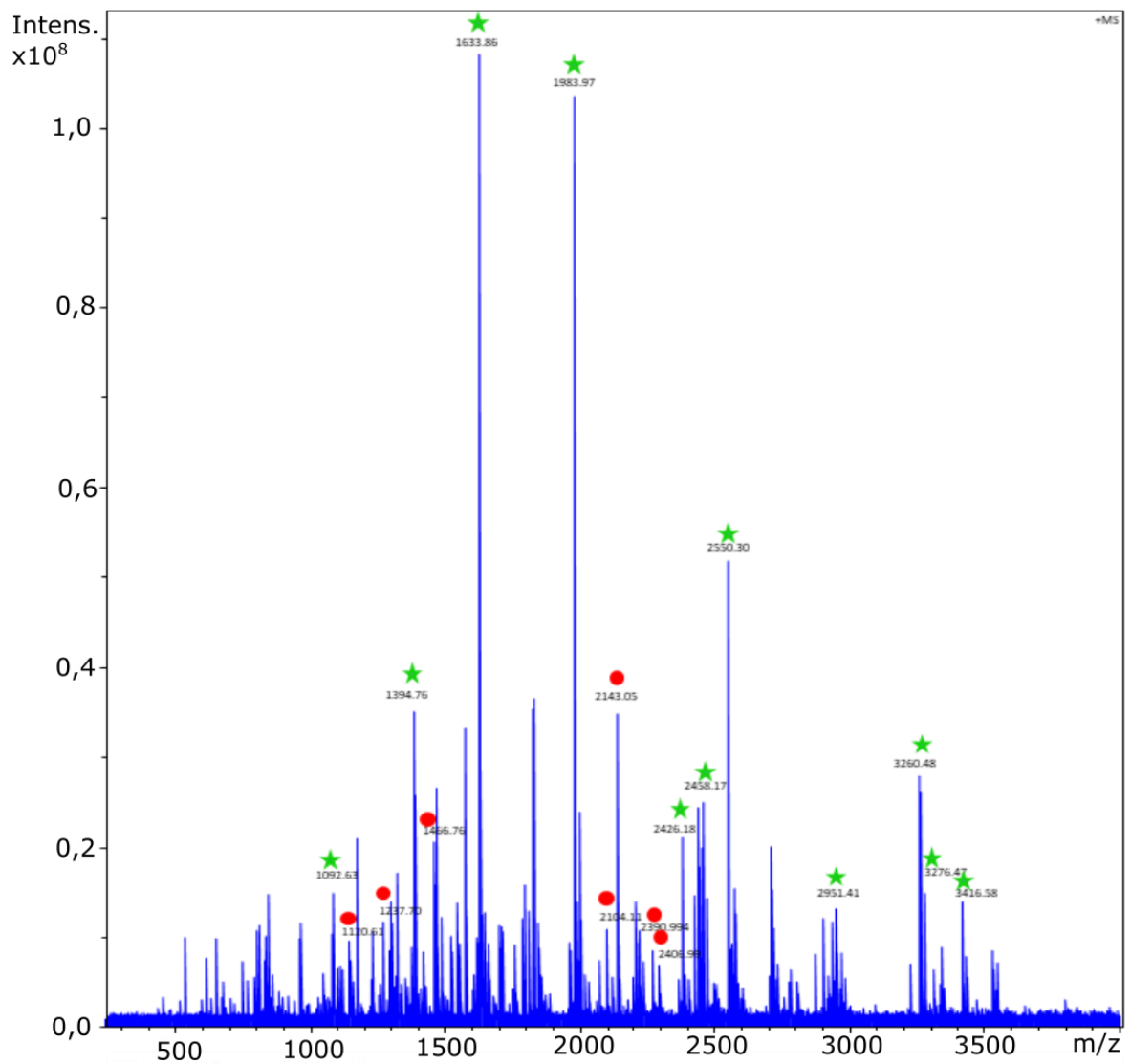
K proužku 3 byl přiřazen protein Glutamin-fruktosa-6-fosfát aminotransferáza (*E. Coli*) viz obr. 26, str. 48.



Obr. 26 - Hmotnostní spektrum proužku 3

Modrými hvězdičkami jsou označeny signály přiřazené proteinu Glutamin-fruktosa-6-fosfát aminotransferáza (*E.Coli*).

