UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Karolína Naušová

PODROBNÁ CHARAKTERIZACE INTERAKCE MEZI LEDGF/p75 A MeCP2

Detailed characterization of the interaction between LEDGF/p75 and MeCP2

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Václav Veverka, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

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

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

V Praze dne 20. května 2020.

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli Ing. Václavovi Veverkovi, Ph.D za vlídnost, trpělivost, odborné vedení a rady při psaní bakalářské práce a během práce v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D. za možnost pracovat v její výzkumné skupině a za její hodnotné rady v profesním životě. Bezmezný dík patří Mgr. Vandě Lux, Ph.D. ať už za nesmírně cenné rady v laboratoři nebo korekci bakalářské práce. Speciální dík patří RNDr. Milanovi Fábrymu, CSc. za přípravu expresních plazmidů a řadu životních rad, Ing. Ireně Sieglové za jazykovou korekci a zasvěcení do chodu laboratoře, a celému týmu Laboratoře strukturní biologie ÚOCHB za vytvoření výborného pracovního prostředí. Moc ráda bych také poděkovala RNDr. Kataríně Pšenákové, Ph.D, díky které jsem na tuto práci vůbec narazila. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za zázemí, podporu a trpělivost v průběhu mých studijních let.

Abstrakt

Epigenetika je vědní obor zabývající se studiem dědičných změn fenotypu, které nejsou způsobeny změnou v sekvenci DNA. Mezi hlavní epigenetické mechanismy spadá kovalentní modifikace DNA, zejména methylace, modifikace histonů a s tím spojená modifikace chromatinu, a RNA interference. Tyto mechanismy se mohou uplatnit během řady procesů, od transkripce až po translaci.

LEDGF/p75, z angl. Lens epithelium-derived growth factor, je všudypřítomný protein lidského těla považovaný za transkripční koaktivátor upregulovaný za stresových podmínek. Skládá se z několika domén, z nichž na svém N-konci obsahuje PWWP doménu, která je schopna vázat di- a trimethylovaný lysin 36 na histonu 3 - tedy epigenetickou značku transkripčně aktivního chromatinu. Mezi jeho interakční partnery patří například HIV integráza, MLL1-MENIN komplex nebo protein MeCP2. Kratší izoformou tohoto proteinu je LEDGF/p52 sdílící s LEDGF/p75 jeho N-koncovou část důležitou pro interakci s DNA a chromatinem.

MeCP2, z angl. Methyl-CpG-binding protein 2, je rovněž všudypřítomným proteinem lidského těla, ovšem s nejvyšší koncentrací v mozku. Jedná se o transkripční modulátor remodelující chromatin, jehož funkcí je proto aktivace nebo represe genu v závislosti na molekulárním a buněčném kontextu. Mimo jiné je zapojen v regulaci sestřihu RNA, přičemž ovlivňuje sestřih genů glutamátového receptoru zprostředkovávajícího drtivou většinu vzrušivých synaptických transmisí v mozku. Mutací MeCP2 je přerušena interakce s proteinem LEDGF probíhající v mozku a dále dochází k závažnému neurodevelopmentárnímu onemocnění zvané Rettův syndrom postihující přibližně 1 z 10 000 žen. Je tudíž možné, že LEDGF hraje důležitou roli v patogenezi tohoto onemocnění.

V rámci této práce byla provedena heterologní exprese a purifikace vybraných délkových variant LEDGF a MeCP2, jenž byly dále použity pro interakční experimenty mezi zvolenými proteiny. Pro ověření vzniku vazby mezi jednotlivými proteiny byla nejprve zvolena gelová permeační chromatografie a následně NMR spektroskopie, která vznik vazby prokázala.

Potvrzení interakce mezi proteiny LEDGF a MeCP2 by mohlo přispět k pochopení principů Rettova syndromu, a tedy i možnosti návrhu a vývoji léčiva pro toto onemocnění.

Klíčová slova: Epigenetika, Epigenetické mechanismy, LEDGF/p75, LEDGF/p52, MeCP2, Rettův syndrom

Abstract

Epigenetics investigates heritable phenotype changes that are not caused by alternations in DNA sequence. Major epigenetic mechanisms include covalent DNA modifications (particularly methylation), histone and chromatin modifications and RNA interference. These mechanisms are involved in number of processes from transcription to translation.

Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) is ubiquitously expressed in human body and it is considered to be a transcriptional coactivator upregulated upon stress conditions. LEDGF/p75 consists of several domains. The N-terminal PWWP domain plays very important role from epigenetic point of view as it is able to bind di- and trimethylated lysine 36 of histone 3, which is considered as an epigenetic marker of transcriptionally active chromatin. LEDGF/p75 interaction partners include e.g. HIV integrase, MLL1-MENIN complex or MeCP2. A shorter isoform of LEDGF/p75 called LEDGF/p52 shares with LEDGF/p75 its N-terminal part that is responsible for interaction with DNA and chromatin.

Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) is present everywhere in human body with the highest abundance in brain. MeCP2 is a transcriptional modulator remodeling chromatin, therefore its function is to activate or repress gene depending on the molecular and cellular context. Among other things, MeCP2 is involved in the regulation of RNA splicing thus affects the splicing of glutamate receptor genes that mediate the vast majority of excitatory synaptic transmissions in the brain. Mutations in MeCP2 interfere with the interaction with LEDGF in the brain and result in a serious neurodevelopmental disease called Rett syndrome, which affects approximately 1 per 10 000 women. LEDGF might thus play an important role in the pathogenesis of The Rett syndrome.

In this thesis, there were heterologously expressed and purified selected length variants of LEDGF and MeCP2 which were. further used to verify interactions betweenboth proteins.Size exclusion chromatography was initially employed to monitor complex formation, however, only NMR spectroscopy proved the binding ofLEDGF and MeCP2.

Revealing details of the LEDGF and MeCP2 interaction could contribute to understand mechanisms of Rett syndrome, and thus could offer basisfor drug design and development to eventually overcome this disease.

Key words: Epigenetics, Epigenetic mechanisms, LEDGF/p75, LEDGF/p52, MeCP2, Rett syndrome

Seznam použitých symbolů a zkratek

(v/v)	Objemová procenta
(w/v)	Procenta hmotnosti v objemu
AA	Akrylamid
aa	Aminokyselina (z angl. aminoacid)
ATP	Adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
CDC7-ASK	CDC7-activátor kinázy S-fáze buněčného cyklu (z angl. CDC7-activator of S-kinase)
CR 1-4	Nabité oblasti 1-4 (z angl. charged regions)
CTD	C-koncová doména (z angl. C-terminal domain)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ETG	Ethyl-β-D-thiogalaktosid
FPLC	Provedení kapalinové chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
HATH doména	Homologní amino-terminální HDGF doména
HDGF	Růstový faktor odvozený od hepatomu (z angl. hepatoma-derived growth factor)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. human imunodeficiency virus)
HRP rodina	Proteinová rodina odvozená od hepatomového růstového faktoru (z angl. hepatoma-derived growth factor (HDGF) related protein family)
IBD	Integrázu vázající doména (z angl. integrase-binding domain)
JPO2	Jméno interakčního partnera proteinu LEDGF/p75
Lac	Represorový protein lac
LB	Luria-Bertani
LEDGF	Růstový faktor odvozený od epitele čočky (z angl. lens epithelium-derived growth factor)
LTR promotor	Interakční partner proteinu MeCP2 (z angl. long terminal repeats protomor)
MBD	Methyl vázající doména (z angl. methyl-binding domain)

MeCP2	Metyl-CpG vázající protein 2 (z angl. methyl-CpG-binding protein 2)
MLL1	Smíšená linie leukemie (z angl. mixed lineage leukemia)
mRNA	Mediátorová ribonukleonová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
NCoR/SMRT	Komplex nukleárního receptorového korepresoru a mediátoru pro umlčování retinoidního a thyroidního receporu (z angl. nuclear receptor corepressor a silencing mediator for retinoid and thyroid receptor)
NID	Doména vyskytující se v proteinu LEDGF/p75 (z angl. NCoR/SMRT co-repressor interaction domain)
NLS	Jaderný lokalizační systém (z angl. nuclear localization signal)
NTD	N-koncová doména (z. angl. N-terminal domain)
OD_{550}	Optická denzita při vlnové délce 550 nm
pH	Vodíkový exponent (z angl. potential of hydrogen)
PI3K	Fosfatydylinositol-3 kináza
PogZ	Interakční partner LEGF/p75 se zinkovým prstem (z angl. pogo transposable element with zinc finger domain)
PSIP1	Jiné označení proteinu LEDGF/p75 (z angl. PC4 and SFRS1 interacting protein 1)
PWWP doména	Doména obsahující Pro-Trp-Trp-Pro sekvenci
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RPM	Počet otáček za minutu (z angl. rotation per minute)
SDS-PAGE	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
T7	Typ fága
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfan
TEMED	N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin
TRD	Transkripční represní doména (z angl. transcriptional repressor domain)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethanu
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
v.v.i.	Veřejná výzkumná instituce

Obsah

1 Úvod 10
1.1 Organizace DNA 10
1.2 Epigenetika 12
1.2.1 Methylace DNA 12
1.2.2 Modifikace histonů 13
1.2.2.1 Methylace histonů 13
1.2.2.2 Acetylace histonů 13
1.2.2.3 Fosforylace histonů 13
1.2.2.4 Další histonové modifikace 14
1.2.3 Chromatin remodelující komplexy 14
1.3 LEDGF/p75 15
1.3.1 LEDGF/p52 16
1.4 MeCP2 17
1.4.1 Rettův syndrom 18
2 Cíl 20
3 Materiál a metody 21
3.1 Materiál 21
3.1.1 Chemikálie 21
3.1.2 Enzymy a oligonukleotidy 23
3.1.3 Bakteriální kmeny a expresní plazmidy 23
3.1.4 Použitá media, pufry a roztoky 24
3.1.5 Ostatní materiál 26
3.1.6 Přístroje 26
3.2 Metody 27
3.2.1 Transformace bakterií plazmidovou DNA 27
3.2.2 Rekombinantní exprese proteinu 27
3.2.3 Rekombinantní exprese izotopově obohaceného ^{15}N MeCP2 28

3.2.4 Elektroforéza 28
3.2.4.1 SDS-PAGE 28
3.2.4.2 Detekce stříbrem 29
3.2.4.3 Detekce Coomassie Blue 29
3.2.4.4 Sušení gelu 29
3.2.5 Purifikace proteinu 29
3.2.5.1 Heparinová afinitní chromatografie 30
3.2.5.2 Iontově výměnná chromatografie 30
3.2.5.3 Niklová afnitní chromatografie 31
3.2.5.4 Štěpení TEV proteázou a afinitní chromatografie 31
3.2.5.5 Gelová permeační chromatografie 31
3.2.6 Ověření vazby proteinů 32
3.2.6.1 Gelová permeační chromatografie 32
3.2.6.2 NMR spektroskopie 32
4 Výsledky 34
4.1 Příprava a biofyzikální charakterizace variant LEDGF a MeCP2 34
4.1.1 Volba proteinových konstruktů 34
4.1.2 Exprese proteinů 34
4.1.3 Purifikace MeCP2 variant 36
4.1.4 Purifikace LEDGF/p52 39
4.1.5 Purifikace ostatních LEDGF variant 40
4.2 Ověření interakce proteinů 43
5 Diskuse 49
6 Závěr 52
7 Seznam použité literatury 53

1 Úvod

Deoxyribonukleová kyselina – DNA (z angl. deoxyribonucleic acid) je forma genetické informace uložená v jádře každé buňky. Eukaryotická DNA se skládá z jednotlivých nukleových bází, a kromě aktivně přepisovaných částí (tzv. exonů), kódujících jistou genetickou informaci, obsahuje i části aktivně nepřepisované (tzv. introny).

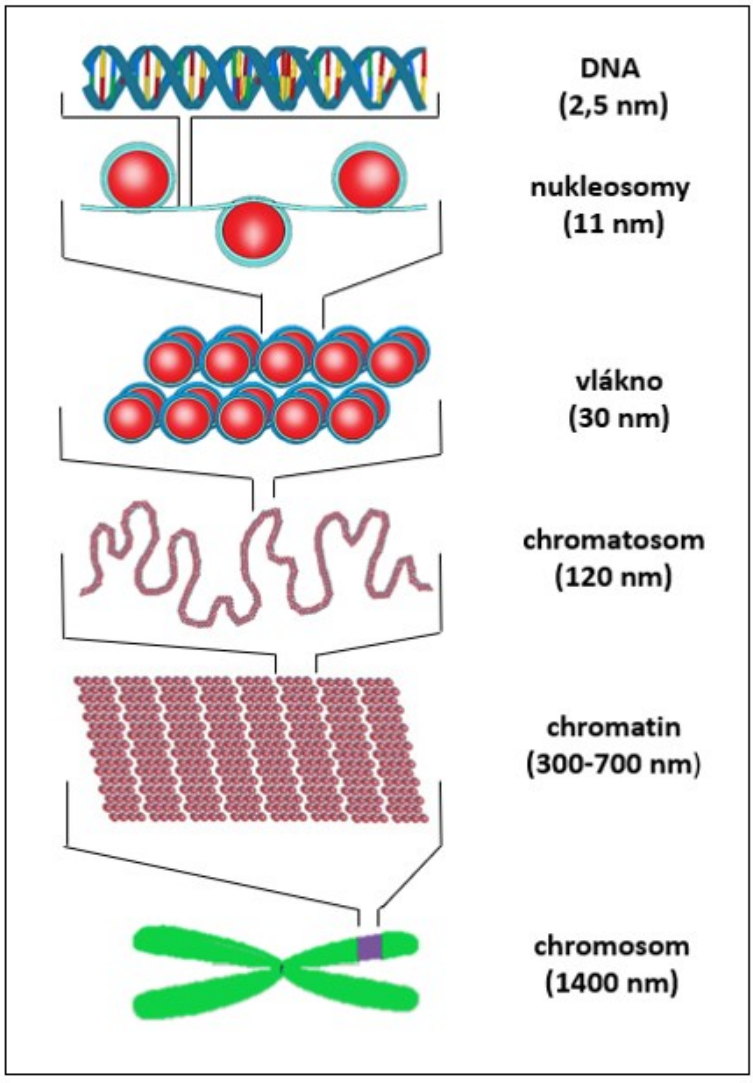
Pro projev dané genetické informace v organismu musí příslušné geny kódující specifické proteiny projít procesy zvanými transkripce a translace. Transkripcí je označován přepis genetické informace z DNA do RNA – ribonukleové kyseliny (z angl. ribonucleic acid) a translace je děj, při němž dochází k překladu genetické informace z mediátorové RNA (mRNA) na protein.

Mezi proteiny potřebné pro správnou transkripci patří i LEDGF/p75, řadící se mezi transkripční koaktivátory. LEDGF/p75 se účastní některých patogenních procesů jako je rakovina prostaty, HIV infekce nebo akutní leukemie [1, 2]. LEDGF/p75 se také pravděpodobně podílí na patogenezi Rettova syndromu způsobeného mutacemi v proteinu MeCP2, který s LEDGF/p75 interaguje. Cílem této práce je ověřit a dále specifikovat jejich interakci.

1.1 Organizace DNA

Dvoušroubovice DNA je v eukaryotní buňce kondenzovaná do chromozomů, což jsou supramolekulární a vysoce organizované struktury (Obrázek 1, str. 11). Samotný chromozom je složen ze stavebních kamenů zvaných nukleosomy, jedná se o proteiny někdy označované jako „korálky na niti“. Nukleosom tvoří úsek DNA obtočený kolem oktamerního komplexu tvořeného vždy dvěma kopiemi histonů H2A, H2B, H3 a H4. Histon H1 se váže z vnější strany nukleosomu a plní funkci jakéhosi zámku uzavírajícího závit DNA obtočeného okolo histonového jádra [3]. Celý tento útvar se označuje jako chromatosom. Mezi jednotlivými chromatosomy je úsek nekondenzované DNA o délce 10 až 100 párů bází. Takto poskládaný řetězec z chromatosomů tvoří chromatin, který kondenzuje do vyšších struktur až ke konečné struktuře chromosomu.

Sbalení DNA do vysokomolekulární struktury však nesmí zabraňovat transkripci. Části chromatinu musí být tedy stericky dostupné pro potřebné faktory a enzymy potřebné pro zmíněné procesy [4]. Velmi důležitou podmínkou je také reverzibilnost celého procesu kondenzace a rozbalování, která umožňuje remodelaci molekuly DNA do kompaktnějšího nebo naopak volnějšího uspořádání. Například při procesu přechodu mezi 11nm nukleosomy a 30nm vláknem (a jeho udržováním) hraje důležitou roli acetylace histonů, katalyzovaná enzymem histon-acetyltransferázou a zvratná enzymem histon-deacetylázou.

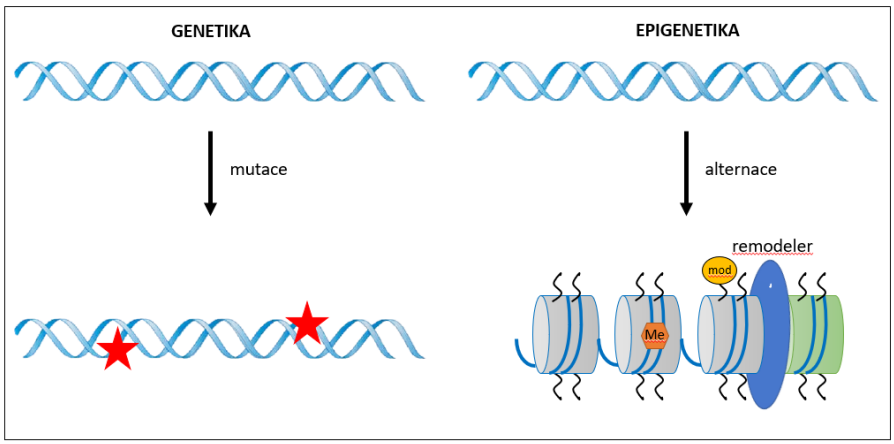


Obrázek 1 Schematické zobrazení postupné kondenzace DNA do supramolekulární struktury chromosomu.

1.2 Epigenetika

Epigenetika je vědní obor zabývající se studiem dědičných změn ve fenotypu, k nimž dochází beze změny v sekvenci DNA (Obrázek 2). Termín epigenetika byl poprvé použit v první polovině 20. století Conradem H. Waddingtonem, britským biologem, který se zabýval dědičností živočichů [5].

Hlavními mechanismy tohoto podoboru genetiky jsou kovalentní modifikace DNA, zejména methylace, modifikace histonů, remodelace chromatinu a RNA interference, z čehož jen první dva uvedené ovlivňují nukleosom a jsou charakterizovány chemickou změnou.



Obrázek 2 Znázornění zásadního rozdílu mezi genetikou a epigenetikou. GENETIKA: na templátu DNA (modrá dvoušroubovice) dochází k dědičným bodovým mutacím (červené hvězdy). EPIGENETIKA: dochází ke změnám v chromatinové struktuře na základě methylace DNA (Me), modifikaci histonů (mod), remodelací chromatinu (remodeler) a obměně složení histonu (zelený nukleosom).

1.2.1 Methylace DNA

Methylace DNA probíhá na nukleové bázi cytosinu kovalentním připojením methylového zbytku. Cytosin je methylován na páté pozici za přítomnosti enzymu DNA methyltransferázy. Tato epigenetická modifikace hraje roli například při genové expresi, inaktivaci chromosomu X a stabilizaci struktury chromatinu [5]. Tento proces probíhá zejména v genomu v oblastech CpG ostrůvků, které se vyznačují hojným zastoupením cytosin-guanin dinukleotidů a vyskytují se převážně v oblasti promotorů, kde jsou spojovány s permanentní a dědičnou změnou. Hypermethylované části genomu se objevují v repetitivních částech genomu a jsou transkripčně neaktivní, naopak hypomethylované části se vyskytují u „house-keeping“ genů, tedy genů udržujících esenciální funkce pro život buňky, a jsou transkripčně aktivní [6].

1.2.2 Modifikace histonů

Histony jsou globulární bílkoviny, které jsou bohaté na arginin a lysin, a mají tudíž v neutrálním prostředí kladný náboj, díky němu interagují se záporně nabitými fosfátovými zbytky polydeoxyribonukleotidového řetězce. Modifikace histonů probíhají na jejich N-konci (angl. „histon tail“), jsou reverzibilní a můžou ovlivnit genovou regulaci, opravy DNA nebo kondenzaci chromozomu [7].

1.2.2.1 Methylace histonů

Methylace histonů probíhá na argininových a lysinových zbytcích těchto globulárních proteinů. S rostoucí methylací roste bazicita komplexu, a tím i podpora tvorby heterochromatinu, tedy vysoce spiralizované a transkripčně neaktivní formy chromatinu. Heterochromatin převládá ve fázi dělení buňky.

Vazba methylové skupiny na zmíněném N-konci histonů, především na H3, je spojena s aktivací i represí genů. Methylace argininu je spojována hlavně s aktivací, zatímco methylace lysinu způsobuje aktivaci i represi genu. Tento děj probíhá za účasti enzymu histon-methyltransferázy.

1.2.2.2 Acetylace histonů

Acetylovaným místem histonu je Ɛ-aminoskupina lysinu. S rostoucí acetylací se snižuje bazicita komplexu, a tím je podporována tvorba euchromatinu, což je spiralizovaná, rozvolněná a transkripčně aktivní forma chromatinu. Acetylací lysinu dojde k oslabení vazby histonů s DNA [8] a vzájemné interakci nukleosomů, což vede k rozvolnění a destabilizaci struktury chromatinu. Acetylace probíhá za přítomnosti histon-acetyltransferáz a donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A [9].

1.2.2.3 Fosforylace histonů

Fosforylace histonů na jejich serinových a threoninových zbytcích je spojována s kondenzací chromatinu během buněčného dělení, čili vzniku heterochromatinu. Adice fosfátové skupiny na zbytky aminokyseliny v histonovém jádře je také zmiňována u celé řady buněčných procesů včetně replikace DNA, průběhu buněčného cyklu, regulace transkripce, apoptosy, buněčné odpovědi na stres a dalších [10]. Fosforylace je regulována fosfatázami a kinázami.

1.2.2.4 Další histonové modifikace

Mezi relativně nově objevené histonové modifikace patří ubiquitinace, SUMOylace a laktylace. Ubiquitin je vysoce konzervovaný polypeptid o délce 76 aminokyselin vyskytující se ve všech eukaryotních buňkách. Samotný proces ubiquitinace probíhá na histonových lysinech prostřednictvím sekvenčního působení 3 enzymů (E1, E2 a E3), jehož substrátovou specifitu a stupeň ubiquitinace určují enzymatické komplexy. U histonů se jako nejdůležitější jeví mono-ubiquitinace, která se v případě histonu H2A podílí na umlčování genů a v případě histonu H2B hraje roli v transkripční iniciaci a elongaci. SUMO (z angl. small ubiquitin-like modifier) je malá molekula podobná ubiquitinu a SUMOylace je, stejně jako ubiquitinace, modifikace histonového lysinu. Zdá se, že kovalentní připojení SUMO molekuly funguje jako antagonista acetylace a ubiquitinace, které by se jinak mohly vyskytnout na stejném lysinovém postranním řetězci, čímž je SUMOylace spojována s represivními funkcemi.

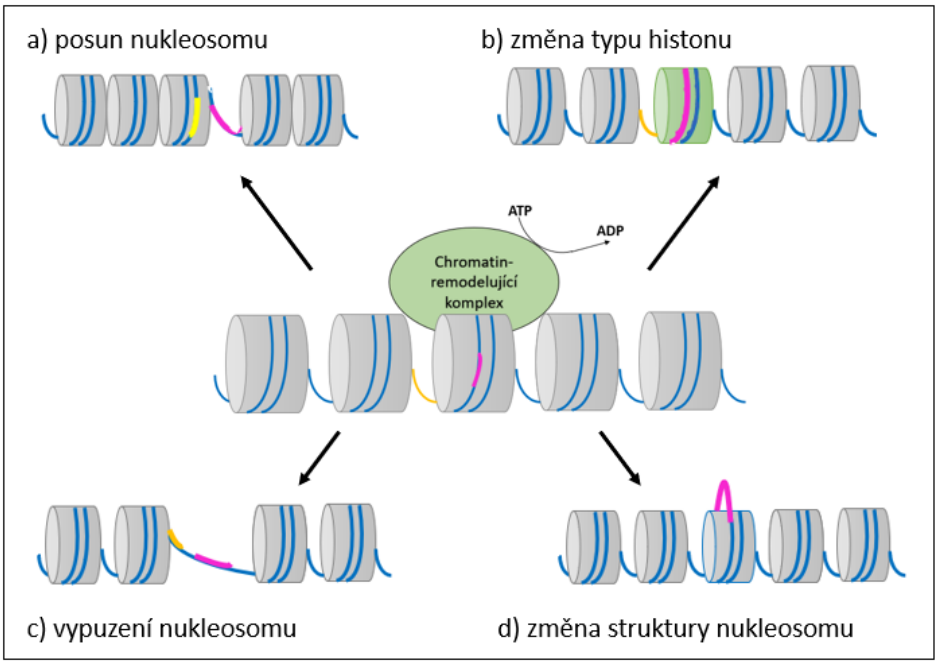
K dnešnímu datu je histonová laktylace poslední objevenou epigenetickou modifikací, a tudíž její přesné funkce a mechanismy nejsou plně pochopeny. Zhang a jeho kolegové, kteří laktylaci lysinů na histonech objevili [11], zjistili, že zvýšení intracelulární hladiny laktátu v buňkách makrofágů (stimulovány molekulami napodobující bakteriální infekci) vede k laktylaci histonů v sekvenci DNA promotoru. Také uvádějí, že zvýšení lysinové laktylace je zpožděno po stimulaci makrofágů, které koreluje se změnami v expresi homeostatických genů zapojených do udržování stabilního biologického stavu. Proto existuje předpoklad, že laktylace vytváří „laktátový časovač“ k obnovení normální tkáňové funkce po infekci [12].

1.2.3 Chromatin remodelující komplexy

Chromatin remodelující komplexy jsou zapojeny do řady buněčných procesů zahrnujících transkripční aktivaci a represi, kondenzaci chromatinu a jeho organizaci a buněčnou diferenciaci. Komplexy ke své činnosti využívají energii z hydrolýzy ATP.

Katalýzou ATP-dependentních změn v chromatinové struktuře napomáhají chromatinové remodelery transkripčním faktorům, a dalším regulačním proteinům, získat přístup k sekvencím DNA, které jsou jinak nepřístupné kvůli své vazbě na histonové proteiny.

Mezi základní čtyři mechanismy účinku chromatin remodelujících komplexů patří: posun nukleosomu podél DNA, změna struktury nukleosomu vytvořením smyčky a zpřístupněním DNA pro transkripci na jeho povrchu, výměna typu histonu za jiný a posledním a nejradikálnějším mechanismem je úplné vypuzení nukleosomu pro zpřístupnění velkého úseku DNA (Obrázek 3). Mechanismy jsou často závislé na dalších proteinech [13].



Obrázek 3 Zobrazení ATP-dependentních chromatin remodelujících mechanismů. Středový obrázek znázorňuje počáteční stav chromatinu, kde je nukleosomální DNA vyznačena růžově a spojovací DNA žlutě. a) posun nukleosomů podél DNA, pro odhalení dříve nedostupné části vlákna; b) změna složení histonu; c) vypuzení nukleosomu za účelem zpřístupnění větší části DNA; d) vytvoření smyčky DNA na povrchu nucleosomu. Obrázek byl upraven dle [13].

1.3 LEDGF/p75

LEDGF/p75, z anglického Lens epithelium-derived growth factor, je všudypřítomný protein lidského těla, jehož primární sekvenci tvoří 530 aminokyselinových zbytků o celkové molekulové hmotnosti kolem 60,5 kDa [14]. V původních studijích byl LEDGF/p75 definován jako transkripční koaktivátor související se stresem [13, 14], který podporuje přežití buněk udržováním transkripce elementů odpovědných za stresové odpovědi [17], a je upregulován za stresových podmínek [18] - mezi něž se může řadit teplo, hladovění séra, radiace nebo chemoterapie [17, 18]. Dále je LEDGF/p75 spojován s autoimunitní odpovědí [21], ovlivněním genové exprese v průběhu embryogeneze [22] a ochranou rakovinné buňky před lysozomální buněčnou smrtí [23]. Důležitou roli má

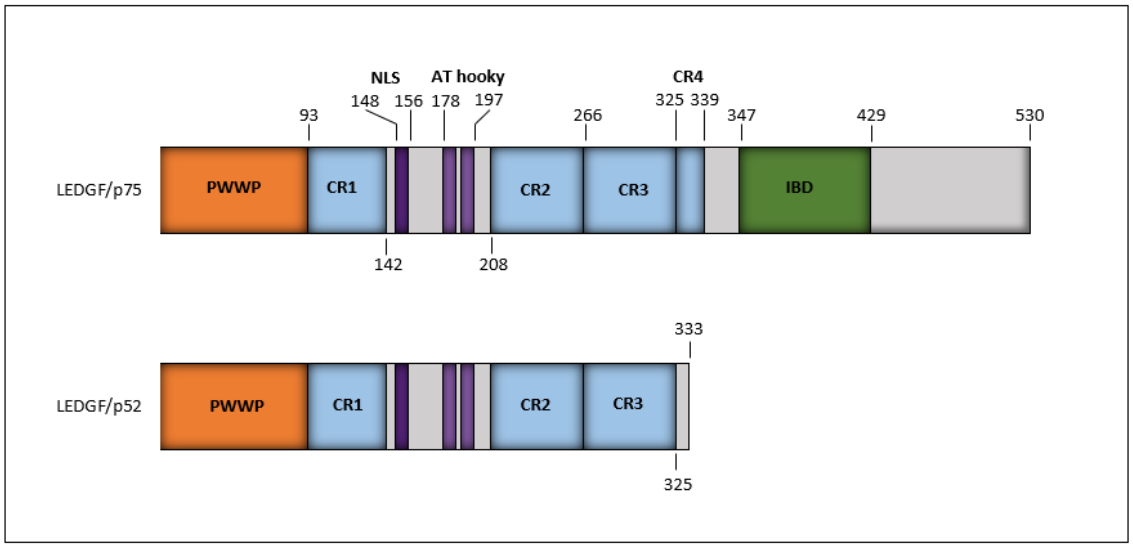
i v různých patogenních procesech jako jsou autoimunitní poruchy, rakovina prostaty [24], akutní leukemie, HIV infekce či Rettův syndrom [25].

HRP rodina, z angl. hepatoma-derived growth factor (HDGF) related protein family, do které LEDGF/p75 patří, je charakteristická přítomností konzervované homologní amino-terminální HDGF (HATH) domény. HATH doména, známá také jako Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) doména, je přítomna v různých proteinech, většinou vázajících DNA a lokalizovaných v jádře [26]. LEDGF je díky PWWP doméně schopen specificky vázat di- nebo trimethylovaný lysin36 na histonu 3, což je epigenetická značka transkripčně aktivního chromatinu. Kromě toho dokáže vázat nukleosomální DNA, čímž se doména stává nezbytnou pro dynamické skenování chromatinu [27]. Mezi další domény, které LEDGF/p75 obsahuje, patří: nabité oblasti 1-4 (CR1-4), jaderný lokalizační signál (NLS), AT-vazebné domény (AT-hooks) a integrázu vázající doménu (IBD) [28] (Obrázek 4, str. 17).

Mezi známé interakční partnery LEDGF/p75 patří HIV integráza, JPO2, regulátor fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) katalyzující vazbu fosfátové skupiny na fosfatidylinositol, Cdc7-aktivátor kinázy S-fáze buněčného cyklu (CDC7-ASK), PogZ, protein se zinkovým prstem, a MLL1-MENIN komplex [29]. Všichni zmínění partneři interagují s LEDGF/p75 přes IBD doménou, která získala název dle prvního objeveného vazebného partnera (HIV integrázy) a vyskytuje se u C-konce tohoto proteinu. Díky této doméně jsou proteiny a komplexy vázány a následně zařazeny do chromatinu. Dalším interakčním partnerem LEDGF/p75 je protein MeCP2, který se ale neváže na LEDGF přes IBD doménu.

1.3.1 LEDGF/p52

LEDGF/p75 a LEDGF/p52 jsou dvě izoformy jednoho proteinu, přičemž obě jsou odvozeny od stejného PSIP1 genu. LEDGF/p52 je kratší variantou LEDGF/p75 a jeho primární sekvenci tvoří 333 aminokyselin, proteiny sdílí stejnou N-koncovou část [24] (Obrázek 4, str 17). Sestřihově kratší varianta proteinu tedy obsahuje stejné domény jako delší forma, s výjimnkou IBD domény, což má za následek zmenšení počtu interakčních partnerů. Z dříve zmíněných interakčních partnerů interaguje LEDGF/p52 pouze s MeCP2.



Obrázek 4 Znázornění a porovnání struktury LEDGF/p52 a LEDGF/p75. PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) doména na N-konci je nezbytná pro dynamiku skenování chromatinu. Mezi domény následující po PWWP doméně patří: nabité oblasti 1-4 (CR 1-4), jaderný lokalizační signál (NLS), 2 AT-vázající domény (AT-hooky) a integrázu vázající doména (IBD) nacházející se v C-koncové části LEDGF/p75.

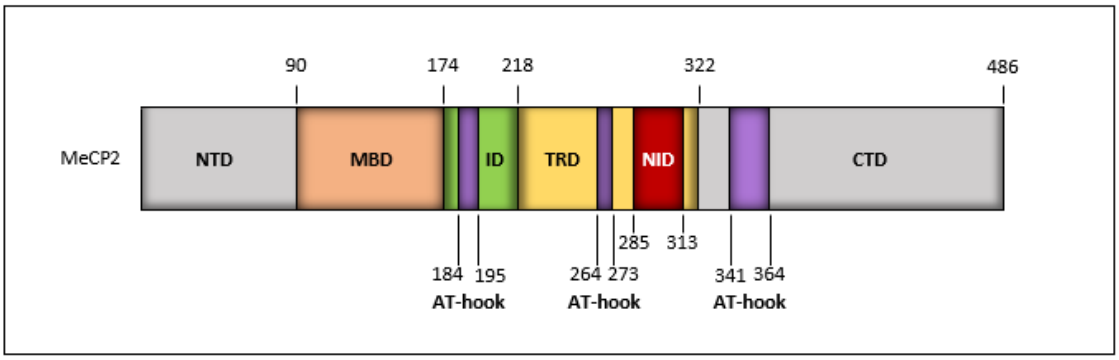
1.4 MeCP2

Nukleární protein MeCP2, z anglického methyl-CpG-binding protein 2, je charakteristický vazbou methylovaného nukleotidu cytosinu následovaného guaninem. V lidském těle je všudypřítomný, nejvíce je však zastoupen v mozku, kde je jeho hladina kritická pro správný vývoj jedince. Chová se jako transkripční modulátor, jehož funkcí je proto aktivace nebo represe genu v závislosti na molekulárním a buněčném kontextu [28]. Chromatin může ovlivnit změnu velikosti heterochromatinu udržováním chromatinové smyčky [30, 31] nebo působením na kompaktní chromatin [32, 33].