K proužku 4 byl přiřazen protein TEAD1 a dihydrolipoyllysinový zbytek sukcinyltransferázy složky komplexu 2-oxoglutarát dehydrogenázy (*E.coli*) viz obr.27, str. 49 a obr. 28, str. 50.



Obr. 27 - Hmotnostní spektrum proužku 4

Zelenými hvězdičkami jsou označeny signály přiřazené dihydrolipoyllysinovému zbytku sukcinyltransferázy složka komplexu 2-oxoglutarát dehydrogenázy (*E.coli*). Červenými kolečky jsou označeny signály přiřazené proteinu TEAD1.

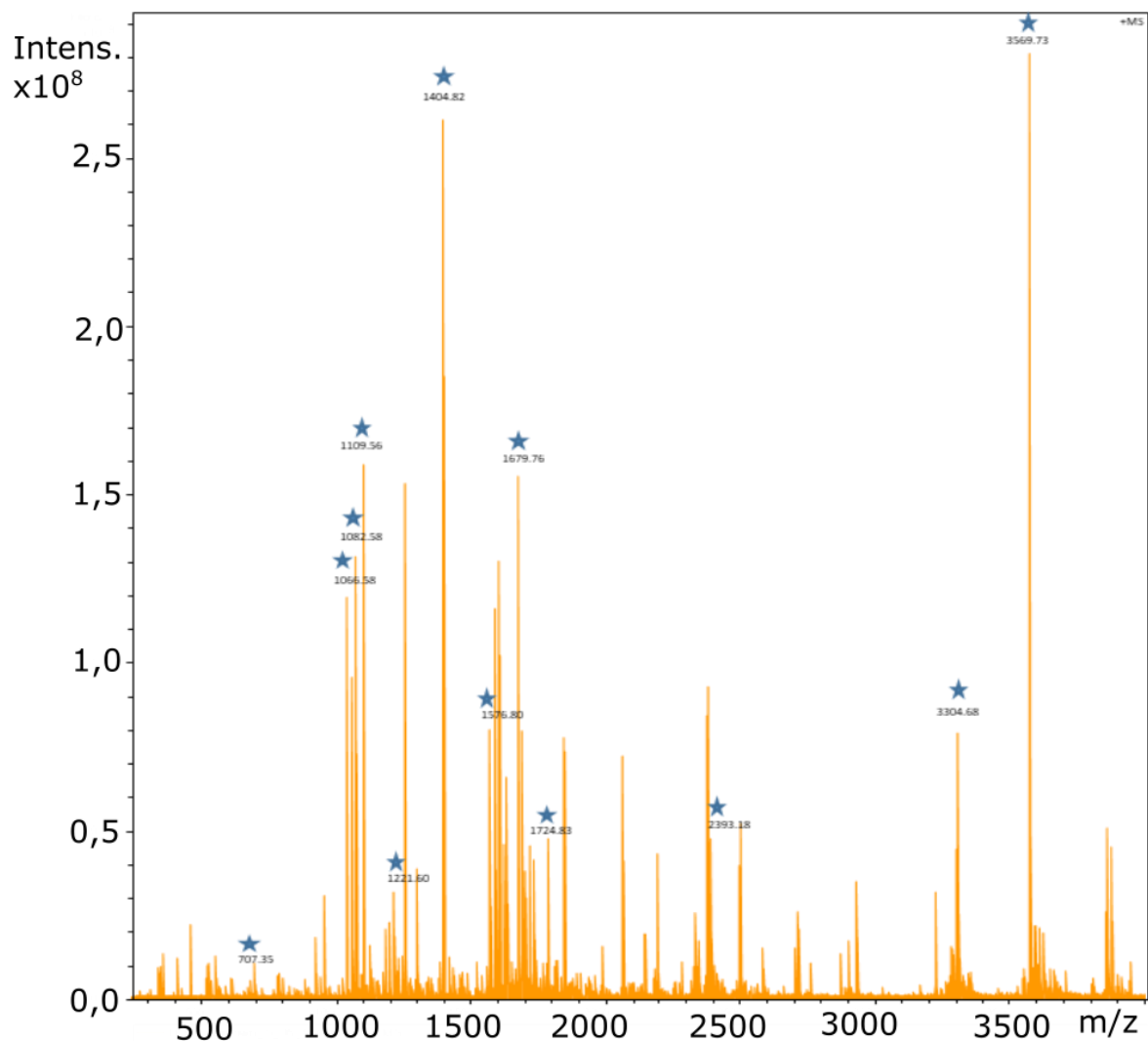
GSHMIEPSSW GGSESPAENM ERMSGADKP IDNDAEGVWS PDIEQSFQEA LAIYPPCGRR
 KIILSDEGKM YGRNELIARY IRLRTGKTRT RKQVSSHIQV LAERKSRDFH SKLKDQTAKD
 KALQHMAAMS SIQVSATAI HNLGLPGIP RPTFPGAPGF WPGMIQTGQP GSSQDVKPFV
 QQAYPIQPAV TAPIPGFEPA SAPAPSVPAW QGRSIGTTKL RLVEFSAFLE QQRDPDSYNK
 HLFVHIGHAN HSYSDPLES VDIRQIYDKF PEKKGGLKGL FGKGPQNAFF LVKFWADLNC
 NIQDDAGAFY GVTSQYESSE NMTVTCSTKV CSFGKQVVEK VETEARFEN GRFVYRINRS
 PMCEYMINFI HKLHLPEKY MMNSVLENFT ILLVVTNRDT QETLLCMACV FEVSNSEHGA
 QHHIYRLVKD