Mezi další funkce MeCP2 patří vazba a potlačení methylovaných LTR (z angl. long terminal repeats) promotorů. LTR promotory vznikají reverzní transkripcí retrovirální RNA využívané viry pro vložení vlastního genetického materiálu do genomu hostitele. Tento protein je také zapojen v regulaci sestřihu RNA, konkrétně interaguje s faktory pro regulaci sestřihu genů glutamátového receptoru, který zprostředkovává drtivou většinu vzrušivých synaptických transmisí v mozku [34], jak bylo ukázáno u myšího modelu Rettova syndromu.

MeCP2 se skládá z 486 aminokyselinových zbytků s molekulovou hmotností kolem 52 kDa a obsahuje několik strukturních domén: N-koncovou doménu (NTD), methyl-vázající doménu nezbytnou pro vazbu methylovaných CpG dinukleotidů (MBD), intervenující doménu (ID), transkripční represní doménu (TRD) důležitou pro interakci

s histonovými modifikátory a korepresory a C-koncovou doménu (CTD). Mimo to se v proteinu nachází 3 AT-vazebné domény a NCoR/SMRT korepresorová interakční doména (NID) (Obrázek 5).



Obrázek 5 Schematické znázornění struktury MeCP2 sestávající se z N-koncové domény (NTD), methyl-vázající domény (MBD), intervenující domény (ID), transkripční represní domény (TRD), C-koncové domény (CTD), 3 AT-vazebných domén (AT-hook) a NCoR/SMRT korepresorové interakční domény (NID).

Při poruchách exprese proteinu MeCP2 se projevuje takzvaný MeCP2 duplikační syndrom, který postihuje převážně muže. Jedinci jsou diagnostikováni během prvních let života na základě symptomů mezi něž patří: zpožděný motorický vývoj, epilepsie, zpoždění řeči a autismus [35]. Při mutaci MeCP2 dochází k závažné neurodevelopmentární poruše zvané Rettův syndrom.

1.4.1 Rettův syndrom

Rettův syndrom je gonozomálně dominantní onemocnění spojené s chromozomem X postihující přibližně 1 z 10 000 žen a řadí se mezi poruchy autistického spektra [13]. Je to progresivní neurologická porucha, která je nejčastější příčinou mentálního postižení dívek. Děti se do 6 – 18 měsíce po narození vyvíjejí zcela normálně, pak následuje zhoršení mozkové funkce, což se projevuje jazykovou regresí, ztrátou jemné motoriky a celkového účelného pohybu rukou, mikrocefalií a záchvaty [34]. MeCP2 mutace, Rettův syndrom, může postihovat i muže, má však za následek těžké vrozené encefalopatie a smrt do dvou let života [35].

Toto onemocnění je způsobeno mutací v proteinu MeCP2, přesněji v jeho MBD a NID doméně [36]. Nejvyšší koncentrace tohoto proteinu je v mozku, kde byla také na myším modelu odhalena jeho fyzická interakce s LEDGF [34]. Bylo zjištěno, že LEDGF interaguje s MeCP2 přes svou PWWP-CR1 doménu, ale jakou částí se naopak MeCP2 váže

k LEDGF není přesně známo. Nedávno [34] bylo jako interakční místo MeCP2 s LEDGF navrženo část TRD a NID domény. LEDGF tedy může hrát roli v patogenezi Rettova syndromu - z důvodu možného narušení interakce s MeCP2 skrz mutovanou NID doménu. Potvrzení této teorie by mohlo přispět k možnosti léčby Rettova syndromu.

2 Cíl

- Vypracovat literární rešerši na téma „Epigenetická regulace transkripce a biologické role proteinů LEDGF/p75 a MeCP2“.
- Příprava různých variant LEDGF/p75 a MeCP2 proteinů v dostatečné čistotě pomocí heterologní exprese v *E. coli*.
- Ověřit vazbu těchto proteinů pomocí biochemických a biofyzikálních metod.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

2-merkaptoethanol (BME)	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Biotika, Slovenská republika
Biotin	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Lachema, Česká republika
SimplyBlue SafeStain	Invitrogen, USA
D_2O	Euriso-top, France
D-Glukosa	Sigma-Aldrich, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, USA
Dodecyl síran sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenuhličitan sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid kobaltnatý	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid manganatý	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid měďnatý	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid zinečnatý	Lachema, Česká republika
Chlorid železitý	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Penta, Česká republika

Ethyl-β-D-thiogalaktosid (ETG)	Carbosynth, UK
Ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd	Lachema, Česká republika
Glycerol	Penta, Česká republika
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
N-2-hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný	Lachema, Česká republika
Imidazol	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková	Lachema, Česká republika
Kyselina octová	Lachema, Česká republika
Kyselina boritá	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Penta, Česká republika
N,N,N´, N´´-tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
Persíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free	Sigma-Aldrich, USA
Síran amonný-15N, ≥99 %	Cambridge isotope laboratories, UK
Síran hořečnatý	Sigma-Aldrich, USA
Síran sodný	Sigma-Aldrich, USA
Thiamin	Sigma-Aldrich, USA
Thiosíran sodný	Sigma-Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Uhličitan sodný	Penta, Česká republika

3.1.2 Enzymy a oligonukleotidy

TEV proteáza (rekombinantně připravena ve školící laboratoři, obsahuje His_6 kotvu na N-konci)

Lysozym chlorid (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3 Bakteriální kmeny a expresní plazmidy

***Escherichia coli* BL21 (DE3)** (New England BioLabs, Velká Británie): *E. coli* s DE3 profágem λ, nesoucím gen T7 RNA polymerasy pod transkripční kontrolou promotoru P_{lac}UV5; postrádá membránovou proteázu OmpT a cytoplasmatickou proteázu lon; je uzpůsoben k expresi rekombinantních proteinů.

Plazmidy: Plazmidy (p1432, p1508, p1571, p1694, p1695, p1698, p1699 a p1700) pro heterologní exprese různých forem proteinů LEDGF a MeCP2 byly připraveny na školícím pracovišti RNDr. Milanem Fábrym, CSc. Každý plazmid obsahuje syntetický gen kódující určitou část daného proteinu ve standardním expresním vektoru typu pET. Vektor je pod kontrolou indukovatelného T7 promotoru (pocházejícího z fága T7) a poskytuje rekombinantní produkt ve formátu: histidinová kotva (6xHis) – štěpné místo pro TEV proteázu – daný protein. Po odštěpení histidinové kotvy zůstává na N-konci produktu 5 aminokyselinových zbytků SNAAS.

Tabulka 1 Přehled použitých plazmidů a proteinových částí jež kódují

číslo plazmidu	protein	kódovaná část proteinu	histidinová kotva
p1432	LEDGF/p52	1-333 aa	ne
p1571	LEDGF	92-333 aa	ano
p1698	LEDGF	1-163 aa	ano
p1699	LEDGF	1-221 aa	ano
p1700	LEDGF	1-268 aa	ano
p1508	MeCP2	153-335 aa	ano
p1694	MeCP2	153-253 aa	ano
p1695	MeCP2	253-355 aa	ano

3.1.4 Použitá media, pufry a roztoky

TRANSFORMACE PLASMIDOVOU DNA A REKOMBINANTNÍ EXPRESE

LB (Luria-Bertani) agar: 35 mg/ml agar (Sigma, USA); 0,1 mg/ml ampicilin, 1% (w/v) glukosa

LB (Luria-Bertani) médium: 20 g/l LB Broth (Sigma, USA); 0,1 mg/ml ampicilin, 0,4% (v/v) glycerol

Minimální médium: 7,6 mM $(NH_4)_2SO_4$; 19 mM Na_2HPO_4; 22 mM KH_2PO_4; 8,6 mM NaCl; 0,13 mM Na_2SO_4; 0,17 mM EDTA; 0,13 mM $MnCl_2$; 18 µM $FeCl_3$; 4 mM $ZnCl_2$; 0,6 µM $CuCl_2$; 0,78 µM $CoCl_2$, 1,6 mM H_3BO_3; 0,98 mM $MgSO_4$; 0,3 M $CaCl_2$; 4 mM d-Biotin; 3,8 mM Thiamin

IZOLACE ROZPUSTNÉHO PROTEINU

Lyzační pufr: 25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,5; 0,05% (v/v) BME, 10 µM EDTA

NIKLOVÁ AFINITNÍ CHELATAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Ekvilibrační pufr: 25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,5; 0,05% (v/v) BME, 10 µM EDTA

Eluční pufr: 25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,5; 0,05% (v/v) BME, 10 µM EDTA, 300 mM imidazol

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Chromatografický pufr: 25 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5; 0,05% (v/v) BME, 10 µM EDTA

Chromatografický pufr pro plazmid 1432: 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,6; 0,05% (v/v) BME

HEPARINOVÁ AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Lyzační (nanášecí) pufr: 30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7; 0,05% (v/v) BME

Eluční pufr: 30 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 7; 0,05% (v/v) BME

IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE MonoS

Nanášecí pufr: 50 mM HEPES, pH 7,6; 0,05% (v/v) BME

Eluční pufr: 50 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7,6; 0,05% (v/v) BME

ROZTOKY PRO PŘÍPRAVU POLYAKRYLAMIDOVÉHO GELU

Dělící gel: 15% nebo 17,5% (w/v) AA; 375 mM Tris, pH 8,8; 1 mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) persíran amonný

Zaostřovací gel: 5% (w/v) AA; 125 mM Tris pH 86,8; 1 mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) persíran amonný

ELEKTROFORÉZA V POLYAKRILAMIDOVÉM GELU

Elektrodový pufr: 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 200 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS

Vzorkový pufr: 125 mM Tris pH 6,8; 10% (v/v) BME, 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (v/v) bromfenolová modř

DETEKCE STŘÍBREM

Fixační roztok: 12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol; 0,05% (v/v) formaldehyd

Roztok methanolu: 50% (v/v) methanol

Roztok $Na_2S_2O_3$: 0,8 mM $Na_2S_2O_3$

Roztok $AgNO_3$: 12 mM $AgNO_3$; 0,07% (v/v) formaldehyd

Vyvolávací roztok: 570 mM Na_2CO_3; 0,05% (v/v) formaldehyd; 16 µM $Na_2S_2O_3$

Roztok zastavující vyvolávání: 12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol

Uchovávací gel: 50% (v/v) methanol

DETEKCE COOMASSIE BLUE

Barvicí roztok: SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, USA)

Odbarvovací roztok: 10% (v/v) kyselina octová, 25% (v/v) methanol

SUŠENÍ GELŮ

Sušící roztok: 20% ethanol a 3% glycerol

NMR SPEKTROSKOPIE

NMR pufr: 25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,5; 1 mM TCEP, 10 µM EDTA, 0,01% NaN_3

HEPES pufr: 30 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,0; 1 mM TCEP

3.1.5 Ostatní materiál

- celulosová dialyzační membrána, mezní velikost pórů 12 kDa (Sigma-Aldrich, USA)
- HIS-selektivní niklový afinitní gel (Sigma-Aldrich, USA)
- HiTrap Heparin HP 5 ml (GE Healthcare Life Sciences, Velká Británie)
- koncentrátory Microcon nebo Amicon Ultra, mezní velikost pórů 3, 5, 10 a 30 kDa, (Merck Millipore, USA)
- Mono S 5/50 (GE Healthcare Life Sciences, Velká Británie)
- přírodní celofán na sušení gelů pro SDS-PAGE (Pemar, Česká republika)
- standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Broad Range (Bio-Rad, USA)
- standard molekulových hmotností pro gelovou chromatografii (Sigma-Aldrich, USA)
- Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences, Velká Británie)
- Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences, Velká Británie)

3.1.6 Přístroje

centrifugy	Hettich EBA 12R, rotor 1412, (Zentrifugen, Německo) Mini Spin (Eppendorf, Německo) Beckman Avanti J-E, rotory JA 9.1, JA 20 (USA) Beckman Avanti JXN-30, rotory JA 14 (USA)
spektrofotometry	Ultrospec 3100pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Velká Británie) NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
souprava na elektroforézu	Mighty Small II SE250 (Hoefer™ Scientific Instruments, USA) Zdroj EV243 (Consort, Belgie)
váhy	Kern PRS 620-3 (Německo) Adventure TM Pro AV2102CM (O´haus, USA)
sonikátor	Sonic Dismembrator (Dynatech, Francie)
rotační inkubátor	Sanyo Orbital Incubator (Japonsko)
pH metr	GMH 3531 (Greisinger Electronic, Německo)

inkubátor	TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
vodní lázeň	GRANT (P-lab, Česká republika)
vortex	MS2 Minishaker (Schoeller Instruments, Česká republika) Stuart vortexmixer SA8 (Stuart Scientific, UK)
magnetická míchačka	Jenway 1000 (Hotplate and Stirrer, Velká Británie)
autokláv	Unisteri HP 336 – 1 (Německo)
kapalinové chromatografy	Äkta FPLC (GE Healthcare, Velká Británie) Äkta pure chromatography system (GE Healthcare, Velká Británie)

3.2 Metody

3.2.1 Transformace bakterií plazmidovou DNA

Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21 (DE3) byly transformovány příslušnou plazmidovou DNA metodou teplotního šoku. Do 100 µl suspenze těchto kompetentních bakteriálních buněk byl pipetován 1 µl roztoku expresního plazmidu (kapitola 3.1.3, str. 23). Takto připravená buněčná suspenze byla 30 minut uložena na ledu a poté přenesena na 90 vteřin do vodní lázně vytemperované na 42 °C, aby byla následně znovu uložena na 2 minuty na led. Tím byly buňky vystaveny teplotnímu šoku a byla umožněna jejich transformace expresním plazmidem. Dále bylo k suspenzi přidáno 900 µl LB media a celá směs byla ponechána na 1 hod v rotačním inkubátoru vytemperovaném na 37 °C při třepání 200 RPM. Po uplynutí inkubace bylo 300 µl buněčné suspenze rozetřeno na velkou LB agarovou plotnu (průměr 20 cm, 150 ml roztoku agaru) obsahující ampicilin (0,1 mg/ml) a glukosu (1% (w/v)). Plotna byla ponechána v inkubátoru přes noc při 37 °C.

3.2.2 Rekombinantní exprese proteinu

Následující den byly kolonie z plotny smyty 10 ml LB média, k němuž byl přidán ampicilin (0,1 mg/ml) a glycerol (0,4% (v/v)), čímž bylo získáno inokulum a na spektrofotometru Ultrospec 3100pro byla změřena jeho optická denzita při vlnové délce 550 nm (OD_{550}). Následně bylo inokulem zaočkováno 500 ml LB média (ve 2l Erlenmayerových baňkách) obsahující ampicilin (0,1 mg/ml) a glycerol (0,4% (v/v)) ideálně tak, aby výsledná OD_{550} startovní kultury byla kolem 0,1. Zaočkované LB médium

bylo umístěno do rotačního inkubátoru Sanyo vytemperovaného na 37 °C s otáčkami 200 RPM.

Po dosažení hodnoty OD_{550} 0,6 byly baňky s kulturou přeneseny do rotačního inkubátoru vytemperovaného na 18 °C, kde byly ponechány 20 minut vytemperovat na tuto teplotu při otáčkách 200 RPM. Dále byla provedena indukce exprese – do každé baňky byl pipetován roztok ETG (kapitola 3.1.1, str. 21) tak, aby jeho koncentrace v kultivačním médiu v případě plazmidu kódujícího protein LEDGF byla 400 μmol/l a v případě plazmidu kódujícího protein MeCP2 byla 250 μmol/l.

Kultivace byla ukončena po 20 hodinách. Baňky s buněčnou kulturou byly vyjmuty z rotačního inkubátoru a jejich obsah byl přenesen do centrifugačních nádob o objemu 1 l, v nichž byl centrifugován v předem vychlazené centrifuze Beckman Avanti J-E (5000xg, 20 min, 4 °C). Vzniklý sediment buněčné biomasy byl resuspendován na ledu a znovu centrifugován, tentokrát v centrifugačních kyvetách o objemu 250 ml v předem vychlazené centrifuze Beckman Avanti JXN-30 (5000xg, 25 min, 4°C). Vzniklé pelety byly zmraženy a uchovány při -20 °C.

3.2.3 Rekombinantní exprese izotopově obohaceného ^{15}N MeCP2

Izotopově obohacený ^{15}N MeCP2 byl připraven v minimálním mediu obsahující ampicilin (0,1 mg/ml) s použitím ^{15}N síranu amonného (1 g/l). Příprava bakteriální suspenze a následná rekombinantní exprese byla provedena obdobným způsobem jako v případě izotopově neobohaceného proteinu (kapitola 3.2.1 str. 27 a kapitola 3.2.2 str. 27).

3.2.4 Elektroforéza

3.2.4.1 SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) byla provedena ve vertikálním uspořádání na aparatuře Mighty Small II SE 250. Zaostřovací gel obsahoval 5% (w/v) akrylamid (AA), dělící gel pak 15% nebo 17,5% (w/v) AA v závislosti na velikosti proteinu.

Poté, co směs zaostřovacího a dělícího gelu plně zpolymerovala, byl gel připevněn do aparatury a zalit elektrodovým pufrem. Analyzované vzorky byly před nanesením na gel smíchány se vzorkovým pufrem (v poměru 2:1) a krátce povařeny. Elektroforéza byla

prováděna za laboratorní teploty při výkonu 7 W na zaostřovací i dělící gel, a byla ukončena při vyputování vzorků z gelu.

Jako standard molekulových hmotností byla používána směs proteinů „Broad Range“ (Bio-Rad), která obsahovala myosin (200 kDa), β-galaktosidasu (116,3 kDa), fosforylasu b (97,4 kDa), sérový albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonickou anhydrasu (31 kDa), trypsinový inhibitor (21,5 kDa), lysozym (14,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa).

3.2.4.2 Detekce stříbrem

Prvním krokem byla fixace gelu ve fixačním roztoku po dobu 20 min. Poté byl gel 3x omýván 50% (v/v) roztokem methanolu po dobu 5 min. Následně byl gel 20 s omýván roztokem $Na_2S_2O_3$ a párkrát opláchnut destilovanou vodou. Dále byl gel ponořen do roztoku $AgNO_3$, kde byl ponechán 15 min, aby byl poté omyt destilovanou vodou a vložen do vyvolávacího roztoku. Barvení bylo zastaveno roztokem zastavujícím vyvolávání a uložen do 50% (v/v) methanolu pro uchování.

3.2.4.3 Detekce Coomassie Blue

Nejprve byl gel 20 minut omýván destilovanou vodou a následně byl přesunut do barvícího roztoku. Po dostatečném obarvení byl gel odbarven odbarvovacím roztokem (kapitola 3.1.4, str. 24). Gel byl po odbarvení uchováván v 50% (v/v) methanolu.

3.2.4.4 Sušení gelu

Pro archivační a dokumentační účely byl gel máčen 10 minut v sušicím roztoku (kapitola 3.1.4, str. 24) a následně vysušen v napnuté celofánové fólii.

3.2.5 Purifikace proteinu

Pelety buněčné biomasy byly resuspendovány v lyzačním pufru (kapitola 3.1.4, str. 24), kdy na každý gram biomasy bylo přidáno 10 ml pufru, ke kterému byly přidány inhibitory proteas a lysozym (1% w/v). Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě, aby došlo k porušení buněčných stěn bakterií vlivem lysozymu. Následně bylo vždy 30 ml suspenze na ledu sonikováno (5x 2min) sonikátorem Dynatech při 60% výkonu. Vzniklý buněčný lyzát byl centrifugován v předem vychlazené centrifuze Beckman Avanti J-E (25000xg, 30 min, 4 °C). Získané supernatanty buněčného lyzátu byly drženy na ledu.

3.2.5.1 Heparinová afinitní chromatografie

V případě proteinu LEDGF/p52 délky 1-333 aa (plazmid 1432) byl bakteriální lyzát z důvodu nepřítomnosti histidinové kotvy purifikován v prvním kroku afinitní chromatografií na heparinové koloně (HiTrap Heparin HP 5 ml, GE Healthcare). Tento purifikační krok nabohatí LEDGF/p52 a pomůže k odstranění DNA. Kolonka byla připojena k FPLC stanici Äkta Pure a ekvilibrována nanášecím pufrem (kapitola 3.1.4, str. 24). Po nanesení vzorku na kolonu následovala tříkroková eluce. V prvním kroku byla kolona promyta 10 ml 20% elučního pufru (kapitola 3.1.4, str. 24), v druhém kroku následoval gradient elučního pufru do jeho 50% obsahu během 25 ml a ve třetím kroku dosáhl podíl elučního pufru 100 %, a to v průběhu 15 ml.

Následovala gelová permeační chromatografie na koloně pro rozdělení proteinů v intervalu od 20 do 600 kDa (Superdex 200 Increase 10/300 GL o objemu 24 ml) a byla prováděna v chromatografickém pufru pro plazmid 1432 (kapitola 3.1.4, str. 24). Díky těmto krokům byla ze vzorku odstraněna značná část přítomné nežádoucí bakteriální DNA.

3.2.5.2 Iontově výměnná chromatografie

Jako závěr purifikace proteinu LEDGF/p52 byla zvolena iontově výměnná chromatografie na Mono S 5/50 GL. Kolona byla připojena k FPLC stanici Äkta Pure a ekvilibrována nanášecím a elučním pufrem s 5% obsahem elučního pufru (kapitola 3.1.4, str. 24). Po nanesení vzorku byla provedena tříkroková eluce za konstantního průtoku 1,5 ml/min. Prvním krokem byla gradientová eluce elučním pufrem do jeho 60% obsahu během 20 ml, ve druhém kroku probíhala gradientová eluce elučním pufrem do jeho 100% obsahu v průběhu 5 ml a ve třetím kroku byla udržována 100% hladina elučního pufru po dobu 5 ml.

Tento krok purifikace byl použit také při konečném dočištění proteinu $MeCP2_{153-355}$, a to z důvodu odstranění DNA ze vzorku. Kolona Mono S 5/50 GL byla připojena k FPLC stanici Äkta Pure a ekvilibrována nanášecím a elučním pufrem na 10% obsah elučního pufru (kapitola 3.1.4, str. 24). Po nanesení byla provedena tříkroková eluce za konstantního průtoku 1,5 ml/min. Prvním krokem byla gradientová eluce elučním pufrem do jeho 50% obsahu během 15 ml, ve druhém kroku probíhala gradientová eluce elučním pufrem do jeho 65% obsahu v průběhu 10 ml a ve třetím kroku bylo dosaženo 100% hladiny elučního pufru v průběhu 4 ml.

Jednotlivé jímané frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy popsané v kapitole 3.2.4 (str. 28).

3.2.5.3 Niklová afnitní chelatační chromatografie

Niklová afinitní chelatační chromatografie byla prováděna v případě proteinů obsahujících histidinovou kotvu a probíhala v chladové místnosti při teplotě 4°C. Kolona (o objemu 15 ml) s Ni-NTA Agarosou (o objemu 5 ml) byla ekvilibrována ekvilibračním pufem (kapitola 3.1.4, str. 24) a následně na ni byl nanesen buněčný lyzát. Rychlost průtoku byla 1 ml/min. Kolona byla poté promyta 50 ml ekvilibračního pufru a 7 ml ekvilibračního pufru s přídavkem 10, 20, 30 a 40 mmol/l imidazolu. Pro eluci byl použit eluční pufr (kapitola 3.1.4, str. 24), a to 4x po 7 ml. Jednotlivé frakce byly jímány a následně analyzovány pomocí elektroforézy popsané v kapitole 3.2.4 (str. 28).

Frakce s detekovaným proteinem byly spojeny a převedeny dialýzou do pufru o složení 25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,05% (v/v) BME, 10 µM EDTA a 1 M NaCl.

3.2.5.4 Štěpení TEV proteázou a afinitní chromatografie

Před dalším purifikačním krokem bylo nutno odštěpit histidinovou kotvu. Štěpení probíhalo současně s dialýzou v pufru bez imidazolu. K roztoku s proteinem byla přidána TEV proteáza v poměru 1:50 (v/v) k substrátu. Štěpení probíhalo přes noc v chladové místnosti za teploty 4 °C a neustálého míchání na magnetické míchačce.

Poté byla opakována niklová afinitní chelatační chromatografie popsaná v kapitole 3.2.5.3 za účelem odstranění odštěpené histidinové kotvy a TEV proteázy.

3.2.5.5 Gelová permeační chromatografie

Jako další purifikační krok byla provedena gelová permeační chromatografie. Kolona byla vybrána pro rozdělení proteinů v intervalu od 3 do 70 kDa (Superdex 75 Increase 10/300 GL o objemu 24 ml) a byla připojena na FPLC stanici Äkta Basic nebo Äkta Pure.

Kolona byla ekvilibrována chromatografickým pufrem, který byl použit i jako mobilní fáze (kapitola 3.1.4, str. 24). Následně byl nanesen vzorek určený k separaci. Průtok kolony byl nastaven na 0,75 ml/min a eluční profil byl sledován spektrofotometricky při vlnových délkách 280, 260 a 216 nm a elektroforézou popsané v kapitole 3.2.4 (str. 28).

Kolona Superdex 75 10/300 GL byla kalibrována standardem molekulových vah, který obsahoval proteiny: dextran blue (2 MDa), hovězí sérový albumin (66 kDa),

karbonickou anhydrasu (29 kDa), cytochrom C (12,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa). Jako mobilní fáze byl pro kalibraci použit pufr o složení 50 mM Tris pH 7,5; 100 mM chlorid sodný.

3.2.6 Ověření vazby proteinů

3.2.6.1 Gelová permeační chromatografie

Ověření vazby proteinů bylo prováděno též gelovou permeační chromatografií, a to na koloně vhodné pro proteiny o velikosti 20 až 600 kDa (Superdex 200 Increase 10/300 GL o objemu 24 ml), která byla připojena na FPLC stanici Äkta Pure.

Kolona byla ekvilibrována chromatografickým pufrem, který byl použit i jako mobilní fáze (kapitola 3.1.4, str. 24). Proteiny určené k analýze byly vždy smíchány v určitém poměru, ponechány 30 min na ledu a teprve poté naneseny na kolonu, na které byl nastaven průtok mobilní fáze 0,75 ml/min.

Jednotlivé frakce byly detekovány spektrofotometricky při vlnových délkách 280, 260 a 216 nm. Následně byla prováděna analýza pomocí elektroforézy popsané v kapitole 3.2.4 (str. 28).

Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL byla kalibrována standardem molekulových vah, který obsahoval proteiny: alkohol dehydrogenázu (150 kDa), hovězí sérový albumin (66 kDa), karbonickou anhydrasu (29 kDa), cytochrom C (12,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa). Jako mobilní fáze byl pro kalibraci použit pufr o složení 25 mM Tris pH 7,5; 200 mM NaCl, 10 µM EDTA, 0,05% BME.

3.2.6.2 NMR spektroskopie

^{15}N nabohacený MeCP2 vzorek byl převeden do pufru o složení 25 mM deuterovaný Tris, pH 7,5; 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 10 µM EDTA, 0,01% NaN_3 a byl zakoncentrován na celkový objem 144 µl. Dále bylo ke vzorku přidáno 16 µl D_2O a celý roztok byl přenesen do 5 mm NMR kyvety.

Pro další experimenty byl ^{15}N nabohacený MeCP2 vzorek byl převeden do pufru o složení 30 mM HEPES pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP a byl zakoncentrován na celkový objem 350 µl. Dále bylo ke vzorku přidáno 18 µl D_2O a celý roztok byl přenesen do 3 mm NMR kyvety.

NMR spektra byla měřena při teplotě 298 K na přístroji 850 MHz Bruker AVAVANCE III spektrometru. Přístroj je vybavený kryosondou na měření jader ^{15}N-^{13}C-^{1}H. Data byla snímána pracovníky skupiny Strukturní biologie ÚOCHB. Byla měřena 1D vodíková a 2D HSQC spektra, která informují o vzájemné korelaci ^{1}H amidových vodíků a ^{15}N dusíků účastnících se peptidové vazby.

4 Výsledky

4.1 Příprava a biofyzikální charakterizace variant LEDGF a MeCP2

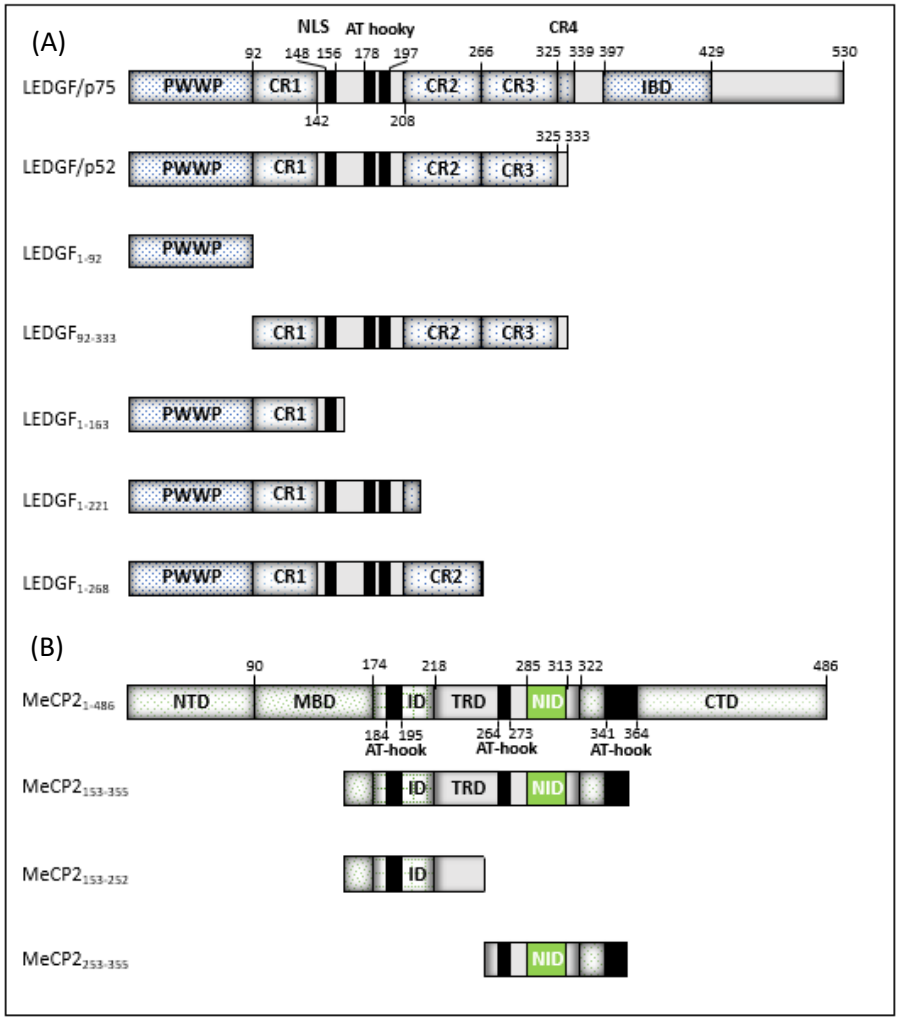
4.1.1 Volba proteinových konstruktů

Jednotlivé délkové varianty proteinu LEDGF byly voleny na základě již dříve provedených vazebných experimentů LEDGF s MeCP2 ve školící laboratoři. Z nich bylo patrné, že na interakci se podílí PWWP a část CR1 domény LEDGF proteinu. Z tohoto důvodu byly následné interakční experimenty prováděny převážně s konstrukty LEDGF/p52, $LEDGF_{1-92}$ (PWWP doménou) a $LEDGF_{1-163}$. Varianta $LEDGF_{1-221}$ byla zvolena s ohledem na AT-hooky a jejich potenciální roli v interakci. Totéž platí pro variantu LEDGF obsahující aminokyselinové zbytky 1-268, která slouží pro ověření role domény CR2. Poslední připravená varianta LEDGF, obsahující aminokyselinové zbytky 92-333, je důležitá k určení role LEDGF/p52 bez PWWP domény na interakci mezi LEDGF a MeCP2 (Obrázek 6, str. 35).

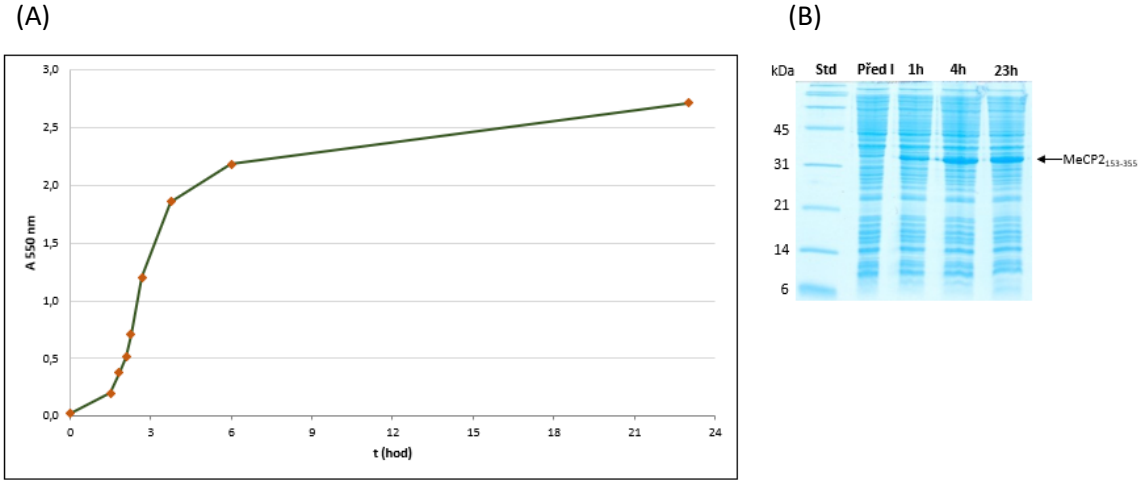
Délkové varianty proteinu MeCP2 byly vybrány na základě předpokladu vzniku vazby přes NID doménu ze strany MeCP2 proteinu. Varianta $MeCP2_{153-355}$ byla zkonstruována pro počáteční experimenty ověřující samotný vznik vazby mezi proteiny MeCP2 a LEDGF. Zbylé dvě varianty MeCP2 mají za úkol objasnit roli NID domény při interakci MeCP2 a LEDGF. (Obrázek 6, str. 35).

4.1.2 Exprese proteinů

Při kultivaci *Escherichia coli BL21* (DE3) v LB médiu bylo v závislosti na vloženém plazmidu vyprodukováno různé množství buněčné biomasy obsahující exprimovaný protein (Tabulka 2, str. 43). Příklad růstové křivky kultury *E. coli* je zobrazen na Obrázek 7 (A) na str. 35. Buněčná biomasa byla následně použita k purifikaci rekombinantního proteinu (kapitola 3.2.2, str. 27). Jednotlivé výsledné produkty připravené heterologní expresí obsahovaly na svém N-konci histidinovou kotvu (6xHis) a štěpné místo pro TEV proteázu. Výjimkou byl LEDGF/p52, který neobsahoval histidinovou kotvou ani štěpné místo pro TEV proteázu. Exprimované proteiny se nacházely převážně v rozpustné formě v cytoplazmě bakteriálních buněk, ze které byly následně purifikovány.



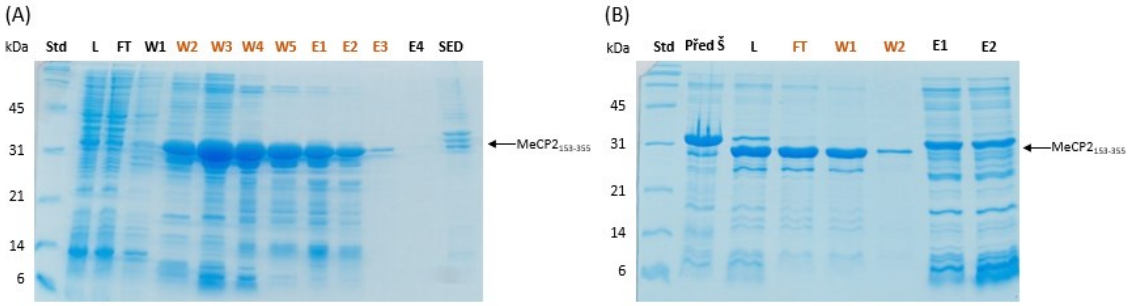
Obrázek 6 Přehled zvolených délkových variant proteinů určených k interakcím. (A) Konstrukty LEDGF. (B) Konstrukty MeCP2.



Obrázek 7 (A) Růstová křivka bakterií exprimujících MeCP2$_{153-355}$. (B) SDS-PAGE analýza obsahu proteinu v bakteriálních buňkách v průběhu exprese. Std – standard molekulových vah, Před I – frakce bakteriálních buněk před indukcí ETG, 1h – frakce bakteriálních buněk 1 hodinu po indukci, 4h – frakce bakteriálních buněk 4 hodiny po indukci, 23h – frakce bakteriálních buněk 23 hodin po indukci. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající MeCP2$_{153-355}$ s histidinovou kotvou. Protein byl detekován Coomassie Blue.

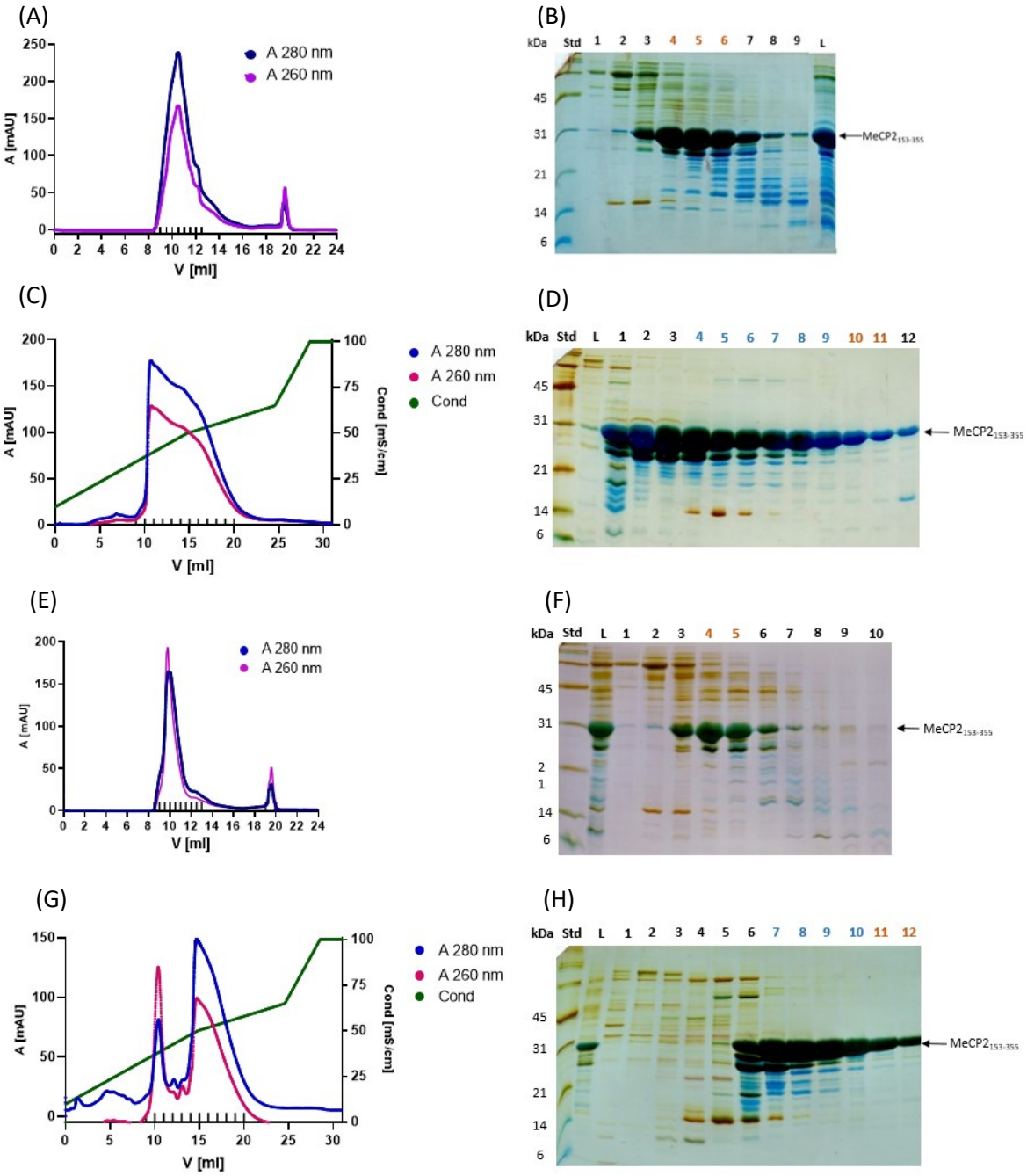
4.1.3 Purifikace MeCP2 variant

Jednotlivé varianty MeCP2 obsahovaly histidinovou kotvu a byly účinně purifikovány s využitím niklové afinitní chelatační chromatografie. Protein byl z kolony eluován gradientem 0-300 mM imidazolu v 9 frakcích o různých objemech (Obrázek 8 (A)) (kapitola 3.2.5.3, str. 31). K další purifikaci byly vybrány pouze frakce, které obsahovaly nejvíce daného proteinu s relativním minimem nežádoucích kontaminant (frakce W2-E3 na Obrázek 8 (A)). Histidinová kotva byla odštěpena TEV proteázou. Za účelem odstranění odštěpené histidinové kotvy a TEV proteázy od proteinu byl proteinový roztok znovu nanesen na niklovou afinitní chetalační chromatografii (Obrázek 8 (B)), protein po odštěpení histidinové kotvy zůstal převážně v proteklé a promývací frakci.



Obrázek 8 SDS-PAGE analýza průběhu purifikace proteinu $MeCP2_{153-355}$ niklovou afinitní chetlatační chromatografií. Proteiny byly detekovány Coomassie Blue. Oranžově označené frakce z jednoho kroku byly spojeny a použity do kroku dalšího. (A) První krok purifikace $MeCP2_{153-355}$ z bakteriálního lyzátu: Std – standard molekulových vah, L – nános (z angl. load), FT – proteklá frakce (z angl. flowthrough), W1 – frakce po promytí promývacím pufrem, W2-E4 – frakce s koncentračním gradientem imidazolu 10-300 mM, SED – sediment, nerozpustná frakce bakteriálních buněk po lýzi. (B) Druhý krok purifikace po odštěpení histidinové kotvy z $MeCP2_{153-355}$: Std – standard molekulových vah, Před Š – vzorek před štěpením TEV proteázou obsahující $MeCP2_{153-355}$ s histidinovou kotvou, L – vzorek po štěpení TEV proteázou obsahující $MeCP2_{153-355}$ po odštěpení histidinové kotvy nanesený na niklovou afinitní chelatační chromatografii, FT – proteklá frakce, W1, W2 – frakce po promytí promývacím pufrem, E1, E2 – frakce elucí 300 mM imidazolem. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající $MeCP2_{153-355}$ s histidinovou kotvou (A) a po jejím odštěpení (B).

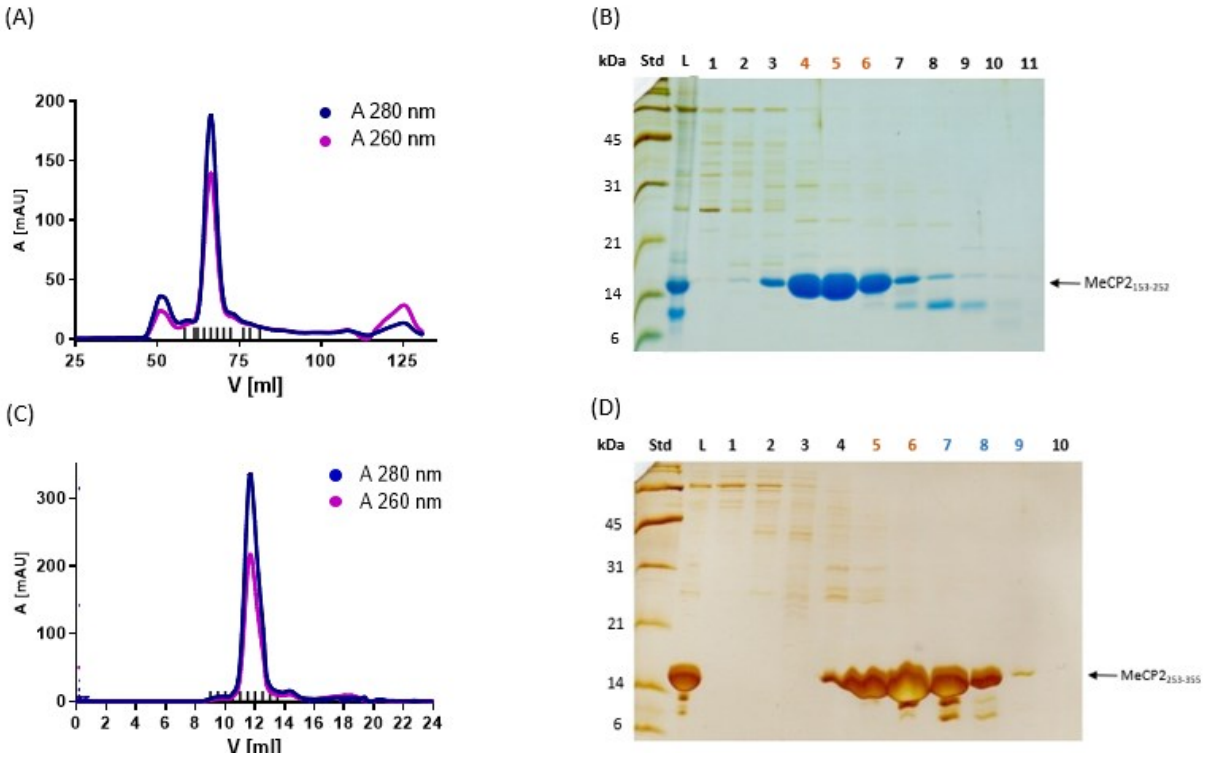
Proteinový roztok tvořený frakcemi FT, W1 a W2 byl zakoncentrován a dále čištěn gelovou permeační chromatografii na koloně Superdex 75 10/300 GL (kapitola 3.2.5.5, str. 31). Na chromatogramech pro jednotlivé varianty proteinů MeCP2 (příklad chromatogramu na Obrázek 9 (A), str. 37), byly pozorovány vrcholy při různých elučních objemech. Vybrané frakce z gelové permeační chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 9 (B), str. 37). Izotopově značená i neznačená varianta proteinu $MeCP2_{153-355}$ byla následně ještě nanesena na iontoměničovou chromatografii Mono S z důvodu odstranění DNA a dalších proteinových kontaminant ze vzorku. Koncentrace proteinů byla určena spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 280 nm.



Obrázek 9 Zobrazení chromatogramů z jednotlivých purifikačních kroků MeCP2$_{153-355}$ a jejich následné SDS-PAGE analýzy pro jednotlivé frakce naznačené vertikálními čarami. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající MeCP2$_{153-355}$. Oranžově označené frakce byly v každém kroku spojeny a použity do následného kroku, totéž bylo provedeno s frakcemi označenými modře. Protein byl detekován Coomassie Blue a stříbrem. (A) Chromatogram z purifikace gelovou permeační chromatografií Superdex 75 10/300 GL, frakce 1-9. (B) SDS-PAGE analýza z purifikace gelovou permeační chromatografií: Std – standard molekulových vah, 1-9 – frakce, L – nános. (C) Chromatogram z purifikace ionexovou chromatografií Mono S, frakce 1 – 12. (D) SDS-PAGE analýza z purifikace ionexovou chromatografií Mono S. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-12 – frakce. (E) Chromatogram z purifikace ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ gelovou permeační chromatografií Superdex 75 10/300 GL, frakce 1-10. (F) SDS-PAGE analýza z purifikace ^{15}N MeCP2$_{153-355}$. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-10 – frakce. (G) Chromatogram z purifikace ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ na ionexové chromatografii Mono S, frakce 1-12. (H) SDS-PAGE analýza z purifikace ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ na ionexové chromatografii Mono S. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-12 – frakce.

Izotopově obohacený ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ byl připraven dle optimalizovaného protokolu (kapitola 3.2.5, str. 29) v minimálním mediu s použitím ^{15}N síranu amonného. Výtěžek byl téměř o 60 % menší než u proteinu neznačeného a tento protein byl použit pro měření NMR experimentů. (Tabulka 2, str.43)

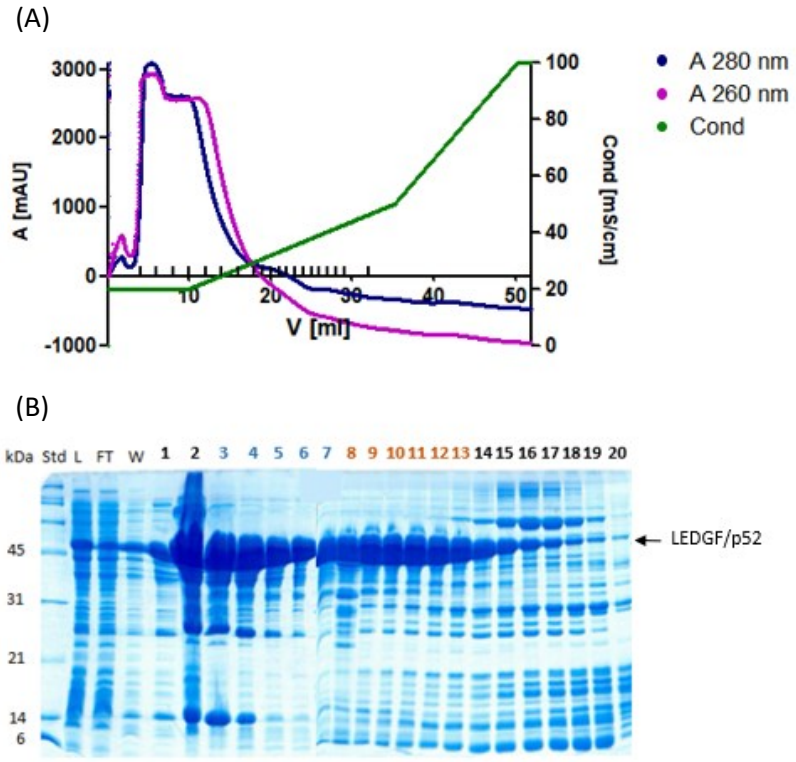
Ostatní připravované varianty MeCP2 byly purifikovány obdobně jako $MeCP2_{153-355}$ vyjma poslední iontoměničové chromatografie. Na Obrázku 10 jsou zobrazeny chromatogramy z gelových permeačních chromatografií a SDS-PAGE analýzy ostatních MeCP2 variant.



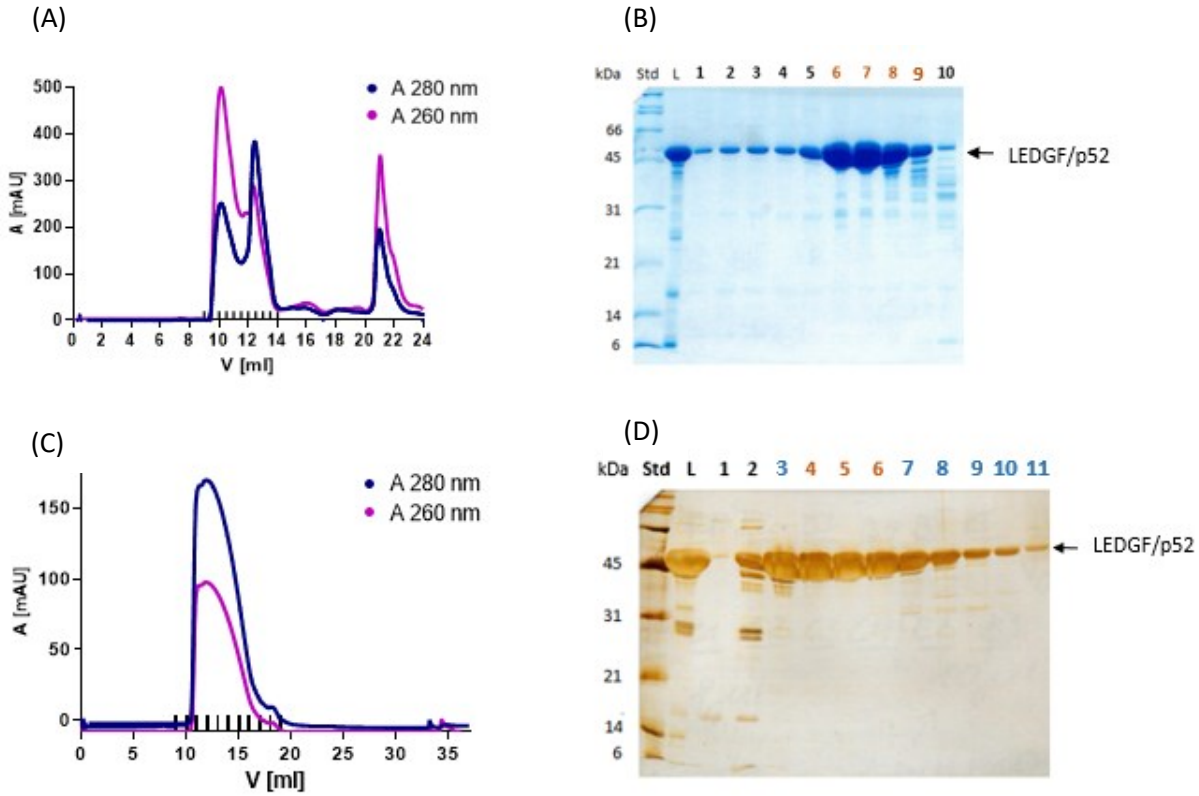
Obrázek 10 Zobrazení chromatogramů z jednotlivých purifikačních kroků MeCP2 variant a jejich následné SDS-PAGE analýzy pro jednotlivé frakce naznačené vertikálními čarami. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající purifikované variantě MeCP2. Oranžově označené frakce byly spojeny a použity do následného kroku, totéž bylo provedeno s frakcemi označenými modře. (A) Chromatogram z purifikace $MeCP2_{153-252}$ na gelové permeační chromatografii HiLoad Superdex 75 16/600 GL, frakce 1-11. (B) SDS-PAGE analýza z purifikace $MeCP2_{153-252}$. Std – standard molekulových vah, L – nános,1-11 – frakce. Protein byl detekován Coomassie Blue a stříbrem. (C) Chromatogram z purifikace $MeCP2_{252-355}$ gelovou permeační chromatografií Superdex 75 10/300 GL, frakce 1-10. (D) SDS-PAGE analýza z purifikace $MeCP2_{252-355}$. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-10 – frakce. Protein byl detekován stříbrem.

4.1.4 Purifikace LEDGF/p52

Varianta LEDGF/p52 byla kvůli nepřítomnosti histidinové kotvy purifikována jiným způsobem. Prvním krokem byla purifikace na heparinové koloně HiTrap. Při nastavování metody byl gradient chybně nastaven na 0,4-2 M NaCl (místo 0,1-2 M NaCl), i přesto se však podařilo získat relativně čistý protein. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 11). Frakce 3-13 byly spojeny do dvou frakcí, zakoncentrovány a dále čištěny na koloně pro gelovou permeační chromatografii Superdex 200 Increase 10/300 GL (kapitola 3.2.5.1, str. 30). Na chromatogramu byl pozorován jeden dominantní pík obsahující LEDGF/p52. Frakce z gelové permeační chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 12 (A, B), str. 40). Pro úplné dočištění proteinu byly frakce 6-9 z gelové permeační chromatografie spojeny a naneseny na ionexovou chromatografii Mono S. Frakce z Mono S byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 12 (C, D), str. 40) a zahuštěny do dvou frakcí. Frakce jedna se skládala z frakcí 4-6 a frakce dvě vznikla spojením frakcí 3 a 7-11. Koncentrace proteinu byla určena spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 280 nm.



Obrázek 11 (A) Chromatogram z purifikace LEDGF/p52 na heparinové koloně HiTrap Heparin. Vertikálními čarami jsou naznačeny jímané frakce 1-20. (B) SDS-PAGE analýza frakcí z purifikace LEDGF/p52. Std – standard molekulových vah, L – nános, FT – proteklá frakce, W – proteklé, 1-20 – frakce. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající LEDGF/p52. Oranžově označené frakce byly spojeny a použity do dalšího kroku, totéž bylo provedeno s frakcemi označenými modře. Protein byl detekován Coomassie Blue.

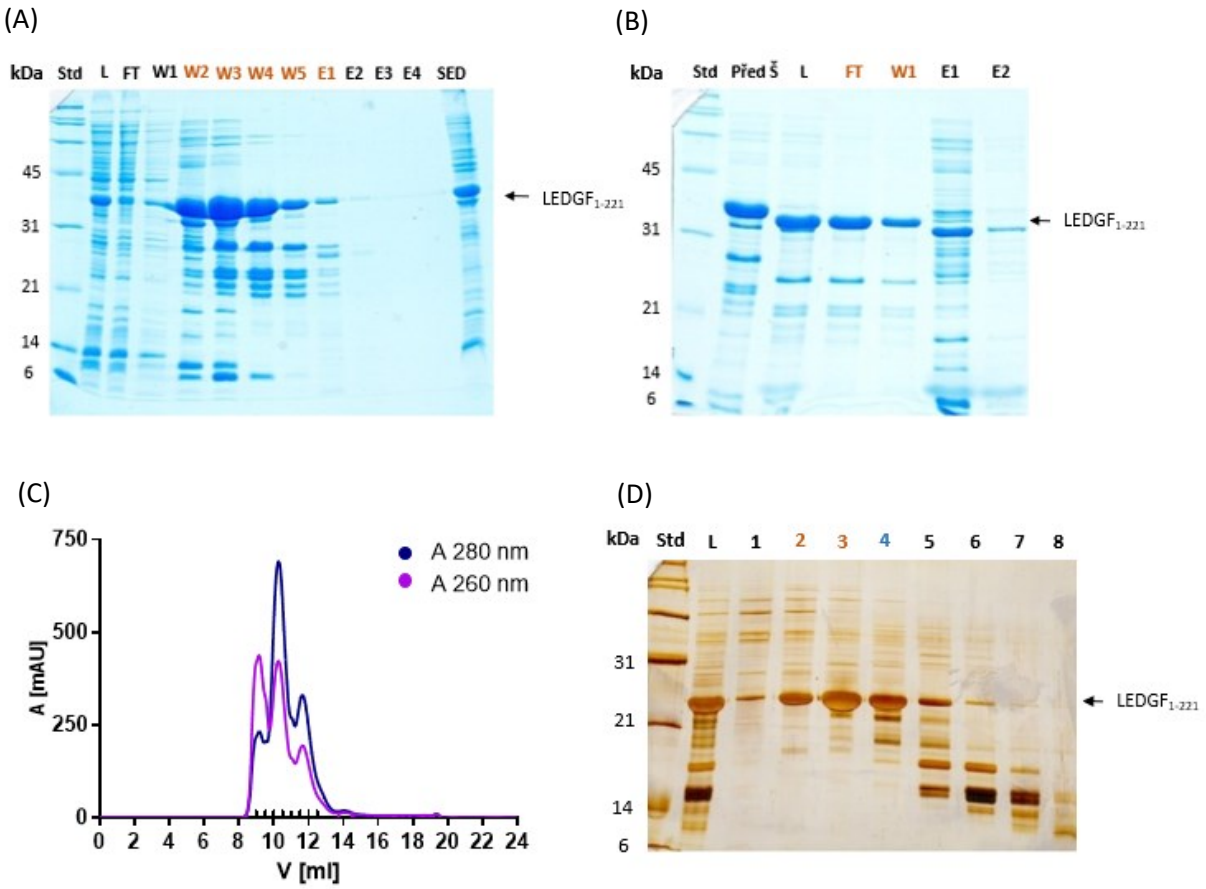


Obrázek 12 Zobrazení chromatogramů z jednotlivých purifikačních kroků a jejich následné SDS-PAGE analýzy pro jednotlivé frakce naznačené vertikálními čarami. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající LEDGF/p52. Oranžově označené frakce byly v každém kroku spojeny a použity do kroku následného, totéž bylo provedeno s frakcemi označenými modře. (A) Chromatogram z purifikace LEDGF/p52 na gelové permeační chromatografii Superdex 200 Increase 10/300 GL, frakce 1-10. (B) SDS-PAGE analýza z purifikace LEDGF/p52 gelovou permeační chromatografií. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-10 – frakce. Protein byl detekován Coomassie Blue. (C) Chromatogram z purifikace LEDGF/p52 na ionexové chromatografii Mono S, frakce 1-11. (D) SDS-PAGE analýza z purifikace LEDGF/p52 ionexovou chromatografií na Mono S. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-11 – frakce. Protein byl detekován stříbrem.

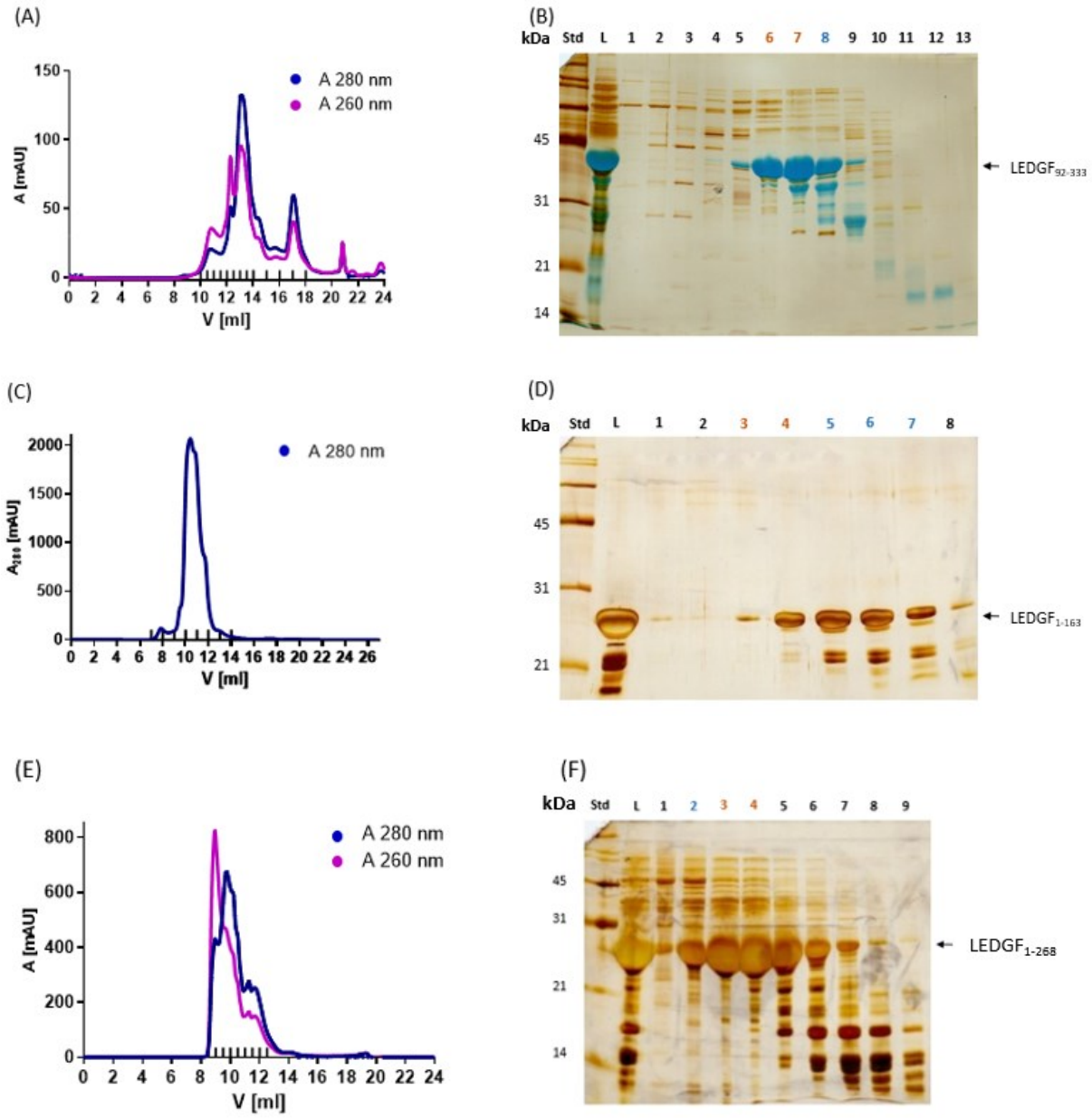
4.1.5 Purifikace ostatních LEDGF variant

Ostatní připravované varianty proteinu LEDGF obsahovaly histidinovou kotvu a byly úspěšně purifikovány s využitím niklové afinitní chelatační chromatografie. Vzorek byl nanesen na kolonu a byl eluován skokovým gradientem imidazolu (0-300 mM) v 9 frakcích o různých objemech (Obrázek 13 (A), str. 41). Frakce s nejmenším relativním zastoupením kontaminant a s nejvyšším obsahem daného proteinu byly vybrány k další purifikaci. Histidinová kotva byla odštěpena TEV proteázou. Následně byl proteinový roztok znovu nanesen na niklovou afinitní chelatační chromatografii za účelem odstranění odštěpené histidinové kotvy a TEV proteázy (Obrázek 13 (B), str. 41).

Vybrané frakce byly zahuštěny a dále čištěny na koloně pro gelovou permeační chromatografii Superdex 75 10/300 GL (kapitola 3.2.5.5, str. 31). Na chromatogramech pro jednotlivé varianty proteinu LEDGF, byly pozorovány vrcholy při různých objemech elučního pufru. Vybrané frakce z gelové permeační chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 13 (C, D), a Obrázek 14, str. 42). Koncentrace proteinů byla určena spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 280 nm.



Obrázek 13 Zobrazení průběhu purifikace $LEDGF_{1-221}$. Oranžově označené frakce byly v každém kroku spojeny a použity do kroku následného, totéž bylo provedeno s frakcí označenou modře. (A) První krok purifikace z bakteriálního lyzátu: Std – standard molekulových vah, L – nános, FT – proteklá frakce, W1 – frakce po promytí promývacím pufrem, W2 - E4 – frakce s koncentračním gradientem imidazolu 10-300 mM, SED – sediment, nerozpustná frakce bakteriálních buněk po lýzi. Protein byl detekován Coomassie Blue. (B) Druhý krok purifikace po odštěpení histidinové kotvy: Std – standard molekulových vah, Před Š – protein o velikosti odpovídající $LEDGF_{1-221}$ před přidáním TEV proteázy, L – protein o velikosti odpovídající $LEDGF_{1-221}$ po odštěpení histidinové kotvy, FT – proteklá frakce, W1 – frakce po promytí promývacím pufrem, E1, E2 – frakce elucí 300 mM imidazolem. Protein byl detekován Coomassie Blue. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající $LEDGF_{1-221}$ s histidinovou kotvou (A) a po jejím odštěpení (B). (C) Chromatogram z purifikace na gelové permeační chromatografii Superdex 75 10/300 GL. Vertikálními čarami jsou naznačeny jímané frakce 1-8. (D) SDS-PAGE analýza frakcí z purifikace gelovou permeační chromatografií. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-8 – frakce. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající $LEDGF_{1-221}$. Protein byl detekován stříbrem.



Obrázek 14 Zobrazení chromatogramů z jednotlivých purifikačních kroků LEDGF variant a jejich následné SDS-PAGE analýzy pro jednotlivé frakce naznačené vertikálními čarami. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající purifikované LEDGF variantě. Oranžově označené frakce byly v každé purifikaci spojeny a použity do dalšího kroku, totéž bylo provedeno s frakcemi označenými modře. Protein byl detekován stříbrem. (A) Chromatogram z purifikace $LEDGF_{92-333}$ na gelové permeační chromatografii Superdex 200 Increase 10/300 GL, frakce 1-13. (B) SDS-PAGE analýza z purifikace $LEDGF_{92-333}$. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-13 – frakce. Protein byl detekován Coomassie Blue a stříbrem. (C) Chromatogram z purifikace $LEDGF_{1-163}$ na gelové permeační chromatografii Superdex 75 10/300 GL, frakce 1-8. (D) SDS-PAGE analýza z purifikace $LEDGF_{1-163}$. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-8 – frakce. (E) Chromatogram z purifikace $LEDGF_{1-268}$ na gelové permeační chromatografii Superdex 75 10/300 GL, frakce 1-9. (F) SDS-PAGE analýza z purifikace $LEDGF_{1-268}$. Std – standard molekulových vah, L – nános, 1-9 – frakce.

Tabulka 2 Přehled výsledků kultivace jednotlivých délkových variant proteinů a jejich purifikací.

protein	množství média (l)	množství biomasy na litr média (g/l)	výtěžek proteinu na litr média (mg/l)
LEDGF/p52	4	4,9	6,1
$LEDGF_{92-333}$	3	4,9	1,9
$LEDGF_{1-163}$	3	4,6	8,6
$LEDGF_{1-221}$	3	3,5	5,4
$LEDGF_{1-268}$	3	3,7	4,9
$MeCP2_{153-355}$	2	5,5	5,6
$MeCP2_{153-252}$	3	4,4	1,9
$MeCP2_{253-355}$	3	3,8	4,2
$^{15}N\ MeCP2_{153-355}$	3	6,2	2,4

4.2 Ověření interakce proteinů

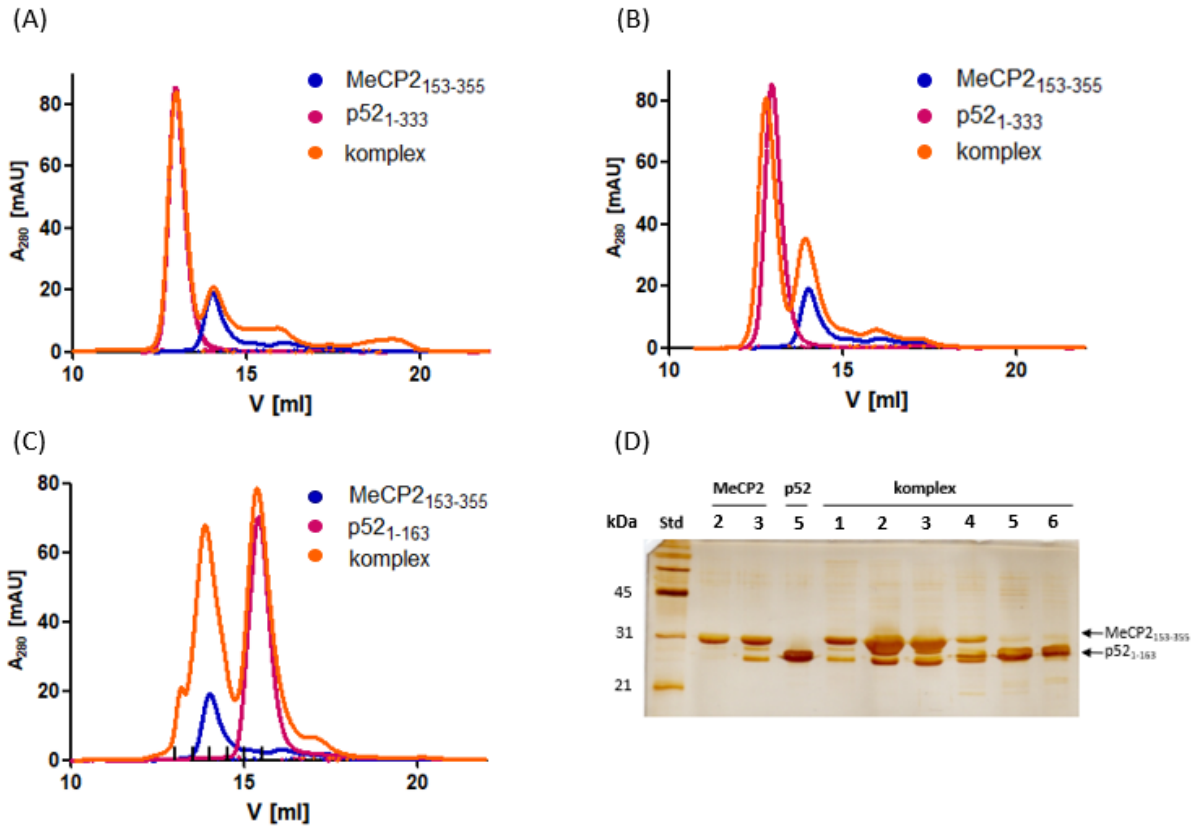
Jako první metoda pro ověření vazby mezi proteiny LEDGF a MeCP2 byla zvolena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL. Tato kolona byla použita místo kolony Superdex 75 10/300 GL používané při purifikaci, kvůli předpokladu vzniku komplexu o větší molekulové hmotnosti, než mají samotné proteiny. Vznik komplexu by se měl projevit dřívější elucí při gelové permeační chromatografii oproti elucím samotných proteinů, což by mělo být zřejmé z porovnání chromatogramu smíchaných interakčních partnerů s chromatogramy samotných proteinů. Následná SDS-PAGE analýza vybraných frakcí má sloužit pro potvrzení výsledku, frakce odpovídající komplexu by měly obsahovat oba proteiny.

Na začátek byla provedena analýza každého proteinu samostatně v konstantním množství 0,023 µmol a objemu 200 µl. Následně byly proteiny smíchány v určitých poměrech (Tabulka 3, str. 44) doplněny do objemu 200 µl a ponechány inkubovat 30 minut na ledu. Takto připravený vzorek byl nanesen na kolonu a výsledný chromatogram byl porovnán s chromatogramy samotných proteinů (Obrázek 15, str. 45).

Před samotnými interakčními experimenty byly na základě provedené kalibrace kolony vypočítány molekulové hmotnosti z elučních objemů zkoumaných proteinů. Tyto vypočtené hodnoty molekulových hmotností ovšem byly mnohonásobně vyšší než hodnoty očekávané. (Tabulka 4, str. 45).

Tabulka 3 Přehled provedených experimentů interakcí mezi proteiny a výsledky porovnání chromatogramu možného komplexu s chromatogramy samotných proteinů.

varianta LEDGF	varianta MeCP2	molární poměr LEDGF /MeCP2	posun elučního objemu jednoho z proteinů
1-333 aa	153-355 aa	1:1	ne
		1:2	ano
		1:4	ne
1-92 aa (PWWP doména)	153-355 aa	1:1	ne
		1:4	ne
		1:8	ne
1-163 aa	153-355 aa	1:4	ano



Obrázek 15 Porovnání chromatogramů samotných vazebných partnerů s chromatogramem proteinů po interakci. Analyzováno na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL. (A) Interakce LEDGF/p52 s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:1. (B) Interakce LEDGF/p52 s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:2 (C) Interakce $LEDGF_{1-163}$ s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:4. Svislými čarami jsou naznačeny analyzované frakce 1-6 na SDS-PAGE. (D) SDS-PAGE analýza frakcí interakce $LEDGF_{1-163}$ s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:4. Std – standard molekulových vah, 1-6 – frakce. Šipkami jsou označeny proteiny o velikosti odpovídající $LEDGF_{1-163}$ a $MeCP2_{153-355}$. Protein byl detekován stříbrem.

Tabulka 4 Porovnání teoretických molekulových hmotností proteinů s hmotnostmi vypočtených z dat gelové permeační chromatografie.

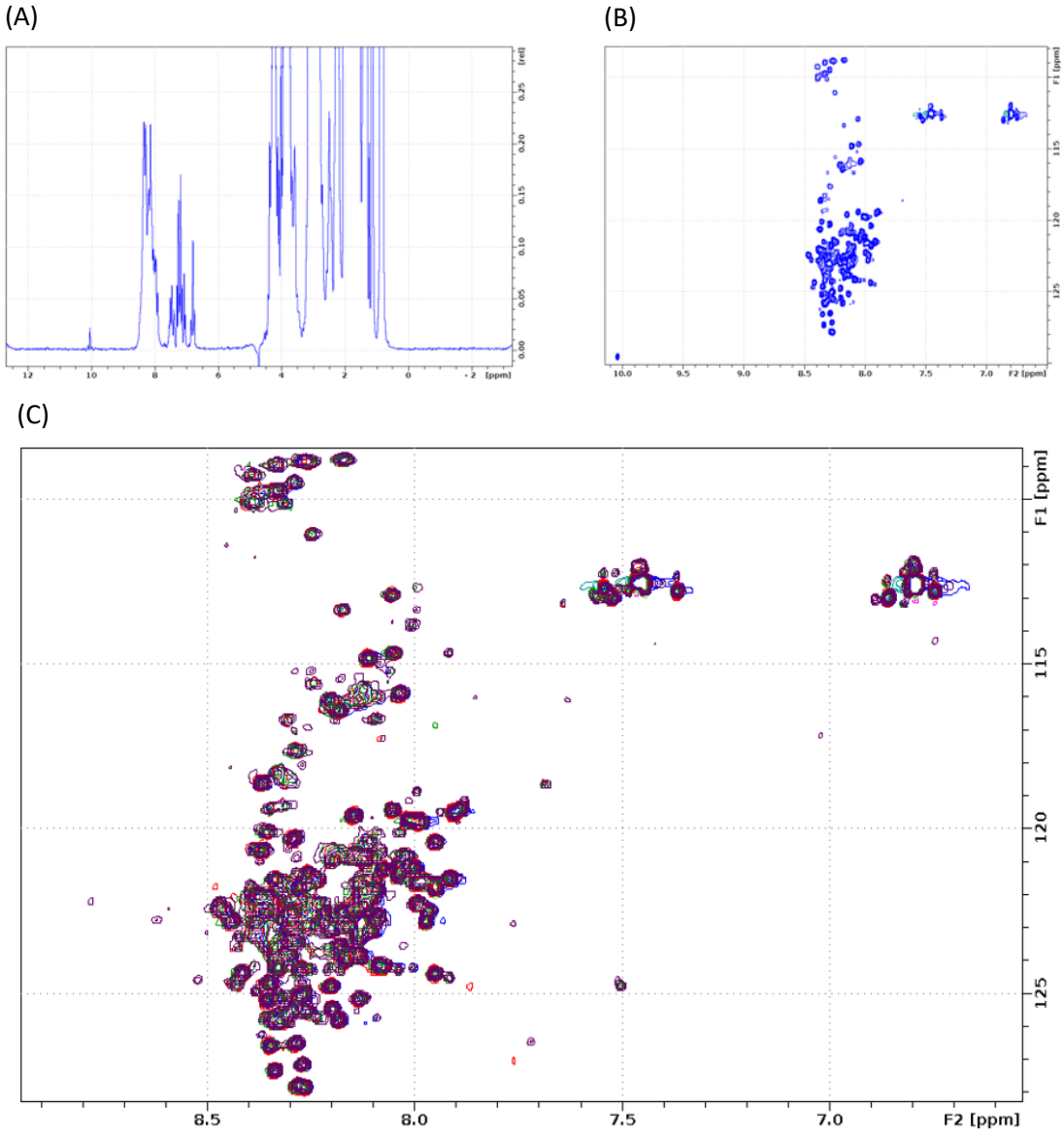
protein	teoretická M proteinu (kDa)	vypočtená M proteinu (kDa)
LEDGF/p52	37,7	207,8
$LEDGF_{1-163}$	18,8	60,0
$LEDGF_{1-92}$ (PWWP doména)	11,2	16,6
$MeCP2_{153-355}$	22,2	121,0

Všechny zkoumané interakce mezi proteiny LEDGF a MeCP2 na gelové permeační chromatografii byly po porovnání chromatogramů ještě analyzovány na SDS-PAGE pro potvrzení výsledku chromatografie. Vznik komplexu, vzhledem k porovnání chromatogramů a SDS-PAGE, měla jen analýza interakce $LEDGF_{1-163}$ s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:4. Při tomto poměru došlo jak k viditelnému posunu elučního objemu na chromatogramu proteinů po interakci, tak byl posun patrný i na polyakrylamidovém gelu SDS-PAGE analýzy (Obrázek 15, str. 44). Při opakování tohoto experimentu bylo z důvodu nedostatku proteinů použito jen poloviční množství proteinu (0,012:0,048 μmol) a tvorbu komplexu $LEDGF_{1-163}$ s $MeCP2_{153-355}$ se nepodařilo za těchto podmínek na gelové permeační chromatografii zachytit. Bylo tedy přistoupeno k citlivější metodě stanovení, a to NMR spektroskopii.

Nejprve bylo nasnímáno jednodimensionální (1D) ^{1}H a dvoudimensionální (2D) ^{1}H ^{15}N NMR spektrum volného izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ v NMR pufru (25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,5; 1 mM TCEP, 10 μM EDTA, 0,01% NaN_3) a koncentraci 150 μM. Poté byla snímána stejná 1D s 2D spektra při postupně zvyšující se koncentraci vazebného partnera – $LEDGF_{1-163}$. Protože nebyla pozorována žádná změna mezi spektrem samotného izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ a spektrem ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ s $LEDGF_{1-163}$, byly změněny interakční podmínky, ve kterých byla v předchozích pokusech ve školící laboratoři interakce obou proteinů detekována.

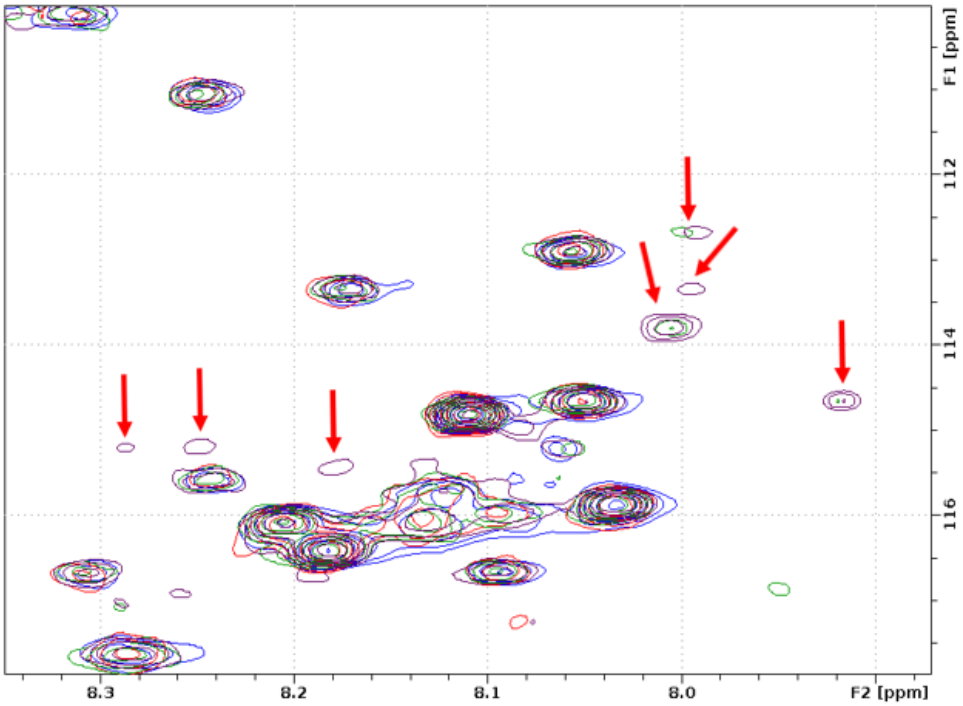
Následné experimenty sledující interakce mezi oběma proteiny byly měřeny v pufru o složení 30 mM HEPES pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP. Znovu byla nasnímána 1D a 2D spektra volného izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ o koncentraci 150 μM (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** 16, str. 46) a spektra se zvyšujícím se molárním podílem $LEDGF_{1-163}$ titrovaných v molárních poměrech 1:2, 1:4, 1:8. Při těchto měřeních byly patrné změny mezi spektrem samotného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ a spektry ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ s $LEDGF_{1-}$

$_{163}$ (Obrázky 16, 17, 18). Došlo ke vzniku nových signálů, což značí, že během interakce obou proteinů se stává další část MeCP2 strukturovanou. Největší nárůst nových signálů ve spektru s přidaným ligandem byl pozorován u poměru 1:8 a 1:4. Menší změny s klesajícím molárním zastoupením $LEDGF_{1-163}$ nasvědčují relativně nízké afinitě vazby (vyšší mikromolární až nízkomilimolární) obou proteinů.

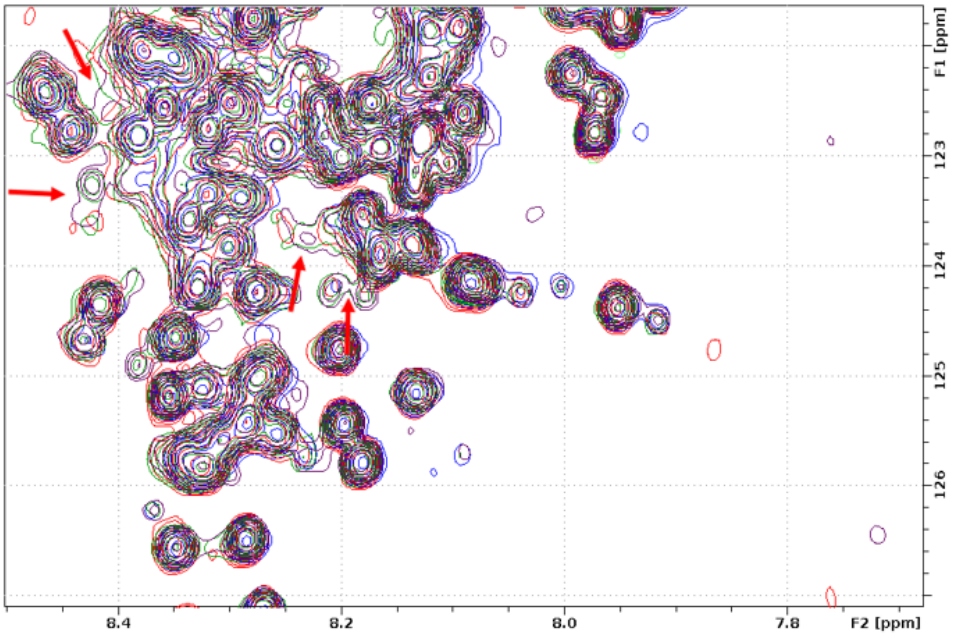


Obrázek 16 Nasnímaná spektra izotopově značeného ^{15}N MeCP2. (A) 1D ^{1}H spektrum volného izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$. (B) 2D ^{1}H ^{15}N spektrum volného izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$. (C) Porovnání 2D ^{1}H-^{15}N spektra izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ s ^{1}H-^{15}N spektry s postupně přibývající koncentrací $LEDGF_{1-163}$. (A) ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ (modře) byl postupně titrován v molárních poměrech 1:2 (červeně), 1:4 (zeleně) a 1:8 (fialově) proteinem $LEDGF_{1-163}$.

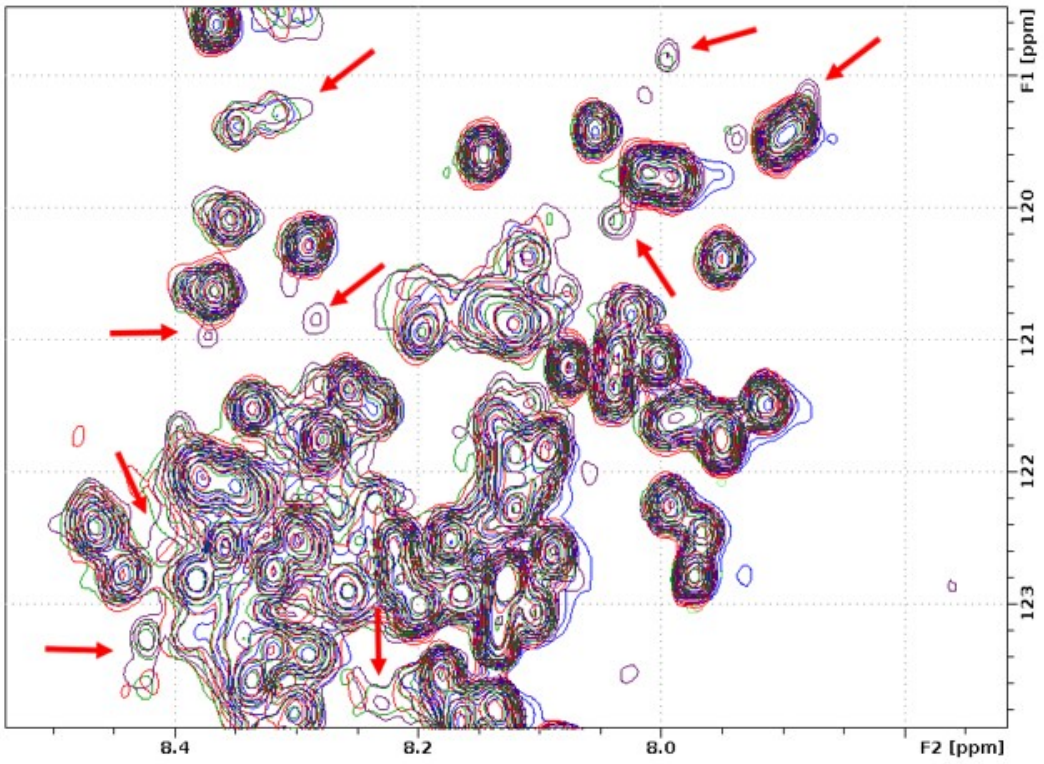
(A)



(B)



Obrázek 17 Porovnání 2D ^{1}H-^{15}N spektra izotopově obohaceného ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ s ^{1}H-^{15}N spektry s postupně přibývající koncentrací LEDGF$_{1-163.}$ ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ (modře) byl postupně titrován v molárních poměrech 1:2 (červeně), 1:4 (zeleně) a 1:8 (fialově) proteinem LEDGF$_{1-163.}$ (A) (B) Přiblížení různých části spektra zobrazeného na Obrázku 16 (C) na str. 46. Šipkami jsou vyznačeny posuny původních píků nebo píky nově vzniklé při vyšším poměru LEDGF$_{1-163}$.



Obrázek 18 Porovnání 2D ^{1}H-^{15}N spektra izotopově obohaceného ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ s ^{1}H-^{15}N spektry s postupně přibývající koncentrací $LEDGF_{1-163}$. ^{15}N $MeCP2_{153-355}$ (modře) byl postupně titrován v molárních poměrech 1:2 (červeně), 1:4 (zeleně) a 1:8 (fialově) proteinem $LEDGF_{1-163}$. Přiblížení části spektra zobrazeného na Obrázku 16 (C) na str. 46. Šipkami jsou vyznačeny posuny původních píků nebo píky nově vzniklé při vyšším poměru $LEDGF_{1-163}$.

5 Diskuse

V této bakalářské práci byl úspěšně vypracován protokol na přípravu různých délkových variant rekombinantních proteinů LEDGF a MeCP2. Všech zkoumaných proteinů bylo připraveno dostatečné množství pro potřebné experimenty. Zhotovené vzorky obsahovaly minimum kontaminací DNA a celkově odpovídaly standardům školící laboratoře.

Dle optimalizovaného protokolu byl připraven ^{15}N izotopově obohacený MeCP2 klíčový pro experimenty měřené metodou NMR. Výtěžek izotopově obohaceného MeCP2 je výrazně nižší než výtěžek neobohaceného proteinu, a to z důvodu menšího obsahu živin v minimálním médiu na rozdíl od LB média. Výtěžek byl však dostatečný pro provedení NMR experimentů.

Při výpočtu molekulových hmotností proteinů LEDGF/p52, $LEDGF_{1-163}$ a $MeCP2_{153-355}$ z elučních časů před samotnými interakčními experimenty vyšlo najevo, že vypočtené hodnoty jsou mnohonásobně vyšší než hodnoty teoretické (Tabulka 4, str. 45). Tento jev je pravděpodobně způsoben nestrukturovaností zkoumaných proteinů, kdy proteiny obsahují jen sbalené domény spojené nestrukturovanými úseky a působí na gelové permeační chromatografii větší, než ve skutečnosti jsou. Vysoká zdánlivá molekulová hmotnost by také mohla znamenat přítomnost multimeru, což bylo vyloučeno následnou NMR spektroskopií, protože proteiny nad 50 kDa nevykazují rozlišené spektrum, jaké bylo pozorováno v tomto případě.

První zvolenou metodou pro ověření interakce LEDGF a MeCP2 byla gelová permeační chromatografie. Předpokládaný komplex má mít větší molekulovou hmotnost než samotné proteiny a chromatogram komplexu by se měl lišit od chromatogramů samotných interakčních partnerů. Převážná většina z provedených experimentů interakce mezi jednotlivými variantami LEDGF a MeCP2 však vyšla negativně, tedy eluční časy smíšených interakčních partnerů byly identické s elučními časy samotných proteinů. Výjimkou byl experiment interakce LEDGF/p52 s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:2, ale následná SDS-PAGE vznik komplexu vyvrátila. Tvorba komplexu byla zaznamenána při analýze interakce $LEDGF_{1-163}$ s $MeCP2_{153-355}$ v poměru 1:4. Při použití poloviční množství obou proteinů než v předchozím experimentu však již nebyla interakce detekována. Pro zopakování pokusu v původním nastavení už nebyl dostatek čistých proteinů a bude proto provedeno v následných experimentech.

Pravděpodobný důvod nezachycení interakce mezi proteiny pomocí gelové permeační chromatografie, je nízká afinita vazby. Ta může být způsobena chybějícím interakčním parterem, jenž dosud není znám. Dalším vysvětlením by mohla být minimální koncentrace interakčních partnerů pro samotný vznik vazby, která není známa a nebyla při experimentu dosažena. Možnou příčinou mohou být také špatně zvolené podmínky interakce, jako například iontová síla či pH hodnota pufru.

Vzhledem k tomu, že gelová permeační chromatografie nebyla pro detekci sledované interakce mezi proteiny LEDGF a MeCP2 vhodná, byla pro další měření zvolena NMR spektroskopie. Tato metoda byla vybrána díky své vysoké citlivosti, nedestruktivnímu charakteru měření a možnosti přesně určit, které aminokyselinové zbytky se podílejí na interakci.

NMR spektroskopické měření potvrdilo interakci mezi proteiny. Při porovnání spektra samotného značeného ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ a ^{15}N MeCP2$_{153-355}$ s přidaným interakčním partnerem LEDGF$_{1-163}$ bylo patrné, že ve spektru došlo ke vzniku nových signálů izotopově značeného ^{15}N MeCP2$_{153-355}$, což dokazuje interakci obou proteinů. Ze vzniku nových signálů lze usuzovat, že dříve nestrukturovaná část MeCP2$_{153-355}$ se po interakci s LEDGF$_{1-163}$ sbaluje a dochází ke konformačním změnám MeCP2. Při prvotních NMR měřeních v Tris pufru při pH 7,5 nebyla interakce znatelná, ale při použití HEPES pufru o nižším pH byla interakce zřejmá. Zbývá objasnit, zda vznik komplexu je způsoben nižším pH pufru nebo hraje vliv i samotné pufrovací medium.

Pro další ověření vzniku komplexu mezi MeCP2 a LEDGF by bylo možné využít metodu izotermální titrační kalorimetrie, která byla původně zavrhnuta kvůli vysoké spotřebě vzorku a jejímu destrukčnímu charakteru, metodu cross-link, u které je nevýhodou nízká specifita, nebo imunoprecipitaci. Imunoprecipitace je metoda, při které je zapotřebí přichytit jednoho z interakčních partnerů na pevnou matrici (např. přes His-kotvu) a následně se k přichycenému proteinu přidá jeho potenciální interakční partner. Vzniklý komplex se očistí od kontaminant a uvolní se z pevné matrice. Komplex je následně detekován pomocí Western blotu, kdy se využijí buď specifické protilátky pro jednotlivé partnery nebo protilátku pro některou ze značek přítomných na proteinech (např. His-kotvu nebo Flag značku). Výsledek imunoprecipitace lze vyhodnotit i pomocí hmotnostní spektrometrie.

Dalšími kroky v projektu je reprodukovat zachycení interakce proteinů na gelové permeační chromatografii, v podmínkách, ve kterých byl komplex detekován v NMR experimentech. Dále budou využity ostatní připravené varianty proteinů k určení minimálních úseků obou interakčních partnerů nutných pro vznik vazby.

Pozitivním důkazem interakce mezi proteiny MeCP2 a LEDGF lze potvrdit již dříve publikované výsledky ohledně této problematiky zveřejněné roku 2012 [28] a 2015 [34], které přinesly jedny z prvních informací o interakci mezi zmíněnými proteiny a dokládaly interakci MeCP2 s oběma izoformami LEDGF proteinu. V článcích byla také uveřejněna pravděpodobná místa vzniku interakce, a to jak ze strany LEDGF, kde se jedná o PWWP-CR1 doménu, tak ze strany MeCP2, kde byla navrhnuta jako interakční část TRD doména, přesněji její součást, NID doména. Právě tyto části MeCP2 jsou mutovány při onemocnění známém jako Rettův syndrom, při němž je narušena interakce mezi proteiny MeCP2 a LEDGF. Je proto možné, že LEDGF má významnou roli v patogenezi tohoto onemocnění a detailní prozkoumání této interakce by mohlo přispět k možnosti léčby Rettova syndromu.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma „Epigenetická regulace transkripce a biologické role proteinů LEDGF/p75 a MeCP2“, připravit různé délkové varianty proteinů LEDGF/p52 a MeCP2 v dostatečné čistotě pomocí heterologní exprese v *E. coli* a ověřit vazbu těchto proteinů pomocí biochemických a biofyzikálních metod.

Při přípravě proteinů byly nejprve optimalizovány podmínky pro expresi a purifikaci nativních proteinů MeCP2 a LEDGF. Dle těchto protokolů byly následně připraveny dané proteiny, včetně MeCP2 v izotopově obohaceném ^{15}N minimálním mediu. Interakci MeCP2 a LEDGF variant se nepodařilo v testovaných podmínkách pozorovat pomocí gelové permeační chromatografie. K následné NMR spektroskopické analýze vazby obou proteinů byla využita izotopově značená varianta ^{15}N MeCP2. Při NMR analýze ^{15}N MeCP2 s přidaným $LEDGF_{1-163}$ byly detekovány nové signály, které potvrzují interakci mezi proteiny a konformaci MeCP2 při interakci.

Potvrzení interakce MeCP2 s modulátorem sestřihu LEDGF by mohlo vést k osvětlení mechanismu závažného onemocnění známého jako Rettův syndrom, jenž postihuje přibližně 1 z 10 000 žen a je příčinou zhoršení mozkové funkce vedoucí například k jazykové regresi nebo celkovému účelnému pohybu rukou. Klíčovým krokem k pochopení principů tohoto onemocnění, a tedy i možnosti návrhu a vývoji léčiva, je detailní prozkoumání interakce mezi výše zmíněnými proteiny, a zahrnuje odhalení konkrétního úseku každého z interakčních partnerů nutného ke vzniku vazby, čímž se budu zabývat následující experimenty.

7 Seznam použité literatury

1. Gijsbers, R. *et al.,* Role of the PWWP Domain of Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF)/p75 Cofactor in Lentiviral Integration Targeting. *J. Biol. Chem.* **286** 41812–41825 (2011).

2. De Rijck, J., Bartholomeeusen, K. *et al.,* High-resolution Profiling of the LEDGF/p75 Chromatin Interaction in the ENCODE Region. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6135–6147 (2010).

3. Kodíček, M., Valentová, O. & Hynek, R. *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*. (VŠCHT Praha, 2018).

4. Alberts, B. *et al*., *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky.* (Espero, 2005).

5. Ingram, N.: Waddington, Holmyard and Alchemy: Perspectives on the Epigenetic Landscape. *Endeavour.* **43** 100690 (2019).

6. Feng, L. & Lou, J. DNA Methylation Analysis. *Methods Mol. Biol.* **1894**, 181–227 (2019).

7. Geiman, T. M. & Robertson, K. D. Chromatin Remodeling, Histone Modifications, and DNA Methylation - How Does It All Fit Together? *J. Cell. Biochem.* **87**, 117–125 (2002).

8. Hong, L., Schroth, G. P. *et al.*, Studies of the DNA Binding Properties of Histone H4 Amino Terminus. Thermal Denaturation Studies Reveal That Acetylation Markedly Reduces the Binding Constant of the H4 "Tail" to DNA *J. Biol. Chem.* **268**, 305–314 (1993).

9. Fan, J., Baeza, J. & Denu, J. M. Investigating Histone Acetylation Stoichiometry and Turnover Rate. *Methods Enzymol.* **574,** 125-148 (2016).

10. Gudiño, Ž. O. Epigenetická modifikace DNA nádorových buněčných linií v normoxii a hypoxii. *Diplomová práce*. Praha, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta 2013.

11. Zhang, D. *et al.* Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lactylation.

Nature **574**, 575–580 (2019).

12. Izzo, L. T. & Wellen, K. E. Histone Lactylation Links Metabolism and Gene Regulation. *Nature* **574**, 492–493 (2019).

13. Allis, D., Jenuwein, T. & Reinberg, D. *Epigenetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007).

14. Llano, M., Morrison, J. & Poeschla, E. M. Virological and Cellular Roles of the Transcriptional Coactivator LEDGF/p75. In: Spearman P., Freed E. (eds) HIV Interactions with Host Cell Proteins. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 339. Springer, Berlin, Heidelberg

15. Ge, H., Si, Y. & Roeder, R. G. Isolation of cDNAs Encoding Novel Transcription Coactivators p52 and p75 Reveals an Alternate Regulatory Mechanism of Transcriptional Activation. *EMBO J.* **17**, 6723-6729 (1998).

16. Singh, D. P. *et al*., Lens Epithelium-Derived Growth Factor: Increased Resistance to Thermal and Oxidative Stresses. Invest Ophthalmol Vis Sci. **40**, 1444-1451 (1999)

17. Shinohara, T., Singh, D. P. & Fatma, N. LEDGF, a Survival Factor, Activates Stress-Related Genes. *Prog. Retin. Eye Res.* **21**, 341–358 (2002).

18. Singh, D. P., Bhargavan, B., Chhunchha, B., Kubo, E. & Kumar, A. Transcriptional Protein Sp1 Regulates LEDGF Transcription by Directly Interacting With Its Cis-Elements in GC-Rich Region of TATA-Less Gene Promoter. *PLoS One.* **7**, 37012 (2012).

19. Basu, A. *et al.* Expression of the Stress Response Oncoprotein LEDGF/ p75 in Human Cancer: A Study of 21 Tumor Types. *PLoS One.* **7**, 30132 (2012).

20. Sharma, P., Singh, D. P., Fatma, N., Chylack, L. T. & Shinohara, T. Activation of LEDGF Gene by Thermal- and Oxidative-Stresses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1320–1324 (2000).

21. Basu, A. *et al.* Specificity of Antinuclear Autoantibodies Recognizing the Dense Fine Speckled Nuclear Pattern: Preferential Targeting of DFS70/LEDGFp75 Over Its Interacting Partner MeCP2. *Clin. Immunol.* **161**, 241–250 (2015).

22. Sutherland, H. G. *et al.* Disruption of Ledgf/Psip1 Results in Perinatal Mortality and

Homeotic Skeletal Transformations. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7201–7210 (2006).

23. Daugaard, M. *et al.* Lens Epithelium-Derived Growth Factor Is an Hsp70-2 Regulated Guardian of Lysosomal Stability in Human Cancer. *Cancer Res.* **76**, 2492 (2016)

24. Blokken, J., De Rijck, J., Christ, F. & Debyser, Z. Protein–protein and Protein–Chromatin Interactions of LEDGF/p75 as Novel Drug Targets. *Drug Discov. Today Technol.* **24**, 25–31 (2017).

25. Tesina, P. *et al.* Multiple Cellular Proteins Interact With LEDGF/p75 Through a Conserved Unstructured Consensus Motif. *Nat. Commun.* **6**, 7968 (2015).

26. Izumoto, Y., Kuroda, T., Harada, H., Kishimoto, T. & Nakamura, H. Hepatoma-Derived Growth Factor Belongs to a Gene Family in Mice Showing Significant Homology in the Amino Terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 26–32 (1997).

27. Hendrix, J. *et al.* The Transcriptional Co-Activator LEDGF/p75 Displays a Dynamic Scan-And-Lock Mechanism for Chromatin Tethering. *Nucleic Acid Res.* 39, 1310-1325 (2011)

28. Leoh, L. S. *et al.* The Stress Oncoprotein LEDGF/p75 Interacts With the Methyl CpG Binding Protein MeCP2 and Influences Its Transcriptional Activity. *Mol. Cancer Res.* **10**, 378–391 (2012).

29. Sharma, S. *et al.* Affinity Switching of the LEDGF/p75 IBD Interactome Is Governed by Kinase-Dependent Phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E7053–E7062 (2018).

30. Ragione, F. Della, Vacca, M., Fioriniello, S., Pepe, G. & D'Esposito, M. MECP2, a Multi-Talented Modulator of Chromatin Architecture. *Brief. Funct. Genomics* **15**, 420–431 (2016).

31. Eckhorn, R., Gail, A., Bruns, A. & Al-Shaikhli, B. Dynamic Cortical Cooperation Related to Visual Perception. in *Proceedings of the International Joint Conference on Neural Networks*. **2**, 1563–1568 (2003).

32. Linhoff, M. W., Garg, S. K. & Mandel, G. A High-Resolution Imaging Approach to Investigate Chromatin Architecture in Complex Tissues. *Cell* **163**, 246–255 (2015).

33. Singleton, M. K. *et al.* MeCP2 Is Required for Global Heterochromatic and Nucleolar Changes During Activity-Dependent Neuronal Maturation. *Neurobiol. Dis.* **43**, 190–200 (2011).

34. Li, R. *et al.* Misregulation of Alternative Splicing in a Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS Genet.* **12**, 1–25 (2016).

35. Picard, N. & Fagiolini, M. MeCP2: An Epigenetic Regulator of Critical Periods. *Curr. Opin. Neurobiol.* **59**, 95–101 (2019).

36. Shah, R. R. & Bird, A. P. MeCP2 Mutations: Progress Towards Understanding and Treating Rett Syndrome. *Genome Med.* **9**, 7–10 (2017).