Obr. 28 – Primární sekvence připraveného transkripčního faktoru TEAD1

Červeně jsou označeny aminokyseliny lysin a arginin, za kterými štěpí trypsin. Modře jsou vyznačeny peptidy, které byly nalezeny v hmotnostním spektru.

Některé peptidy, které vznikly po štěpení trypsinem nebyly v hmotnostním spektru nalezeny, protože jsou při měření za daných podmínek buď příliš malé, nebo příliš velké. Protein dihydrolipoyllysinový zbytek sukcinyltransferázy složky komplexu 2-oxoglutarát dehydrogenázy (E.coli) je v hmotnostním spektru kvůli skoro stejné molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost tohoto proteinu je 44 kDa a molekulová hmotnost připravovaného proteinu TEAD1 bez histidinové kotvy je 48 kDa. Proteiny s takto blízkými molekulovými hmotnostmi nelze rozdělit pomocí gelové permeační chromatografie ani pomocí SDS elektroforézy.

K proužku 5 byl přiřazen 30S ribosomální protein S2 viz obr. 29, str. 51.



Obr.29 - Hmotnostní spektrum proužku 5

Modrými hvězdičkami jsou označeny signály přiřazené 30S ribosomálnímu proteinu S2.

5. Diskuze

V této práci byl rekombinantně připraven transkripční faktor TEAD1 tak, že nejprve byl zvolen vhodný plasmid pro tento protein. Bylo vybíráno ze dvou plasmidů pGEX a pET-28a(+). Na membráně po elektropřenosu (obr. 14, str. 37) je vidět, že s plasmidem pET-28a(+) docházelo k produkci proteinu TEAD1 mnohem více než s plasmidem pGEX. Proto byl dále používán pouze plasmid pET-28a(+). V práci Mgr. Růženy Liškové se nepodařilo produkovat protein TEAD1 za použití plasmidu pET-28a(+) v buňkách bakteriálního kmene BL21-Gold (DE3)²⁶, proto byly v této práci použity buňky bakteriálního kmene BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, které byly použity při přípravě DNA vazebné domény proteinu TEAD4 pro zjištění krystalické struktury DNA vazebné domény proteinu TEAD4 s DNA⁹. Proužek proteinu TEAD1 je na tomto elektropřenosu (obr. 14, str. 37) vidět nad hodnotu standardu 50 kDa, což může být způsobeno tím, že protein TEAD1 obsahuje více aminokyselin, které mají zásaditý charakter, a může se při SDS elektroforéze pohybovat pomaleji. Proto odhad molekulové hmotnosti proteinu pomocí SDS elektroforézy není úplně přesný.

Dále byly nalezeny vhodné podmínky produkce. Jako vhodná koncentrace induktoru (IPTG) byla zvolena koncentrace v médiu 0,2 mM, protože na elektropřenosu (obr. 15, str. 38) je vidět, že od koncentrace 0,2 mM až 1 mM IPTG je vznik proteinu TEAD1 přibližně stejný. Cena induktoru IPTG není zanedbatelná, proto zvolena koncentrace nižší, tedy 0,2 mM. Jako vhodná teplota produkce byla zvolena teplota 37 °C, protože při porovnání gelu a membrány po elektropřenosu (obr. 16, str. 39) je vidět, že při rozdílných teplotách produkce dochází ke vzniku přibližně stejného množství proteinu TEAD1. Jako poslední byla vybrána vhodná doba produkce, při níž se produkovalo největší množství proteinu TEAD1. Z membrány po elektropřenosu (obr. 17, str. 40) je patrné, že k největší produkci proteinu TEAD1 dochází po jedné hodině produkce. Byla tedy jako vhodná doba produkce zvolena 1 hodina. Při těchto podmínkách byl TEAD1 produkován ve velkém objemu sterilního LB média a dále purifikován. Prvním purifikačním krokem byla afinitní chromatografie s Ni-NTA kolonou. TEAD1 se zachytil na koloně díky polyhistidinové kotvě a byl eluován již nízkou koncentrací imidazolu. To je nejspíše způsobeno tím, že se TEAD1 na nosič příliš dobře nevázal, nebo nosič kolony již nebyl v nejlepšímu stavu a potřeboval by znovu nabít nikelnatými ionty. Také se protein TEAD1 nemusel příliš dobře vázat kvůli tomu, že je poměrně velký a histidinová kotva nemusela

být dobře přístupná na povrchu. Poté byla nalezena vhodná doba a teplota štěpení polyhistidinové kotvy thrombinem. Na membráně po elektropřenosu a imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě (obr.20, str. 42) je vidět, že po 20 hodinách je při obou teplotách polyhistidinová kotva úplně odštěpena. Jako vhodnější teplota pro štěpení polyhistidinové kotvy byla zvolena teplota 4 °C, protože při teplotě 25 °C byla kotva sice odštěpena rychleji, ale docházelo více k precipitaci proteinů. Gelová permeační chromatografie sloužila k odstranění ostatních nežádoucích bakteriálních proteinů a odštěpených polyhistidinových kotev. Jak je vidět na obrázku 22 na straně 44, došlo k malému rozdělení proteinů podle velikosti a protein TEAD1 je vidět ve více frakcích i s jinými proteiny. Proteiny získané po gelové permeační chromatografii byly identifikovány pomocí peptidového mapování. Bylo potvrzeno, že proužek nad 50 kDa standardu obsahuje jak protein TEAD1, tak i dihydrolipoyllysinový zbytek sukcinyltransferázy složky komplexu 2-oxoglutarát dehydrogenázy (*E.coli*). Tento protein od proteinu TEAD1 nelze oddělit ani iontově výměnnou chromatografií, protože mají velmi blízkou hodnotu pI. Podařilo se tedy rekombinantně připravit transkripční faktor TEAD1, ale bohužel nedošlo k dostatečnému oddělení proteinů, proto se transkripční faktor nepodařilo získat čistý. Pro získání lepší čistoty proteinu TEAD1 by možná pomohla produkce v ještě větším objemu LB média. Docházelo by k produkci většího množství proteinu TEAD1 a po zachycení na Ni-NTA kolonu by nezbývalo tolik místa pro navázání ostatních proteinů.

K produkci proteinu TEAD1 dochází málo a koncentrace získaného proteinu je nízká přibližně 0,03 mg na litr LB média. Během všech purifikačních kroků dochází k velkým ztrátám, protože TEAD1 se nejspíše rozpadá na menší fragmenty od N'-koncové oblasti, která je velmi proměnlivá a nebyla u ní zjištěna struktura⁴. Tento rozpad je usuzován kvůli tomu, že protilátka proti polyhistidinové kotvě barví i proužky o menší molekulové hmotnosti, než je TEAD, jak je vidět na obr.15, str. 38. Na tomto obrázku je také vidět, že pokud je koncentrace IPTG nulová nedochází k produkci proteinu TEAD1 a protilátka proti polyhistidinové kotvě neobarvila na membráně žádný z proužků. Jeho nízká stabilita může být způsobena tím, že v eukaryotických buňkách nedochází k palmitoylaci, která, jak již bylo zmíněno, je důležitá pro správné sbalení a stabilitu proteinu TEAD1. Pro lepší výtěžek proteinu TEAD1 by bylo možná lepší použití savčích buněk, u nichž k palmitoylaci dochází²⁵. Bylo zjištěno, že glykolýza reguluje interakci mezi YAP/TAZ a TEAD1. Přesněji by tato interakce měla být závislá na endogenní

fosfofruktokinase 1²⁷. Možná také proto nedošlo k oddělení rekombinantního proteinu TEAD1 od ostatních proteinů metabolismu bakterie *E. coli*.

6. Závěr

Byl vybrán vhodný plasmid pro produkci transkripčního faktoru TEAD1 a to plasmid pET-28a(+). Byly vybrány vhodné produkční podmínky proteinu TEAD1. TEAD1 byl produkována po dobu 1 hodiny při 37 °C a koncentrace induktoru IPTG v médiu byla 0,2 mM. Dále byl protein TEAD1 purifikován pomocí afinitní chromatografie. Od získaného proteinu byla odštěpena polyhistidinová kotva pomocí thrombinu. Byly nalezeny vhodné podmínky štěpení polyhisitidové kotvy, které bylo provedeno po dobu 20 hodin při 4 °C. Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, po níž byly pomocí hmotnostně spektrometrické analýzy zjištěny získané proteiny. Mezi nimi byl také zjištěn protein TEAD1, který bohužel nebyl čistý, protože se ho nepodařilo na gelové permeační chromatografii dostatečně oddělit od ostatních proteinů, jimiž jsou proteiny metabolismu bakterie *E. coli*.

Použitá literatura:

1. Lambert, S. A. *et al.* The Human Transcription Factors. *Cell* **172**, 650–665 (2018).
2. Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A. & Luscombe, N. M. A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 252–263 (2009).
3. Luscombe, N. M., Austin, S. E., Berman, H. M. & Thornton, J. M. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* **1**, 1–1 (2000).
4. Landin-Malt, A., Benhaddou, A., Zider, A. & Flagiello, D. An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors. *Gene* **592**, 292–303 (2016).
5. Jiang, S. W., Dong, M., Trujillo, M. A., Miller, L. J. & Eberhardt, N. L. DNA Binding of TEA/ATTS Domain Factors Is Regulated by Protein Kinase C Phosphorylation in Human Choriocarcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 23464–23470 (2001).
6. Lee, D. *et al.* A potential structural switch for regulating DNA-binding by TEAD transcription factors. **428**, 2557–2568 (2017).
7. Anbanandam, A. *et al.* Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Pnas* **103**, 17225–30 (2006).
8. Yoshida, T. MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 8–17 (2008).
9. Shi, Z. *et al.* DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4. *Oncogene* **36**, 4362–4369 (2017).
10. Zhou, Y. *et al.* The TEAD family and its oncogenic role in promoting tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–15 (2016).
11. Li, Z. *et al.* Structural insights into the YAP and TEAD complex service Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev.* 235–240 (2010).
12. Pobbati, A. V & Hong, W. 2013 Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. **14**, 390–398 (2013).
13. Xie, Q. *et al.* YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence. *Cancer Res.* **73**, 3615–3624 (2013).

14. Liu-chittenden, Y. *et al.* Liu-Chittenden et al. Genet. Pharmacol. Disrupt. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD–YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP 1300–1305 (1987). doi:10.1101/gad.192856.112.1300
15. Pobbati, A. V. *et al.* Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure* **23**, 2076–2086 (2015).
16. Jiao, S. *et al.* A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell* **25**, 166–180 (2014).
17. Xiao, J. H. *et al.* One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind in vitro to overlapping motifs in the domain B1 of the SV40 enhancer. *EMBO J.* **6**, 3005–13 (1987).
18. Jacquemin, P. *et al.* Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev. Dyn.* **212**, 423–436 (1998).
19. Jacquemin, P. *et al.* Nucleic Acids , Protein Synthesis , and Molecular Genetics : A Novel Family of Developmentally Regulated Mammalian Transcription Factors Containing the TEA / ATTS DNA Binding Domain A Novel Family of Developmentally Regulated Mammalian Transcription Facto. **271**, 21775–21785 (1996).
20. Nishioka, N. *et al.* Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* **125**, 270–283 (2008).
21. Yoshida, T. MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 8–17 (2008).
22. Foster, C. T., Gualdrini, F. & Treisman, R. Mutual dependence of the MRTF–SRF and YAP–TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev.* 1–15 (2018). doi:10.1101/gad.304501.117
23. Lin, K. C., Park, H. W. & Guan, K. L. Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 862–872 (2017).
24. Varelas, X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* **141**, 1614–1626 (2014).
25. Noland, C. L. *et al.* Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure* **24**, 179–186 (2016).
26. Lišková, R. Recombinant preparation of TEAD transcription factor. 83 (2016).

27. Enzo, E. *et al.* Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *EMBO J.* **34**, 1349–1370 (2015).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely, a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka