

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Obor: Imunologie



**Chromatinová imunoprecipitace vybraných
transkripčních faktorů**

**Chromatin immunoprecipitation of selected
transcription factors**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Karel Vališ, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

PRAHA, 2018

Bc. Jitka Smetanová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením školitele Mgr. Karla Valíše, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce ani její podstatná část nebyla předložena k zisku jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Mgr. Karlu Vališovi, Ph.D., za vedení diplomové práce, trpělivost, ochotu, cenné rady a pomoc při experimentální části a v neposlední řadě i za rady udělené při samotném sepsování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu laboratoře RNDr. Petru Novákovi, Ph.D., za pomoc a podporu, Ing. Janě Novákové a Mgr. Lucii Hernychové za pomoc a společnost v laboratoři. V neposlední řadě chci poděkovat všem členům laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za nezapomenutelné chvíle strávené v laboratoři i mimo ni. Děkuji i kamarádovi Pavlu Matysovi za korekturu českého jazyka.

Velký dík patří také celé rodině i mému příteli za podporu nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého studia.

Abstrakt

Rodina transkripčních faktorů TEAD reguluje expresi genů, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Aktivita TEAD1 je regulována prostřednictvím Hippo signální dráhy. Obecný mechanismus suprese nádorových buněk skrze Hippo signální dráhu zůstává nejasný. *C-MYC* a *GLUT1*, dva klíčové regulátory glykolýzy, byly recentně popsány v lidských leukemických buňkách jako cíle Hippo signální dráhy. V této diplomové práci byla pomocí ChIP analýzy v lidských leukemických buňkách experimentálně potvrzena vazba TEAD1 k prvnímu exonu genu *C-MYC* a dále objevena nová interakce TEAD1 s enhancerem genu *C-MYC* a s enhancerem genu *GLUT1*. Regulace glukózového metabolismu Hippo signální dráhou může představovat nový mechanismus suprese nádorových buněk.

Klíčová slova: genová regulace, transkripční faktory, chromatinová imunoprecipitace, bioinformatika

Abstract

The family of transcription factors TEAD regulates the expression of genes that affect cell proliferation, differentiation and apoptosis. Activity of TEAD1 is regulated via the Hippo signaling pathway. General mechanism of tumor cell suppression by the Hippo signaling pathway remains unclear. *C-MYC* and *GLUT1*, the two key regulators of glycolysis, were recently described as targets of the Hippo signaling pathway in human leukemia cells. In this diploma thesis, the interaction of TEAD1 with M-CAT binding motifs was experimentally confirmed in the first exon of *C-MYC* gene. In addition, a new interaction of TEAD1 with M-CAT binding motifs has been found in the enhancer of *C-MYC* promoter and enhancer of *GLUT1* promoter by ChIP analysis. Regulation of glucose metabolism by the Hippo signaling pathway may represent a new mechanism of tumor cell suppression.

(In Czech)

Key words: Gene regulation, transcription factors, chromatin immunoprecipitation, bioinformatics

Obsah:

Abstrakt	3
Abstract	4
Obsah:	5
Seznam použitých zkratk	7
1. Teoretická část:	14
1.1. Hippo signální dráha	14
1.1.1. Transkripční faktory rodiny TEAD	17
1.2. Souvislost mezi Hippo signální dráhou a imunitním systémem	23
1.2.1. Transkripční regulátory metabolismu T-buněk	25
1.2.2. Degradace YAP při antivirové imunitní odpovědi	29
1.2.3. Aktivace Hippo dráhy kontaktem dvou cytotoxických T-lymfocytů	30
1.2.4. Regulace Th17-Tregs buněčné rovnováhy pomocí TAZ	33
1.3. Souvislost mezi Hippo dráhou a metabolismem	35
1.4. Současné poznatky regulace TEAD1 proteinem	37
2. Cíl diplomové práce	39
3. Materiál a metody	40
3.1. Přístroje a materiál	40
3.1.1. Biologický materiál	40
3.1.2. Přístroje a příslušenství	40
3.1.3. Chemikálie	41
3.2. Metody	45
3.2.1. Kultivace a pasážování buněk	45

3.2.2. Příprava chromatinu	45
3.2.3. Enzymatické štěpení chromatinu	46
3.2.4. Příprava genomové DNA	46
3.2.5. Elektroforéza	47
3.2.6. Imunoprecipitace pomocí G-proteinu	48
3.2.7. Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads.....	49
3.2.8. SDS elektroforéza	52
3.2.9. Přenos proteinů	52
3.2.10. Polymerázová řetězová reakce	54
4. Výsledky	56
4.2. Navržení primerů pro PCR a jejich efektivita	56
4.1.1. Navržení a pozice primerů pro gen <i>C-MYC</i>	56
4.1.2. Efektivita primerů pro gen <i>C-MYC</i>	57
4.1.3. Navržení a pozice primerů pro gen <i>GLUT1</i>	59
4.1.4. Efektivita primerů pro gen <i>GLUT1</i>	60
4.3. Izolace chromatinu a enzymatické štěpení	62
4.4. Imunoprecipitace pomocí G-proteinu.....	67
4.5. Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads	70
4.5.1. Western Blot.....	70
5. Diskuse.....	72
6. Závěr	76
7. Seznam použité literatury.....	77

Seznam použitých zkratk

14-3-3	cytosolický protein náležící do rodiny konzervovaných regulačních molekul
AbaA	transkripční faktor
ACACA	stěžejní enzym pro oxidaci MK (z angl. acetyl-CoA carboxylase 1)
<i>Afp</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující α -fetoprotein (z angl. alpha-fetoprotein)
AKT	serin-threoninová kináza
AMOTL1	protein podporující fosforylaci YAP/TAZ komplexu (z angl. angiomin-like protein 1)
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	enzym (z angl. adenosine monophosphate-activated protein kinase)
AP-1	transkripční faktor (z angl. activator protein 1)
APC	antigen-prezentující buňky (z angl. antigen presenting cells)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ATP	adenosintrifosfát
ATTS	druhý název pro TEA doménu název, vznikl podle prvních písmen proteinů, kde byla doména nalezena (AbaA, TEF-1, Tec-1, Scalloped)
AXL	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující AXL receptor s tyrosin-kinázovou aktivitou
<i>Birc2</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující Birc2 protein (z angl. baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protein)
Blimp-1	protein kódován <i>PRDM1</i> genem potlačující expresi INF- β (z angl. PR domain zinc finger protein 1)
bp	páry bazí (z angl. base pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)

C2C12	myší immortalizovaná myoblastová buněčná linie
CCD	CCD kamera (z angl. Charge-coupled device)
CD28	kostimulační receptor T-lymfocytů
CD80	kostimulační receptor exprimován na povrchu APC
CD86	kostimulační receptor exprimován na povrchu APC
CD4+	glykoprotein na povrchu pomocných T-lymfocytů
<i>Cdx2</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z angl. caudal type homeobox)
CG	pár cytosin-guanin
CKCA	centrální kinázová kazeta Hippo dráhy (z angl. central kinase cassette)
<i>C-MYC</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující transkripční faktor C-MYC (z angl. Myc proto-oncogene protein)
CT	zkumavka pro čištění vzorku součástí kitu (z angl. collection tube)
C_T	počet cyklů, kdy fluorescence přesáhne prahovou hodnotu (z angl. cycle of threshold)
<i>CTGF</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z angl. connective tissue growth factor)
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CTLA-4	proteinový receptor (z angl. cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)
<i>CYR61</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z angl. cysteine-rich angiogenic inducer)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
<i>Eomes</i>	gen kódující protein Eomesodermin
ERMS	nádorové buňky (z angl. embryonal rhabdomyosarcoma)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)

FOXA1/2	transkripční faktor obsahující forkheadbox DNA vazebnou doménu, který se podílí na vývoji pankreatu (z angl. Forkhead box protein)
Foxp3	transkripční faktor Tregs (z angl. Forkhead box P3)
GATA6	transkripční faktor podílející se na vývoji pankreatu (z angl. transcription factor GATA6)
GLUT1	glukózový transportér typu 1 (z angl. glucose transporter)
H19	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující dlouhou RNA
HIF1 α	transkripční faktor (z angl. hypoxia-inducible factor 1 α)
HNF1B	transkripční faktor podílející se na vývoji pankreatu (z angl. hepatocyte nuclear factor 1B)
HPV-16	lidský papilomavirus typu 16 (z angl. human papilloma virus)
ChIP-Seq	metoda používaná pro analýzu proteinových interakcí s DNA (z angl. Chromatin Immunoprecipitation sequencing)
ChREBP	protein zprostředkovávající aktivaci regulačních enzymů glykolýzy (z angl. carbohydrate-response element binding protein)
IKK $\alpha/\beta/\gamma$	enzymatický komplex (z angl. I κ B kinase)
IFN- α/β	interferony typu I.
IL-2	základní růstový faktor T-lymfocytů (z angl. interleukin-2)
IL-6	prozánětlivý cytokin důležitý při přeměně B-lymfocytů na plasmocyty
IL-7	hlavní růstový faktor buněk kostní dřeně
IL-7R α	řetězec receptoru pro IL-7
IL-17	prozánětlivý cytokin produkován Th17 buňkami
IL-17a	prozánětlivý cytokin produkován Th17 buňkami
IL-21	interleukin exprimován CD4 ⁺ T-lymfocyty

IL-23	heterodimerní cytokin stimulující dendritické buňky k produkci INF- γ
IRF3	regulační transkripční faktor (z angl. interferon regulatory factor 3)
JAK	rodina intracelulárních kináz, které transdukuji cytokinem zprostředkované signály JAK/STAT signální dráhou
K_D	disociační konstanta
KIBRA	protein obsahující WW doménu (z angl. kidney and brain expressed protein)
KLRG1	receptor na NK a T-buňkách (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily member 1)
LATS1/2	kinázy Hippo dráhy (z angl. large tumor supresor)
LDHA	laktátdehydrogenáza A
MAP4Ks	protien kináza (z angl. mitogen activated protien kinase)
MAVS	signální protein (z angl. mitochondrial antiviral-signaling protein)
M-CAT	sekvence DNA, kterou ve svalech váže TEAD (z angl. muscle-cytosine, adenine, thymine)
MK	mastné kyseliny
Mlx	transkripční faktor (z angl. Max like protein X)
MOB1A/B	enzym (z angl. MOB kinase aktivator 1A/B)
MondoA	jiný název pro MLXIP (z angl. MLX interacting protein)
MPCs	multipotentní kmenové buňky (z angl. multipotent pancreatic progenitor cells)
MST1/2	kinázy Hippo signální dráhy (z angl. Mammalian STE20-like protein kinase)
mTOR	serin-threoninová kináza (z angl. mammalian target of rapamycin)
mTORC1/2	proteinový komplex součástí mTOR kinázy (z angl. mTOR Complex 1/2)
NaCl	chlorid sodný

<i>NAIP</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující protein Birc1 (z angl. Neuronal apoptosis inhibitory protein 1)
NF-κB	transkripční faktor (z angl. nukleus factor κB)
NF2	tumorsupresorový protein (z angl. Neurofibromin 2)
NFAT	transkripční faktor (z angl. nuclear factor of activated T-cells)
NGS	metoda umožňující sekvenování celých genomů (z angl. Next generation sequencing)
<i>Pax3</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující transkripční faktory rodiny Pax (z angl. paired box gene 3)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase chain reaction)
PDK1	protein kináza (z angl. Phosphoinositide-dependent protein kinase 1)
PDK1	pyruvát dehydrogenáza kináza (z angl. pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1)
PDX1	transkripční faktor důležitý pro vývoj pankreatu (z angl. pancreatic and duodenal homeobox 1)
PDZ	vazebná doména obsahující sekvenci 80-90 aminokyselin
PI3K	lipid kináza (z angl. phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 3-kinase)
PIC	proteázový inhibiční koktejl (z angl. Protease Inhibitor Cocktail)
PKM2	pyruvát kináza M2 (z angl. pyruvate kinase muscle isozyme)
<i>PMP22</i>	gen (z angl. Peripheral Myelin Protein 22)
PP2A	protein fosfatáza (z angl. protein phosphatase 2A)
<i>RHAMM</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující receptor RHAMM (z angl. receptor for hyaluronan mediated motility)
RLR	receptory (z angl. RIG-I-like receptors)

ROR γ T	transkripční faktor Th17 buněk (z angl. RAR-related orphan receptor gamma)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SAV1	protein obsahující WW doménu (z angl. Salvador homolog 1)
SCF $^{\beta-TRCP}$	ubikvitin ligáza (z angl. β -transduction repeat containing E3 ubikvitin protein ligase)
SCRIB	protein apiko-bazální polarity (z angl. protein scribble homolog)
SDS	dodecylsírán sodný
SMAD	intracelulární proteiny transdukující extracelulární signály do jádra buňky (z angl. mothers against decapentaplegic homolog)
STAT	transkripční faktor, který transdukuje cytokinem zprostředkované signály JAK/STAT signální dráhou (z angl. signal transducer and activator of transcription)
STING	indukuje produkci interferonů typu I. (z angl. Stimulator of interferon genes)
SOX4	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující transkripční faktor SOX4 (z angl. Transcriptional factor SOX-4)
SV40	simian virus 40
SVM	zkumavka pro čištění vzorku součástí kitu (z angl. SV Minicolumn)
TAE	pufr vzniklý smícháním (z angl. Tris base, acetic acid, EDTA)
TAO	Serin-threoninová-protein kináza
TAZ	koaktivátor TEAD transkripčních faktorů (z angl. transcriptional coactivator with PDZ binding motif)
T-bet	transkripční faktor kódovaný genem <i>TBX21</i>
TBK1	součást IKK komplexu (z angl. TANK-binding kinase 1)
TCA	trikarboxylová kyselina (z angl. tricarboxylic acid)
TCR	specifický receptor T-buněk (z angl. T-cell receptor)
TEA	doména transkripčního faktoru TEAD

TEAD1-4	rodina transkripčních faktorů mající TEA vazebnou doménu (z angl. transcriptional enhancer activator domain)
Tec1	transkripční faktor podílející se na aktivaci transpozónu u kvasinek
TEF1	jiný název pro TEAD1 (z angl. transcriptional transcriptional factor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transformující růstový faktor (z angl. transforming growth factor β)
TGS	pufr pro SDS elektroforézu (z angl. Tris,Glycine,PBS)
Th17	druh pomocných T-lymfocytů
Tip-60	acetyltransferáza
TLR	receptor (z angl. Toll-like receptor)
Treg	T-regulační buňky
TRIF	doména (z angl. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)
Tris	tris(hexomethyl)aminomethan
TSC1/2	tumor supresorové komplexy (z angl. Tuberous sclerosis complex 1/2)
TTBS	pufr pro WB (z angl. Tris buffered saline with Tween)
Ty1	transpozón u kvasinek
WB	metoda přenosu proteinů (z angl. western blot)
WILLIN	protein součástí Hippo dráhy
YAP	koaktivátor TEAD transkripčního faktoru (z angl. Yes associated protein)

1. Teoretická část:

1.1. Hippo signální dráha

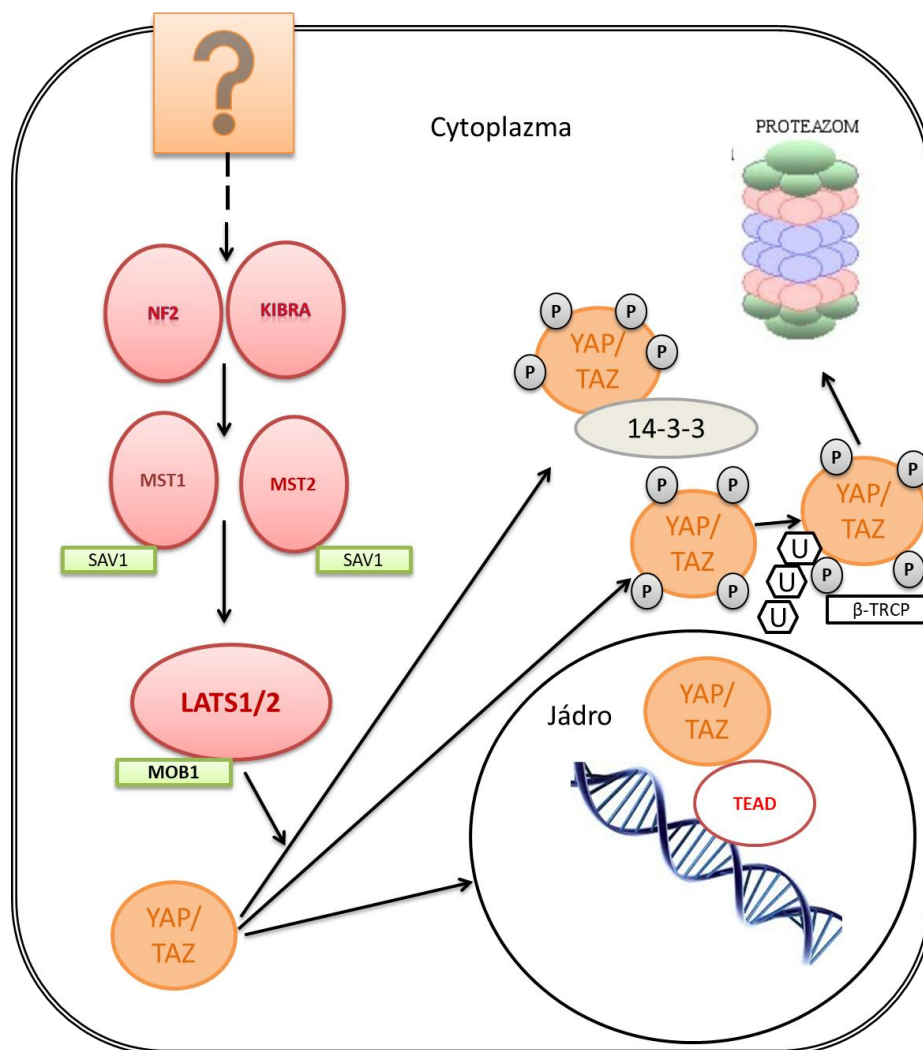
Hippo signální dráha byla poprvé popsána u modelového organismu *Drosophila melanogaster* (Octomilka obecná) jako důležitý regulátor velikosti orgánů [1]. Je to vysoce konzervovaný systém od octomilky až po savce. Téměř všechny složky Hippo dráhy octomilky mají své rozpoznatelné orthology u savců [2], u kterých omezují velikost tkání a orgánů tím, že inhibují proliferaci a podporují apoptózu [3]. Hippo signální dráha řídí nejen proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk, ale je rovněž spojena s rozvojem nádorového onemocnění [4]. Přes 35 proteinů je u savců zapojeno do Hippo signální dráhy.

CKCA (z angl. central kinase cassette) tvoří centrální část Hippo signální dráhy. Skládá se z dvojice regulačních serin-threoninových kináz MST1/2 (z angl. mammalian STE20-like protein kinase 1/2), z dvojice proteinových kináz LATS1/2 (z angl. large tumor suppressor 1/2) a z adaptorového proteinu SAV1 (z angl. Salvador homolog 1). SAV1 tvoří lešení mezi LATS1/2, MST1/2 a MOB1A/B (z angl. MOB kinase activator) a umožňuje jejich interakci. MST1/2 společně s MAP4Ks (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase kinases) fosforylací aktivují LATS1/2 [5]. LATS kinázy následně fosforylací inaktivují onkoprotein YAP (z angl. YES-associated protein) a transkripční koaktivátor TAZ (z angl. transcriptional co-activator with PDZ-binding domain) obsahující PDZ vazebnou doménu, jež je nezbytná pro stimulaci genové exprese [6].

Inhibice růstu tkáně fosforylací YAP/TAZ je zprostředkována několika mechanismy. Fosforylovaný komplex YAP/TAZ se společně s proteinem 14-3-3 váže na α -catenin, což způsobuje jeho hromadění v cytoplasmě a následnou degradaci. α -catenin brání opětovné defosforylaci a translokaci do jádra. V buňkách se sníženou koncentrací α -cateninu dochází k interakci YAP s PP2A (z angl. protein phosphatase 2A), což může vést k defosforylaci a následné aktivaci [7]. Transkripční koaktivátor TAZ interaguje s SCF ^{β -TRCP} E3 ubikvitin ligázou. Ta katalyzuje jeho ubikvitinaci, čímž zapříčiní jeho degradaci v proteazomu [8]. Naopak nefosforylované onkoproteiny YAP a TAZ slouží jako transkripční koaktivátory, které se pohybují mezi cytoplasmou a jádrem.

Po translokaci do jádra a interakci s transkripčními faktory z rodiny TEAD (z angl. transcriptional enhancer aktivator domain), nebo SMAD (z angl. mothers against decapentaplegic homolog) vyvolávají expresi proliferačních a antiapoptických genů, což vede ke zvýšenému růstu tkání a orgánů, což může vyústit až v tvorbu nádorů [9].

U savců je CKCA regulována mnoha různými složkami [10]. TAO kináza fosforyluje kinázy MST1/2, čímž potlačuje aktivitu YAP onkoproteinu. Lidská TAO1 kináza kontroluje dráhu Salvador-Warts-Hippo fosforylací MST2 [11]. Zjistilo se, že Tao-1 kináza u octomilky reguluje růst vývoje epiteliálních tkání [12]. Komplex KIBRA-NF2-WILLIN aktivuje CKCA doposud neobjasněným mechanismem. Dalšími proteiny, které se podílí na aktivaci CKCA jsou proteiny apiko-bazální polarity. Mezi ty patří například SCRIB (z angl. protein scribble homolog). Přestože jejich receptory jsou stále předmětem zkoumání, nedávné studie naznačují, že se jedná o receptory spřažené s G-proteiny [13] a receptory aktivované proteázou [14]. Tyto receptory mohou být komponenty několika různých složek, které u savců spojují extracelulární signály s aktivací Hippo signální dráhy, jež nakonec ovlivní aktivitu YAP/TAZ [15,16]. Mechanismus, jakým jsou tyto molekuly aktivovány, zůstává neznámý. Schéma Hippo signální dráhy je uvedeno na obr. 1 na straně 16.



Obrázek 1: Grafické schéma Hippo signální dráhy. Aktivované molekuly NF2 a KIBRA aktivují serin-threoninové kinázy MST1 a MST2, jež následně fosforylují LATS kinázy. Ty naopak fosforylací tlumí efektorové onkoproteiny YAP a TAZ. Fosforylované onkoproteiny jsou buď označeny prostřednictvím SCF^{β-TRCP} E3 ubiquitin ligázy k degradaci v proteazomu, nebo vazbou k proteinu 14-3-3 zadržovány v cytoplazmě. Když Hippo dráha není aktivní, onkoproteiny nejsou fosforylovány a dochází k jejich translokaci do buněčného jádra. Tam interagují s transkripčními faktory rodiny TEAD, čímž je spuštěn přepis cílových genů. Přerušovaná čára značí neznámý mechanismus aktivace.

Genová exprese aktivována TEAD transkripčními faktory společně s jeho koaktivátory je potřebná k regulaci růstu, diferenciaci buněk a inhibici apoptózy. Tyto vlastnosti jsou nezbytné pro řádný vývoj organismu [17]. Mutace v Hippo dráze, poprvé objevené u octomilky, ukázaly, že dysfunkční signalizace vede k nadměrnému dělení

buněk. Některé populace rakovinových buněk se svými vlastnostmi podobají kmenovým buňkám, což jim umožňuje rychlý růst a tvorbu metastáz [18].

Zvýšené hodnoty onkoproteinu YAP jsou spojené s výskytem rakoviny prsu, plic, jater, střev i vaječníků [19,20]. Ke zvýšení koncentrace YAP proteinu může dojít dvěma odlišnými mechanismy. Prvním je již zmíněný defekt v Hippo signální dráze, kdy nefosforylovaný YAP reaguje v jádře s TEAD1-4, čímž dochází k nadměrné proliferaci. Druhou možností je amplifikace genu YAP, jež má za následek zvýšení četnosti proteinu. Deregulovaný protein YAP kromě samotného výskytu rakoviny ovlivňuje i průběh onemocnění. Nadměrná exprese YAP je spojována se špatnou prognózou u nádorového onemocnění plic a dokonce může způsobovat rezistenci na chemoterapeutickou léčbu [21]. Podobně bylo prokázáno, že i zvýšená exprese TAZ koreluje s výskytem nádorových onemocnění, jako jsou například rakovina prsu, kolorektální karcinom nebo karcinom dlaždicových buněk jazyka [22,23].

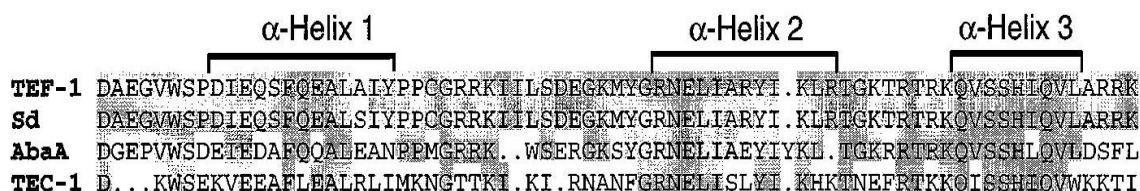
I CKCA a její poruchy v signalizaci vedou k výskytu nádorových onemocnění, jako jsou například karcinom tlustého střeva či jater. V porovnání s YAP/TAZ se tyto poruchy vyskytují v mnohem menší míře [24]. Vzhledem k důležité funkci při regulaci proliferace a tkáňové homeostázy Hippo dráha představuje důležitý cíl pro léčbu rakovinového onemocnění.

1.1.1. Transkripční faktory rodiny TEAD

Rodina eukaryotických transkripčních faktorů TEAD společně sdílí evolučně konzervovanou DNA vazebnou doménu TEA. Jako první z rodiny TEAD byl objeven transkripční faktor TEAD1, který byl schopný vazbou na enhancer viru SV40 aktivovat transkripci u lidských HeLa buněk [25]. Dále se prokázalo, že TEAD1 vazbou na enhancer aktivuje onkogeny E6 a E7 lidského papillomaviru-16 (HPV-16) [26].

TEA vazebná doména, která je tvořena 72 aminokyselinami, byla dříve nazývána ATTS. Starší označení vzniklo spojením prvních písmen proteinů, ve kterých byla TEA doména nejdříve objevena [27]. Mezi tyto proteiny náleží protein AbaA, který je nezbytný pro správný vývoj spor *Aspergillus nidulans*. Dále sem patří TEF1 (z angl.

transcriptional enhancer factor), kterým se dříve označoval TEAD1, jehož homologem u octomilky je Scalloped (Sd), jež je potřebný k vývoji nervového systému a křídel. Tec1 se u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* podílí na aktivaci transpozonu Ty1 [28]. Srovnání aminokyselinové sekvence těchto čtyř proteinů je znázorněno na obr. 2.



Obrázek 2: Evolučně konzervovaná TEA doména a její znázorněné aminokyselinové sekvence u lidského TEF-1, jeho orthologu u octomilky scalloped, dále pak u AbaA a kvasinkového Tec-1. Zvýrazněné jsou ty sekvence, které jsou evolučně konzervované. Převzato a upraveno z [28].

1.1.1.1. Transkripční faktory TEAD u savců

U savců existují čtyři geny, které kódují čtyři homologické členy transkripčních faktorů rodiny TEAD – TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4 [29]. Všechny čtyři transkripční faktory obsahují na svém N-konci prakticky totožnou DNA vazebnou doménu a váží stejné sekvence DNA [30]. Porovnání aminokyselinové sekvence pro jednotlivé Tead transkripční faktory u myši vedlo k poznání, že Tead1 má TEA vazebnou doménu naprosto shodnou s Tead2, z 99 % s Tead3 a z 94 % s Tead4 [31]. Sekvence pro jednotlivé myší transkripční faktory je znázorněna na obr. 3 na straně 19. Jednotlivé proteiny rodiny TEAD odlišuje především místo a fáze vývoje jejich exprese. V každé tkáni je exprimován alespoň jeden z TEAD genů. Místo exprese TEAD transkripčních faktorů je stěžejní pro jejich funkce v organismu. Jejich funkce jsou detailněji prozkoumány u myši, které se od lidských liší jen velmi nepatrně [31].

1

mTead1

mTead2

mTead3

mTead4

IEPSS

MGDPRTGAPLDDGGG

+ASN+

+TSNE

WSGSESP

+T+++EG

+TANS++

++SPD++EGSSISGG

AENMERM

S+EGTGG

G+AR+DG

+EGSSISGG

SDSADKPIDN

+EGVGGDGSP

+EGL++G+++

+QAL+++++

TEA vazebná doména

90

DAEGV

WSPDIEQSFQEALAI

YPPCGRRKIILSDEG

KMYGRNELIARYIKL

+++++

+++++

+++++

+++++

+++++

+++++

+++++

+++++

+++++

+++E++R+++++

+++++

+++++

91

mTead1

mTead2

mTead3

mTead4

RTGKTRTRKQVSSHI

QVLARRK

+++++

+++++

SRDFHSKL

++EIQ+++

V+EYQVGI

A+EIQA++

K

+

+AMNL++

+

DQTAKDKALQ

++VS++++F+

+VS+++++

++A++N++++

HMAAMSSAQIVSATA

T++T+++++LI++PS

S++S+++++SV

S+++++

IHNKLGLPG

LQA+++PS+

LQ++FSP+SPL+QAV

F+S+ML+AR

IPRPT

+Q

GP

G

FPGGPGFWPGMIQTG

ATELFGQ++S+S

+SSSSR++SSPPLL+

Y+AIS+++Q+ALP

S+

S+

S+

+

181

mTead1

mTead2

mTead3

mTead4

Q

P

+Q++P+++I+++A+P

++T+H+++++S+N

PGSSQDVKPFVQQ

+WNVP+++++S+A

+++++PLPPALN

T++V++PL

AYPIQPAVTAPIP

PFSVSLT+PAS

+++++PLPPALN

++L+

GFEPTSAPAPS

+Y++PPALS+LPPP

SY+SLAPL+AAASA

+++SPAG+T++PS

VPAWQGRSIGTT

APSP++++A+AL++A

TASA++++D+T+ASS

APLA+P+++++ASS

KLRLVEFSAFLEQQR

R+Q+I+++++V+PPD

R+++L+Y+++M+V++

++WML+++++R+Q

DPDSYNKHLFVHIGH

AV++FQR+++++SQ

+++T+S+++++Q

+++T+++++SQ

271

mTead1

mTead2

mTead3

mTead4

ANHSYSDPLLESVDI

QCP+PGA+P+++++V

T+PAF+++P++A++V

SSP+++++Y++T+++

RQIYDKFPEKKGGLK

+++++

+++++

+++++

ELFGKGPQNAFFLVK

++YDR++PH+++++

++YE+++P+++++

+++ER++S+++++

FWADLNC

+++++

+++++

+++++

NIQDDA

+++++

+++++

++D+EG

GAFYGVSSQY

SSGGG+G+++++

+++++

S+++++

ESSENMTVTCTST

++R+L++L+++S

S+ADS++ISV++

++P+++II++++

+++

+++

+++

+++

361

mTead1

mTead2

mTead3

mTead4

SFGKQVVEKVETEYA

+++++

+++++

+++++

RFENGREFVYRINRSP

QL+D+++++LL+++

+L+++++H+++

+Y+++HYL+++H+++

MCEYMINFIHKLKHL

++++LV+++L+++RQ+

+++++

L+++++

PEKYMNSVLENFTI

++R+++++

+++++

+++++

LLVVTNRDQTETLLC

+Q+++++L+++

+Q++S++S+++++V

+Q+++++

MACVFEVSNSEHGAQ

T+Y+++++T++R+++

I+F+++++T+++++

I+Y+++++A+++++

+++++

+++++

+++++

+++++

C-terminální doména

450

počet aminokyselin v sekvenci

451

mTead1

mTead2

mTead3

mTead4

HHIYRLVKD

Y+++++R+

++V+K+++

+++++++E

426

445

439

427

Obrázek 3: Porovnání aminokyselinové sekvence myších transkripčních faktorů Tead1, Tead2, Tead3 a Tead4. Znaménkem + jsou znázorněny ty aminokyseliny, které jsou ve shodné pozici stejné v Tead1. Převzato a upraveno z [31].

Tead1 se u myší uplatňuje především v průběhu vývoje jak srdečního, tak i kosterního svalu. Dokonce je jako jediný z rodiny TEAD exprimovaný u myších embryí v myokardu, kde reguluje růst svalu [28]. Naopak u dospělých myší byla jeho přítomnost zjištěna v mnoha orgánech a tkáních, jako jsou například mozek, srdce, kosterní svalstvo či játra [30]. Tead1 se v průběhu vývoje podílí na vývoji nervového systému, ledvin či dýchacího ústrojí a růstu kosterního svalstva [28]. Ne vždy je možné jeho funkci nahradit jiným proteinem z rodiny TEAD. U lidí je přítomný zejména ve Schwannových buňkách [32] a také v nádorových buňkách [28].

Tead2 je exprimován hlavně v průběhu embryonálního vývoje [30]. Do osmého dne vývoje je exprimován téměř ve všech tkáních, kde se podílí zejména na vývoji mozku. U dospělých jedinců jeho míra exprese klesá a nachází se v malém množství pouze ve vybraných orgánech – ledviny, plíce a mozek [33]. U lidí byla jeho exprese zjištěna

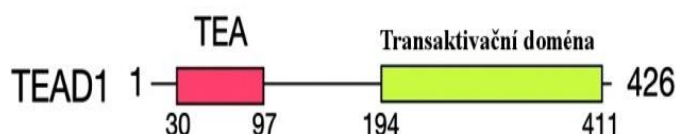
v buňkách střev, vaječníků, placenty a ledvin [28]. Na počátku vývoje mohou být funkce Tead2 nahrazeny Tead1. Při poruše Tead2 dochází k normálnímu vývoji myších embryí, ale zároveň roste riziko poškození mozku [33,34].

Tead3 byl objeven jako poslední člen transkripčních faktorů z rodiny TEAD, který je u myši exprimován v placentě, kde ovlivňuje diferenciaci buněk. Stejně jako Tead2 je exprimován v průběhu embryonálního vývoje, v pozdních fázích pak ve svalových a nervových buňkách [34]. U lidí je jeho exprese detekována především v placentě.

Tead4 ovlivňuje diferenciaci buněk trofoektodermu na počátku embryonálního vývoje. V dospělosti je u myši exprimován zejména v plicních buňkách a v kosterním svalstvu [34]. V lidských buňkách byla jeho exprese zjištěna u nádorových buněk děložního čípku, vaječníků, jater a mozku [28].

1.1.1.2. Struktura proteinů rodiny TEAD

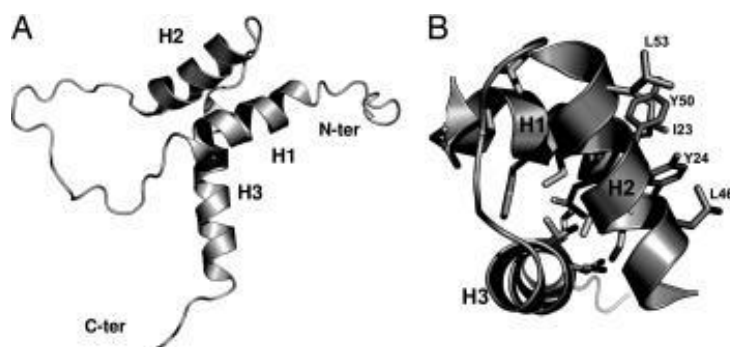
Doposud u žádného transkripčního faktoru z rodiny TEAD nebyla vyřešena celá struktura proteinu. Savčí TEAD proteiny společně mezi sebou na svém C-konci sdílí transaktivační doménu, prostřednictvím které k sobě váží koaktivátory. Tyto koaktivátory jsou nutné k zahájení přepisu cílových genů. Naopak na svém N-konci sdílí DNA vazebnou doménu TEA [29]. Struktury těchto domén jsou již známy a jsou znázorněny pro TEAD1 na obr. 4.



Obrázek 4: Pozice transaktivační a TEA domény pro TEAD1. Převzato a upraveno z [29].

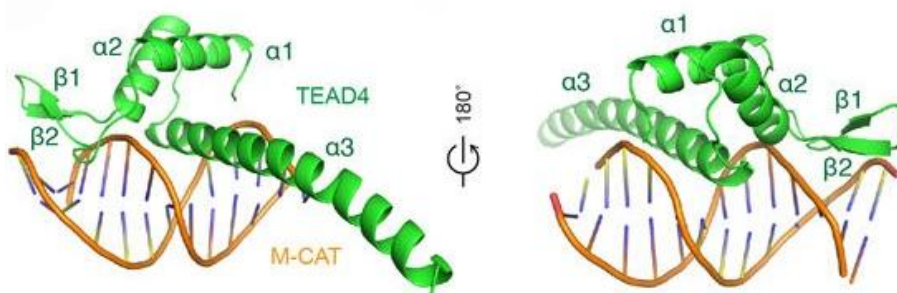
Pomocí nukleární magnetické rezonance byla vyřešena struktura TEA domény transkripčního faktoru TEAD1 [35]. TEA doména je globulární protein složený ze tří α -helixů (na obr. 5 znázorněny jako H1, H2 a H3) a dvou β -smyček, které propojují α -helixy [36]. Struktura TEA domény vyřešena nukleární magnetickou rezonancí je

znázorněna na obr. 5. V roce 2017 byla pro TEAD4 byla vyřešena krystalová struktura TEA domény v komplexu s DNA [36]. Tato krystalová struktura je znázorněna na obr. 6.



Obrázek 5: Struktura TEA domény zobrazená stuhkovým diagramem (A) a s hydrofobními zbytky (B). Převzato a upraveno z [35].

Prostřednictvím TEA domény se proteiny z rodiny TEAD váží na DNA. TEA vazebná doména váže shodnou sekvenci DNA 5'-CATTCCA/T-3' [37] zvanou M-CAT (z angl. muscle cytosine adenine thymine) [38]. Tyto M-CAT vazebné elementy nalezneme v promotorech a v exonech mnoha genů exprimovaných ve svalech. Mezi tyto geny patří těžký řetězec β -myosinu či troponin-T [39].



Obrázek 6: Krystalová struktura TEA domény transkripčního faktoru TEAD4 v komplexu s M-CAT-vazebným elementem DNA. Převzato a upraveno z [36].

Vazba TEA vazebné domény k DNA vede k jejím konformačním změnám. $\alpha 3$ helix se váže k velkému žlábků DNA, zatímco L1 region (smyčky $\beta 1$ a $\beta 2$) interaguje s malým

rich protein 61). Proteiny kódované těmito geny patří mezi faktory, které regulují velký počet buněčných funkcí nejen v průběhu apoptózy, proliferace a diferenciace buněk [45,46], ale také při tumorigenezi a zánětu [47]. TEAD proteiny dále aktivují genovou expresi AXL protein kinázy, která brání apoptóze a naopak podporuje růst tkání a metastáz [48].

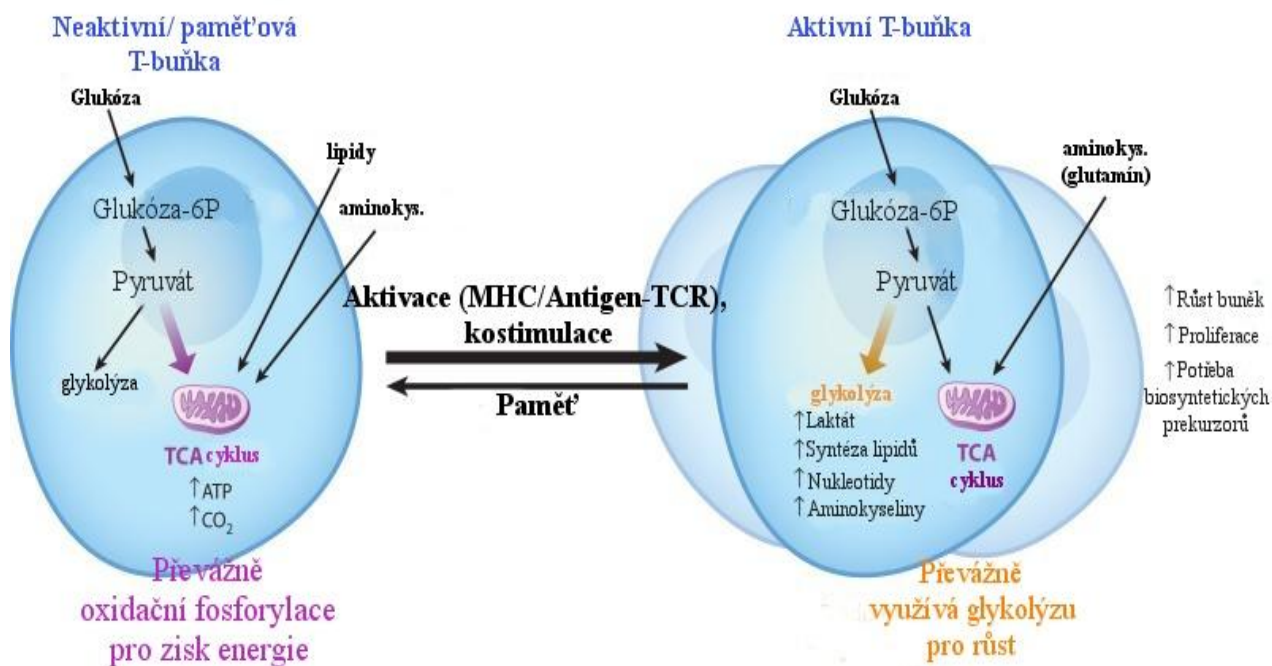
Některé Tead transkripční faktory v myších nádorových buňkách jater zvyšují expresi genů ovlivňujících proliferaci buněk. Mezi tyto geny patří například *Afp* (z angl. alpha fetoprotein), *H19* a *Sox4* [49]. TEAD v nádorových buňkách prsu reguluje gen *RHAMM* (z angl. receptor for hyaluronan mediated mobility). Ten podporuje tvorbu metastáz vazbou na mitotické dělicí vřeténko [50]. TEAD má vliv i na průběh buněčného cyklu. U nervových progenitorových buněk v průběhu vývoje embrya Tead ovlivňuje růst zvýšenou expresí cyklinu D1. Ten blokuje expresi *NeuroM* a naopak zrychluje buněčný cyklus. Tímto způsobem brání předčasné diferenciaci [51]. Mezi další geny, které podporují proliferaci inhibicí apoptózy, patří *NAIP* (z angl. Neural apoptosis inhibitory protein) [52] nebo *Birc2* (z angl. baculoviral IAP repeat-containing protein) [53]. TEAD neovlivňuje pouze expresi genů, které se v průběhu vývoje podílí na proliferaci, ale rovněž geny, které ovlivňují správnou diferenciaci. Mezi ty patří například *Pax3* (z angl. paired box protein), který zodpovídá za správný vývoj mozku, a *Cdx2* (z angl. homeobox protein Cdx-2) [54]. Tead4 spouští přepis genu pro transkripční faktor Cdx2, který spouští expresi genů trofoektodermu, což vede k jeho diferenciaci [55].

Nedávno byla objevena skupina metabolických genů, které jsou regulovány prostřednictvím Hippo signální dráhy transkripčními faktory z rodiny TEAD. Do této skupiny genů náleží *C-MYC* (z angl. Myc proto-oncogene protein) a *GLUT1* (z angl. glucose transporter) [10,47]. Onkoprotein C-MYC působí jako klíčový transkripční faktor, jež se výrazně podílí na regulaci buněčného metabolismu a růstu [56].

1.2. Souvislost mezi Hippo signální dráhou a imunitním systémem

T-buňky jsou klíčové složky adaptivní imunity, které zastávají efektorovou obrannou funkci [57]. Při výstupu z thymu mají zralé klidové T-buňky nízké metabolické požadavky, které slouží k získu bazální energie. Naivní klidové T-buňky nepřetržitě

migrují prostřednictvím sekundárních lymfatických tkání a zastávají funkci imunitního dohledu. Tento proces je náročný na ATP, tudíž T-buňky ve svém klidovém stavu mají metabolickou rovnováhu, která upřednostňuje tvorbu energie před biosyntézou. Aby se vyhovělo této potřebě, klidové T-buňky převážně spoléhají na oxidaci mastných kyselin a pyruvátu s vysokým ziskem energie prostřednictvím TCA (z angl. tricarboxylic acid) cyklu [58]. T-buňky se během infekce setkávají s antigeny, jsou aktivovány a specifickým způsobem diferencují v buňky efektorové [57]. Aktivace T-lymfocytů iniciuje změny v jejich epigenetickém stavu [59], který je kritickým faktorem pro osud buňky a její metabolismus, což je zásadní pro podporu zvýšené metabolické a energetické náročnosti [58]. Se zvýšenou potřebou glukózy dochází i ke zvýšení exprese transportéru GLUT1 [60]. Stimulované T-buňky musí být schopné rychle se dělit a růst. Proto aktivované T-buňky posouvají metabolickou rovnováhu směrem k biosyntéze nukleových kyselin, lipidových membrán a proteinů. Tento proces doprovázený důležitými změnami buněčného metabolismu je znám jako metabolické přeprogramování [57]. Změny buněčného metabolismu během metabolického přeprogramování, které jsou zásadní pro diferenciaci, proliferaci a efektorové funkce T-buněk jsou znázorněny na obr. 8 na straně 25.



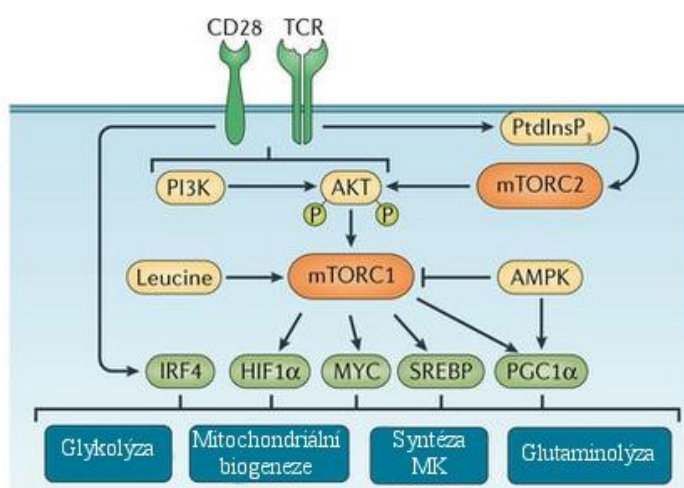
Obrázek 8: Schéma metabolického přeprogramování T-buněk po jejich aktivaci. Neaktivní/paměťové T-buňky využívají jako účinný zdroj energie ATP oxidační fosforylaci, kdy kromě pyruvátu oxidují i lipidy a mastné kyseliny. Stimulované T-buňky musí být schopné rychlého růstu, dělení a efektorové funkce. V důsledku toho se metabolické požadavky T-buněk po aktivaci dramaticky zvýší. Podporují biosyntézu intracelulárních složek včetně lipidových membrán, nukleových kyselin a proteinů. T-buňky udržují dostatečné množství meziproduktů pro růst buněk tím, že současně zvyšují metabolismus glukózy a glutaminu při současném snížení oxidace lipidů. Převzato a upraveno z [58].

Tato zvýšená metabolická aktivita zvyšuje produkci ROS (z angl. Reactive oxygen species) prostřednictvím mitochondriálního elektron transportujícího řetězce [61]. Zatímco nízké koncentrace ROS podporují buněčnou proliferaci a samotné přežití buněk, vyšší koncentrace iniciují poškození DNA a mohou vyústit až v buněčnou smrt [62]. Aktivované T-buňky regulují jejich zvyšující se koncentrace využitím endogenního antioxidantu glutathionu.

1.2.1. Transkripční regulátory metabolismu T-buněk

Stimulace a kostimulace T-buněk závisí na signalizační ose PI3K-AKT-mTOR. Zapojení signalizace přes koreceptor CD28 v průběhu stimulace TCR (z angl. T-cell

receptor) vede k navázání katalytické podjednotky PI3K (z angl. phosphatidylinositol-3 kinase), což následně zapříčiní aktivaci AKT (protein kinase B) a mTOR (z angl. mechanistic target of rapamycin) komplexu 1 (mTORC1) [63]. Inhibicí TSC2 (z angl. tuberous sclerosis 2 protein) AKT reguluje aktivaci mTORC1 [64]. Aktivita AKT kinázy je závislá na fosforylaci Thr308, Thr450 a Ser473. Thr308 je cílem PDK1 (z angl. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), zatímco Thr450 a Ser473 jsou cílem mTORC2, což umožňuje AKT kináze působit i na další substráty, které se podílí na metabolické regulaci a přežití buněk. Aktivace signální dráhy PI3K-AKT-mTOR je nezbytná pro generování a metabolické přeprogramování pomocných T-buněk a cytotoxických lymfocytů (CTL) [57,65,66]. Signální dráha PI3K-AKT-mTOR reguluje cílové transkripční faktory, které řídí metabolické přeprogramování v T-buňkách [57]. Tato signální dráha s cílovými transkripčními faktory je znázorněna na obr. 9.



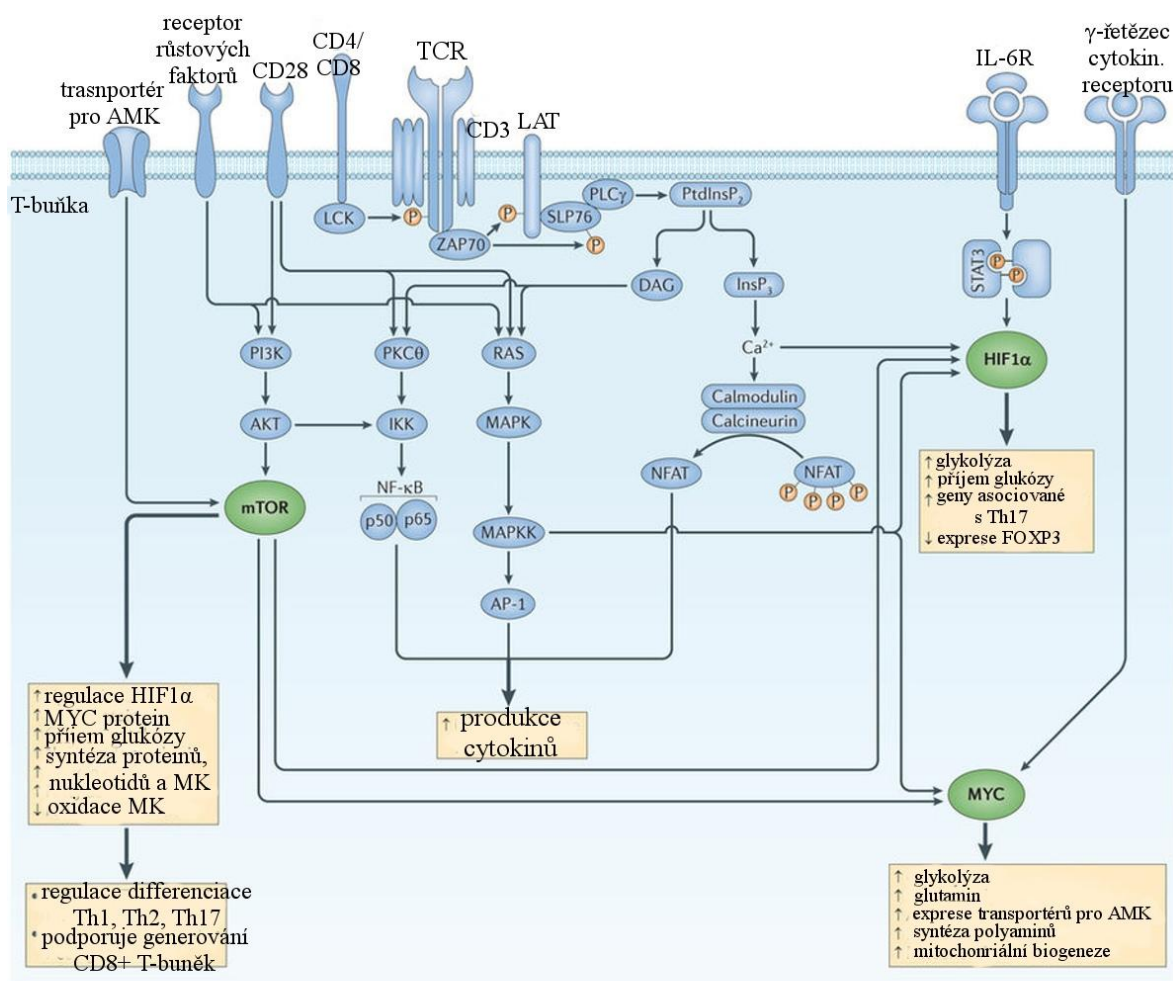
Obrázek 9: Schéma signální dráhy PI3K-AKT-mTOR s cílovými transkripčními faktory, které řídí metabolické přeprogramování T-buněk. Převzato a upraveno z [57].

Mezi cílové transkripční faktory PI3K-AKT-mTOR signální dráhy patří C-MYC. T-buňky indukují expresi genu *C-MYC* už dvě hodiny po aktivaci, čímž podporují svůj růst a vstup do buněčného cyklu. Transkripční faktor C-MYC reguluje mnoho genů, jejichž produkty se účastní jak buněčného cyklu, tak metabolismu [58]. Mezi procesy regulované transkripčním faktorem C-MYC patří metabolismus glukózy, glutaminu a mitochondriální biogeneze. Konkrétně C-MYC může řídit expresi všech glykolytických

genů, včetně *GLUT1*, laktátdehydrogenázy A (*LDHA*), *PKM2* (z angl. pyruvate kinase muscle isozyme) a hexokinázy [67], stejně jako glutaminázy a glutaminových transportérů [68]. Dále je důležitý pro regulaci glutaminolýzy a tvorbu α -ketoglutarátu, který slouží jako intermediát TCA cyklu [58] .

Dalším cílovým transkripčním faktorem PI3K-AKT-mTOR signální dráhy je HIF1 α (z angl. hypoxia-inducible factor 1 α). Během hypoxie vede k transkripci mnoha genů, které jsou nezbytné pro přežití buněk v prostředí s nedostatkem kyslíku. Tyto geny kódují enzymy, které jsou nezbytné pro průběh glykolýzy [69]. HIF1 α zvyšuje expresi genu *GLUT1* a upřednostňuje zisk ATP glykolýzou oproti oxidační fosforylaci tím, že zvýší činnost pyruvát dehydrogenázové kinázy 1 (PDK1). PDK1 je enzym, který inhibuje vstup pyruvátu do TCA cyklu [70]. Exprese HIF1 α není regulována pouze hladinami kyslíku, ale také závisí na vnějších podnětech, které jsou integrovány aktivitou mTOR [71].

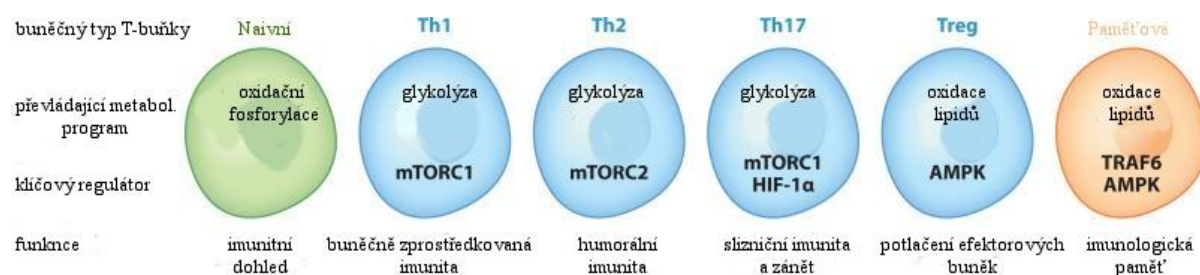
mTOR je evolučně konzervovaná serin/threoninová kináza, která spojuje různorodou řadu environmentálních podnětů, čímž reguluje růst, přežití a proliferaci buněk. mTOR je přítomná ve dvou fyzikálně a funkčně odlišných bílkovinných komplexech mTORC1 a mTORC2, které se vzájemně odlišují svou regulací, cíli působnosti a citlivostí na alosterický inhibitor mTOR rapamycin [72]. mTORC1 integruje vstupy z pěti hlavních intracelulárních a extracelulárních podnětů – růstové faktory, stres, stav energie a kyslíku, aminokyseliny. Toto spojení využívá k řízení mnoha hlavních procesů, včetně syntézy proteinů a lipidů [73]. mTORC1 dále zvyšuje expresi HIF1 α , čímž nepřímo stimuluje proces glykolýzy [72]. Propojení metabolismu a aktivace T-buněk je znázorněno na obr. 10 na straně 28.



Nature Reviews | Immunology

Obrázek 10: Schéma propojení metabolismu a aktivace T-buněk. Na obrázku je znázorněno propojení kanonických signálních drah T-buněk (modře) a regulátorů metabolismu (zeleně). Kanonické signální dráhy vedou k transkripci, která je indukována aktivací těchto cest. Tyto signální dráhy jsou zprostředkovány NF- κ B, aktivačním proteinem 1 (AP-1) a nukleárním faktorem aktivovaných T-buněk (NFAT). Zvýšená metabolická potřeba T-buněk pro jejich diferenciaci a efektorovou funkci je regulována C-MYC, HIF1 α a mTORC1. Převzato a upraveno z [70].

Diferenciace a funkce T-buněk je spojena s jejich metabolismem. Metabolické přeprogramování neprobíhá u všech T-buněk stejně, u různých typů T-buněk se na něm podílí jiné transkripční regulátory [58]. Regulátory, které se podílí na metabolickém přeprogramování T-buněk, jsou znázorněny na obr. 11 na straně 29.



Obrázek 11: Jednotlivé typy T-buněk a pro ně charakteristický metabolický program a transkripční regulátor. Převzato a upraveno z [58].

Po úspěšném zabití a odstranění patogenu z organismu dochází k návratu do klidového stavu. V tomto období se rovněž tvoří paměťové buňky, které tvoří účinnou obranu při opětovné infekci stejným patogenem [57]. Stejně jako při tvorbě efektorových buněk i zde při tvorbě paměťových buněk hraje metabolické přeprogramování významnou roli. AMPK (z angl. 5'-AMP activated kinase) aktivuje TSC2, který inhibuje mTORC1, čímž potlačuje průběh glykolýzy [64]. AMPK dále podporuje oxidaci mastných kyselin (MK). K tomu dochází inhibicí ACACA (z angl. acetyl-CoA carboxylase 1), která je stěžejní pro syntézu MK [74]. Tento posun metabolismu je stěžejní pro vývoj a přežití paměťových buněk [57].

1.2.2. Degradace YAP při antivirové imunitní odpovědi

Vrozená imunita slouží jako první obranná linie hostitele proti patogenům. Virové částice jsou krom jiného detekovány receptory TLR (z angl. Toll-like receptor), RLR (z angl. retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors) a cytosolickými receptory rozpoznávajícími virovou DNA [75,76]. Navázání virové částice na receptor vyvolá konformační změnu v jeho cytosolické části, která umožní navázání adaptorových molekul TRIF (z angl. TIR domain-containing adapter molecule), MAVS (z angl. mitochondrial antiviral-signaling protein) a STING (z angl. stimulator of interferon genes), což následně spouští řadu signálních drah [77]. Tyto dráhy společně sdílí I κ B kinázový komplex (IKK), který je složen buď z IKK α , IKK β a IKK γ , nebo z kinázy TBK1 a IKK ϵ . Komplex IKK a TBK1-IKK ϵ aktivuje transkripční faktory NF- κ B a IRF3, které po translokaci do jádra spouští transkripci genů kódujících interferony I. typu (IFN- α a IFN- β) [78], a také prozánětlivé cytokiny jako jsou např. IL-1, IL-6 a IL-8. Interferony I.

typu jsou schopné inhibovat replikaci virů. Dále jsou zodpovědné za aktivaci klíčových složek jak vrozeného, tak adaptivního imunitního systému, zrání antigen prezentujících buněk, produkci cytokinů a za aktivaci T i B-buněk [79].

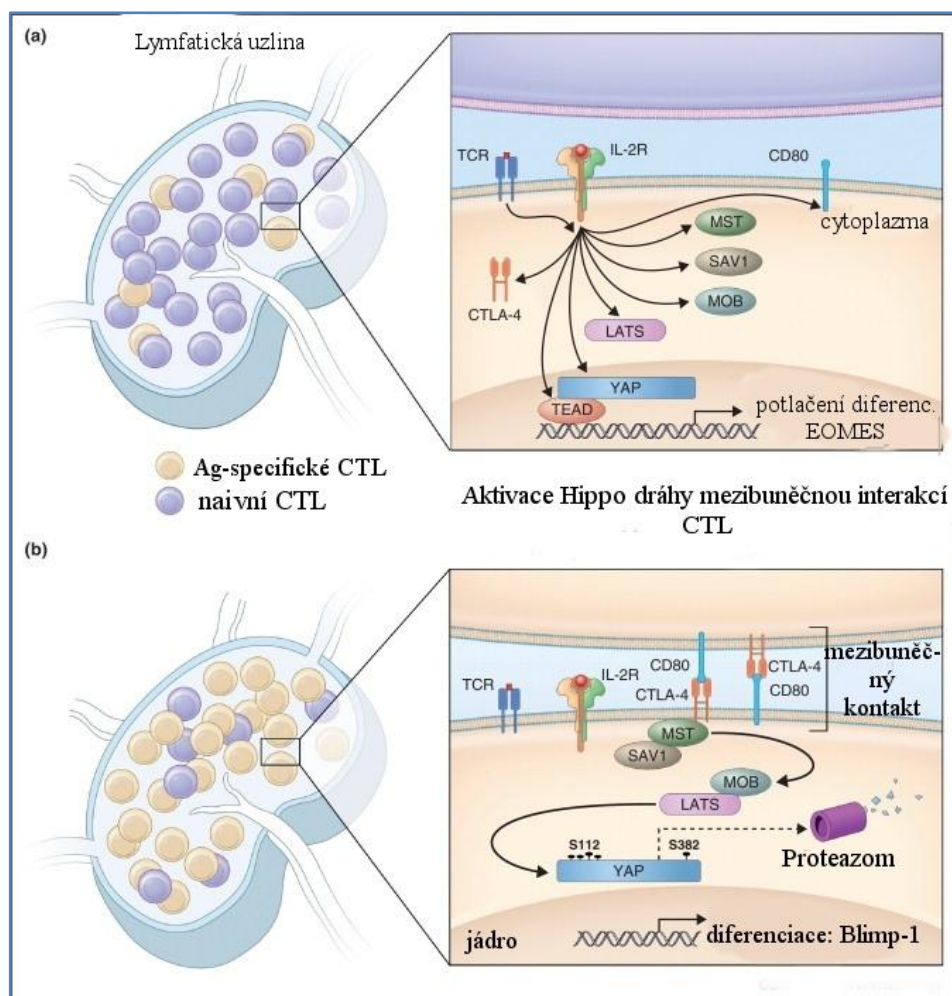
V roce 2017 bylo dokázáno, že YAP působí jako regulátor vrozené antivirové odpovědi zprostředkované IRF3. YAP interaguje s IRF3, čímž inhibuje jeho dimerizaci a tím i translokaci do jádra. Tímto mechanismem dochází k inhibici antivirové odpovědi. Deficit YAP proteinu zesiluje funkci IRF3, produkci INF- β a vrozenou antivirovou odpověď na virovou DNA či RNA *in vitro* i *in vivo*. V průběhu virové infekce je YAP fosforylován IKK ϵ kinázou na Ser403, která vyvolává jeho degradaci v lysozomech. YAP tedy funguje jako antagonist IRF3 [75].

1.2.3. Aktivace Hippo dráhy kontaktem dvou cytotoxických T-lymfocytů

Cytotoxické T-lymfocyty (CTL) hrají významnou roli v obraně organismu proti intracelulárním patogenům a nádorovým onemocněním. V reakci na tyto stimuly naivní CTL podléhají klonální expanzi a dochází k tvorbě velkého počtu efektorových buněk [80]. Na konci imunitní odpovědi většina efektorových CTL hyne apoptózou. Malá část aktivovaných buněk vytváří paměťové buňky [81]. Přítomnost KLRG1 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) a IL-7R receptorů odlišuje prekursorů paměťových buněk od buněk efektorových. O jejich vzniku rozhoduje množství transkripčního faktoru T-bet. Velké množství T-bet vyvolává tvorbu krátce žijících efektorových buněk (KLRG1⁺, IL-7R⁻) a naopak malé množství T-bet indukuje tvorbu prekursorů paměťových cytotoxických buněk (KLRG1⁻, IL-7R⁺) [82].

CTL mají na svém povrchu cytotoxický T-lymfocytární protein 4 (CTLA-4). Jedná se o receptor, který je exprimován především na aktivovaných T-buňkách a regulačních T-lymfocytech [83]. Ukázalo se, že Hippo signální dráha má důležitou roli v diferenciaci CTL [80]. Samotná signální dráha může být spuštěna interakcí CTLA-4 s CD80 či CD86 na povrchu dvou aktivovaných CTL. Protože z počátku rané fáze klonální expanze je antigenně specifických buněk velmi málo, pravděpodobnost jejich vzájemného kontaktu je nízká [84]. Tím nedochází k fosforylaci YAP a jeho následné degradaci prostřednictvím Hippo signální dráhy [80].

Studie ukazují, že odezva CTL na stimulaci antigenem v prostředí IL-2 vede k expresi transkripčního faktoru Eomesoderminu (*EOMES*), jehož přepis je závislý na YAP proteinu. *EOMES* potlačuje expresi jeho funkčního antagonisty Blimp-1 a podporuje tvorbu paměťových prekurzorů. Stimuluje produkci INF- γ či migraci CTL do nádorové tkáně a potlačuje produkci IL-17 [85]. Kontakt mezi aktivovanými CTL indukuje degradaci YAP proteinu prostřednictvím Hippo signální dráhy. Tím v prostředí IL-2 dochází k expresi Blimp-1 proteinu, který inhibuje transkripční faktor *EOMES*, čímž potlačuje tvorbu prekurzorů paměťových buněk [84,86]. Blimp-1 je zodpovědný za terminální diferenciaci CTL a jejich efektorové funkce jako je například cytotoxicita [87]. Aktivace Hippo signální dráhy kontaktem dvou aktivovaných CTL v prostředí IL-2 je znázorněna na obr. 12 na straně 32.



Obrázek 12: Hippo signální dráha a její úloha při diferenciaci CTL.

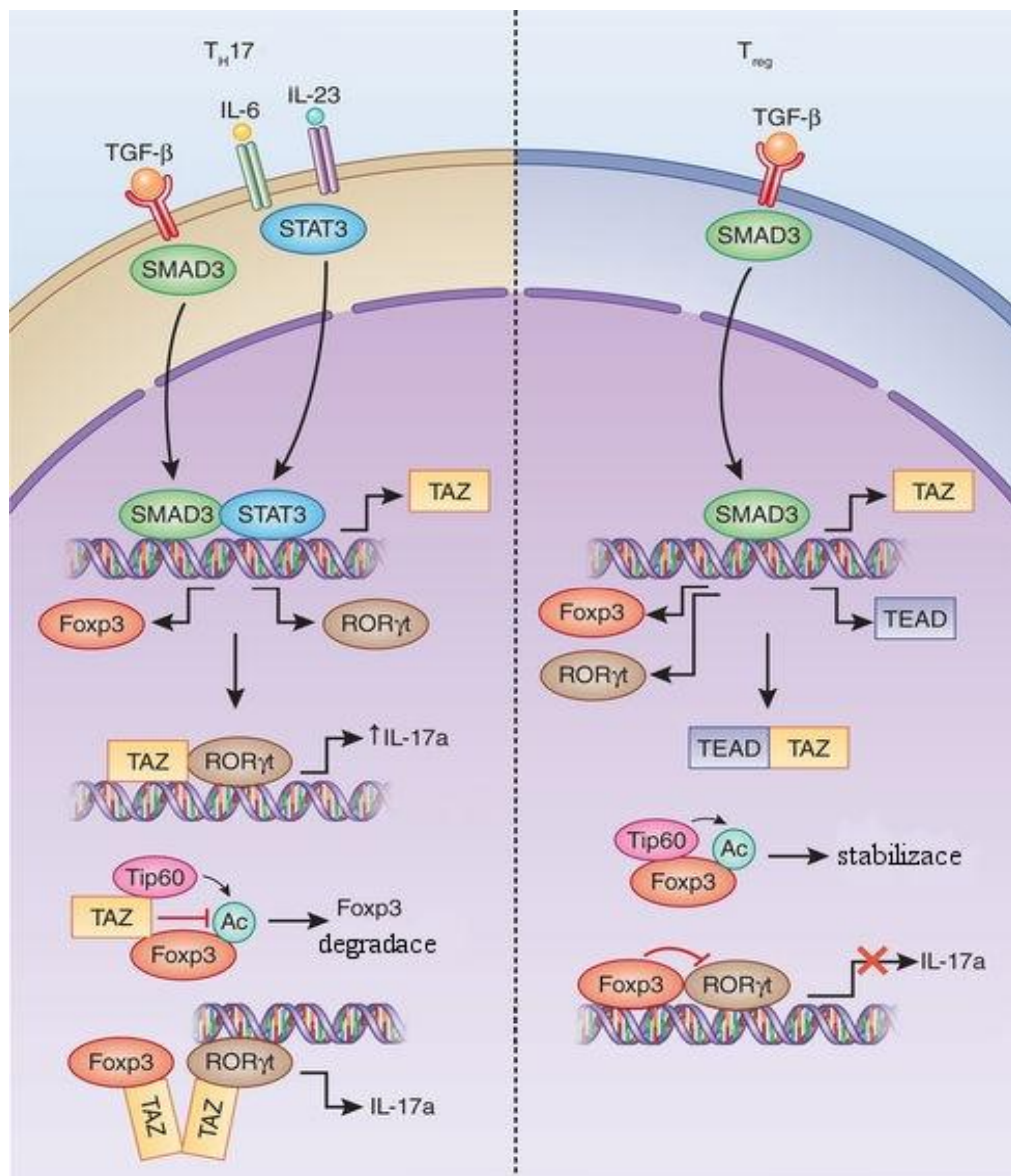
A): Po stimulaci CTL antigenem v prostředí IL-2 nejprve dochází k transkripci a translaci jednotlivých složek Hippo signální dráhy. Jelikož v rané fázi klonální expanze je antigenně specifických buněk ze začátku málo, jejich vzájemný kontakt je velmi nepravděpodobný. Hippo signální dráha není aktivní, tudíž k degradaci YAP proteinu nedochází. Transkripce genu *EOMES*, která je závislá na YAP proteinu potlačuje expresi Blimp-1 a podporuje tvorbu paměťových prekurzorů.

B): Klonální expanze zvyšuje počet antigenně specifických T-buněk, a tím i pravděpodobnost jejich vzájemné interakce. Interakcí CTLA-4 s CD80 dochází k aktivaci Hippo signální dráhy. YAP protein je díky aktivní dráze fosforylován a degradován, což je v prostředí IL-2 spojené s expresí proteinu Blimp-1 a terminální diferenciací CTL. Převzato a upraveno z [80].

1.2.4. Regulace Th17-Tregs buněčné rovnováhy pomocí TAZ

Th17 skupina pomocných T-buněk a T-regulační buňky (Tregs) mají protichůdné role v chronických zánětlivých onemocněních [88]. Th17 představují prozánětlivou skupinu buněk, která může přispět k rozvoji autoimunitních onemocnění a poškození tkáně. Naopak Tregs jsou imunosupresivní buňky, které zabraňují vzniku autoimunitních chorob [89]. Vývoj těchto dvou odlišných skupin buněk ze stejného prekursoru je závislý na cytokinové stimulaci. TGF- β řídí diferenciaci naivních T-buněk na Tregs, zatímco TGF- β společně s prozánětlivými cytokiny IL-21, IL-23 a IL-6 vede ke vzniku Th17 [90]. TGF- β aktivuje transdukční protein SMAD3, čímž vyvolá expresi transkripčního faktoru Foxp3, který je nezbytný pro vývoj Tregs. Naproti tomu IL-6 aktivuje JAK/STAT signální dráhu, jež vyvolává expresi transkripčního faktoru ROR γ T, který definuje Th17 a expresi IL-17 [91,92]. TGF- β samostatně indukuje expresi obou transkripčních faktorů ROR γ T i Foxp3, ale nikoli expresi IL-17 [89].

Transkripční koaktivátor TAZ má klíčovou roli v diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk, vývoji rakoviny a kontrole velikosti orgánů [93,94]. Jak již bylo popsáno výše, TAZ je regulován prostřednictvím Hippo signální dráhy. Aktivace STAT3 souběžně pomocí IL-6 nebo IL-23 silně indukuje expresi TAZ. Nedávná studie dokázala, že TAZ hraje zásadní roli při diferenciaci Th17 pomocí několika mechanismů. TAZ přímou vazbou aktivuje ROR γ T a blokuje inhibiční účinek Foxp3 na ROR γ T. Tím podporuje expresi genů asociovaných s Th17 buňkami, včetně IL-17 [88]. TAZ dále inhibuje vývoj Tregs tím, že snižuje acetylaci Foxp3 zprostředkovanou acetyltransferázou Tip-60, což vede k destabilizaci Foxp3 a k jeho zvýšené proteazomální degradaci. Aktivované Tregs spouští expresi TEAD1, který zabraňuje vazbě TAZ na ROR γ T, Tip60 a Foxp3, čímž podporuje diferenciaci Tregs. TEAD tedy funguje jako antagonist TAZ proteinu [88,89]. Regulace Th17 a Tregs je znázorněna na obr. 13 na straně 34. Porušení Th17-Tregs buněčné rovnováhy vede k rozvoji autoimunitních i zánětlivých onemocnění.



Obrázek 13: TAZ reguluje Th17-Tregs buněčnou rovnováhu. TGF- β aktivuje SMAD3, který řídí expresi Foxp3 i ROR γ T. Souběžná aktivace STAT3 IL-6 nebo IL-23 silně indukuje expresi TAZ, který podporuje vývoj Th17 (vlevo) koaktivací transkripce genu kódujícího ROR γ T, zabraňuje acetylaci Foxp3 transkripčního faktoru acetyltransferázou Tip60 a vytváří lešení, které zabraňuje interakci Foxp3 s ROR γ T. Při absenci STAT3 Tregs indukují expresi TEAD1, který odděluje TAZ od Foxp3, čímž upřednostňuje vývoj Tregs. Převzato a upraveno z [88].

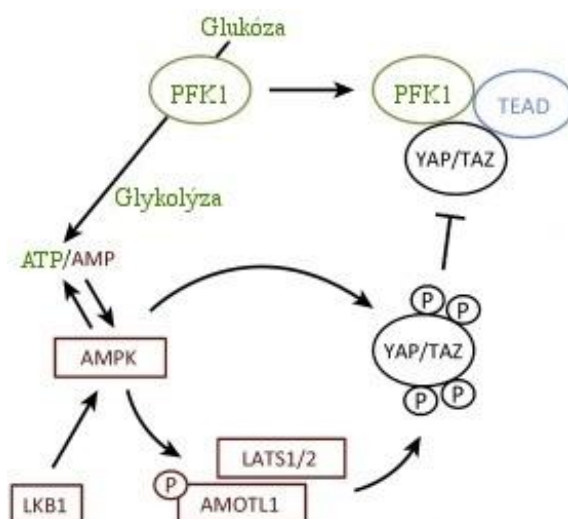
1.3. Souvislost mezi Hippo dráhou a metabolismem

Metabolismus glukózy je centrální biochemická cesta poskytující energii a základní stavební molekuly rostoucím buňkám. Buňky mohou používat glukózu, či její deriváty pro vstup do několika syntetických drah, kterými získají prekurzory hlavních makromolekul potřebné k vybudování buňky a tvorbě energie ve formě ATP v procesu dýchacího řetězce [95]. Byla prokázána existence propojení signálních drah s metabolismem sacharidů, především s metabolismem glukózy. Toto téma však nadále zůstává předmětem výzkumu [96].

Ovlivnění transkripce glukózou může proběhnout dvěma různými mechanismy. V prvním případě intracelulární forma glukózy (glukóza-6P) může přímo ovlivňovat MondoA/ChREBP (z angl. carbohydrate-response element-binding protein) transkripční faktory působící v jádře společně se svým vazebným partnerem Mlx (z angl. Max-like protein x) [97]. Stěžejní úlohou transkripčních faktorů je kontrola exprese enzymů účastnících se lipogeneze a glykolýzy. Tato kontrola je uskutečněna prostřednictvím metabolické adaptace na měnící se hladinu glukózy [96,97]. Navíc glukóza a její metabolismus ovlivňuje celkovou koncentraci ATP, čímž reguluje aktivitu AMPK. AMPK je aktivována jakýmkoli metabolickým stresem, který vyčerpává ATP. K vyčerpání ATP dochází buď inhibicí jeho produkce nebo jeho zrychlenou spotřebou [98]. Buňka s nízkou hladinou ATP je ve stavu energetického stresu, při němž dochází k fosforylaci TSC2 kinázou AMPK a následné inhibici aktivity mTORC1 komplexu. Tento mechanismus AMPK udržuje energetickou homeostázu tím, že napomáhá aktivaci jiné katabolické dráhy, čímž se ustaví původní hodnoty ATP [99].

YAP a TAZ jsou důležité regulátory diferenciaci, přežití buněk a hrají důležitou roli v kmenových buňkách, růstu orgánů a udržení homeostázy v dospělých tkáních. Jejich činnost bývá často narušena při nádorových onemocněních [95]. Nedávno bylo popsáno spojení mezi glukózou a aktivitou YAP/TAZ onkoproteinů [100]. V případě, kdy glukóza je začleněna do aerobní glykolýzy, YAP/TAZ jsou plně aktivní, a tím přispívají k udržení jejich pro-tumorgenní funkce jako je například proliferace nádorů. V opačném případě omezení příjmu glukózy v lidských buňkách *in vitro* vyústilo v inhibici transkripční aktivity YAP/TAZ [100]. Zdá se, že tento průběh procesu je evolučně

zachovalý, jelikož při inhibici glukózy došlo ke stejnému trendu i u octomilky. Glukóza mechanicky řídí stabilitu transkripčního komplexu s transkripčními faktory z rodiny TEAD, a proto nacházíme korelaci mezi transkripční aktivitou YAP/TAZ a buněčnou odpovědí na koncentraci glukózy [96,100]. Mechanismus regulace YAP/TAZ pomocí glykolýzy je znázorněn na obr. 14. Spojení mezi metabolismem glukózy a aktivitou YAP/TAZ bylo prokázáno u buněk rakoviny prsu. Tyto buňky potřebují glukózu pro svou proliferaci [101,102]. Aktivita aerobní glykolýzy *in vitro* je dostatečná k produkci maligních fenotypů buněk rakoviny prsu. Tento fakt koreluje se zvýšenou aktivitou YAP/TAZ u vyšších stupňů nádorů, která je potřebná pro proliferaci a agresivitu buněk [103]. Navíc bylo zjištěno, že fosfofruktokináza-1 (PFK1) váže YAP/TAZ transkripční kofaktory a podporuje jejich funkční a biochemickou spolupráci [100]. PFK1 je enzym, který je významným regulátorem procesu glykolýzy. PFK1 v glykolýze katalyzuje přeměnu fruktózy-6P na fruktózu- 1,6-bisP za spotřeby 1 molekuly ATP.



Obrázek 14: Glukóza poskytuje prostřednictvím metabolické dráhy glykolýzy ATP a sama se oxiduje na pyruvát. Glukóza i aktivita enzymu fosfofruktokinázy-1 ovlivňují transkripci YAP/TAZ a jejich následnou spolupráci s TEAD transkripčním faktorem. Při nízkém poměru ATP/AMP nebo aktivaci LKB1, kináza AMPK fosforyluje komplex YAP/TAZ, což vede k inhibici a následné degradaci komplexu. Aktivovaná kináza AMPK fosforyluje AMOTL1, který podporuje fosforylaci YAP/TAZ prostřednictvím kináz LATS1/2 Hippo signální dráhy. Zelenými barvami jsou označeny ty produkty, které jsou potřebné pro aktivitu komplexu YAP/TAZ a naopak červené komponenty komplex inhibují. Převzato a upraveno z [96].

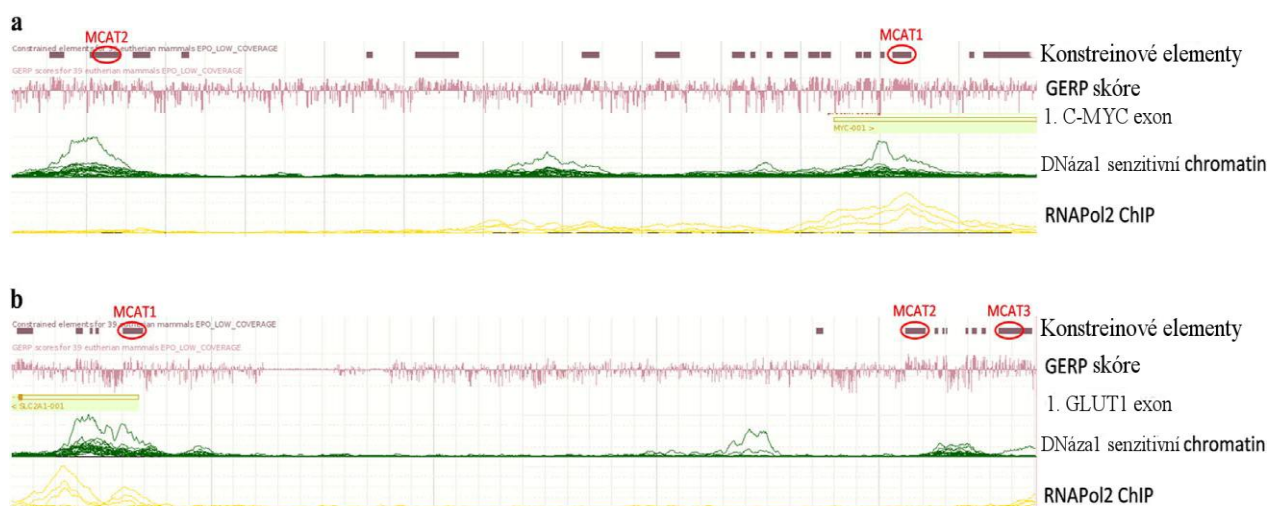
1.4. Současné poznatky regulace TEAD1 proteinem

ChIP-Seq (z angl. Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) analýza provedena na Schwannových buňkách odhalila, že enhancer genu *PMP22* (z angl. Peripheral Myelin Protein 22) obsahuje vazebné motivy pro transkripční faktory rodiny TEAD [32].

Dostupnost velkého počtu MPCs (z angl. multipotent pancreatic progenitor cells) *in vitro* umožnila ChIP-Seq analýzu. Krom již známých transkripčních faktorů jako jsou například GATA6 [104], PDX1 (z angl. pankreas/duodenum homeobox protein 1) [105], HNF1B (z angl. hepatocyte nuclear factor 1-beta), FOXA1/2 (z angl. Forkhead-box A 1/2) [106], které se podílí na embryonálním vývoji pankreatu a jsou nezbytné pro specifikaci MPCs, byly v enhancerech nalezeny i DNA sekvence bohaté na M-CAT elementy pro TEAD1 [107].

ChIP-Seq analýza byla provedena i na nádorových buňkách YAP-ERMS (z angl. human embryonal rhabdomyosarcoma) [108] a v C2C12 buňkách (myoblastová buněčná linie). Pomocí C2C12 buněk se studují aspekty diferenciac svalů. ChIP-Seq analýza u nich identifikovala místa v genomu, na které se váže TEAD1 a TEAD4 [37].

Do dnešní doby nebyla provedena ChIP-Seq analýza pro TEAD1 na leukemických nádorových buňkách. Z tohoto důvodu byla v naší laboratoři provedena bioinformatická analýza *C-MYC* promotoru, kde byly objeveny jednak konzervované M-CAT elementy, tak i aktivní chromatin. M-CAT vazebné elementy se objevily rovněž i v promotoru genu *GLUT1* [10]. Pozice M-CAT vazebných elementů v *GLUT1* a *C-MYC* jsou znázorněny na obr. 15 na straně 38.



Obrázek 15: Pozice M-CAT vazebných elementů pro geny *C-MYC* (a) a *GLUT1* (b). Převzato a upraveno z [10].

2. Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce je experimentálně potvrdit přítomnost TEAD1 v *C-MYC* a *GLUT1* promotorech u leukemických buněk pomocí chromatinové imunoprecipitace. DNA získána touto metodou bude dále použita ke konstrukci DNA knihovny. DNA knihovna v kombinaci s NGS (z angl. Next-Generation Sequencing) umožňuje identifikovat pozice TEAD1 na úrovni celého genomu. Dále se pomocí hmotnostní spektrometrie pokusíme identifikovat proteiny, které v jádře interagují s TEAD1 proteinem.

3. Materiál a metody

3.1. Přístroje a materiál

3.1.1. Biologický materiál

Leukemické T-buňky linie Jurkat (klon E6.1., ATTC Collection, USA)

3.1.2. Přístroje a příslušenství

Aparatura na SDS elektroforézu: *BIORAD* (USA)

Aparatura pro přenos proteinů: *BIORAD* Trans-blot[®] SD Semi-dry transfer cell (USA)

Automatické pipety: *RAININ* Pipet-LITE XLS (Kanada)

Automatické počítadlo buněk: *Logos Biosystems Luna IITM* Automated Cell Counter (USA)

Box hluboce mrazící: *Panasonic* MDF DV500VF-PE (Japonsko)

Bürkerova komůrka: *P-lab* (CZ)

CCD kamera: *BIORAD* ChemiDocTM MP Imaging systém (USA)

Centrifuga: *ALC* PK 110 (Itálie)

Centrifuga: *Eppendorf* 5424R (Německo)

Centrifuga: *Eppendorf* Concentrator Plus (Německo)

CO₂ inkubátor: *Panasonic* (Japonsko)

Destičky: *BIORAD* Hard-Shell[®] PCR Plates, 96 walls, thin-wall (USA)

TPP[®] Tissue culture Testplate 96F (Švýcarsko)

Elektrický zdroj: *BIORAD* PowerPacTM HC (USA)

Filtrační papír: *BIORAD* Extra Thick Block Paper (USA)

Kultivační láhve: *TPP*[®] Tissue culture Flask 300 a 150 cm² (Švýcarsko)

Laminární box: *SafeFAST Classic* (Itálie)

Magnetický stojan: *New England Biolabs* 6 Tubes Magnetic Separation Rack (UK)

Nástavec na pipety: *Pipetus*[®] HIRCHMANN LABORGERATE (Německo)

Nitrocelulosová membrána (póry 40µm): *SANTA Cruz Biotechnology* (USA)

PCR: CFX 96TM Real-Time System *BIORAD* (USA)

Plastové špičky na automatické pipety: *RAININ* Precision Pipette Tips (USA)

Rotátor: *BIOSAN* Bio-RS 24 Mini Rotator (Litva)

Spektrofotometr: *BioTek* Synergy HT (USA)

Spektrofotometr a fluorometr: *DENOVIX* Ds-11 FX+ (USA)

Termostat a třepačka: *BIOER* Mixing Block MB-102 (Čína)

Třepačka: *Benchmark Scientific Inc.* (Taiwan)

Váhy: *KERN*[®] EMB 600-2 (Německo)

Vakuový koncentrátor: *JOUAN* RC10-10 (Francie)

Vortex: *Biosan* Vortex V-1 plus (Litva)

3.1.3. Chemikálie

Agaróza LSL-LE 8200: *Lonza* (USA)

Amoniak vodný roztok 25% p. a.: *Lachner* (CZ)

Akrylamid: *BIORAD* (USA)

APS (peroxodisíran amonný): *Sigma Aldrich* (CZ)

Azid sodný: *Amresco* (Francie)

Benzonáza: *Merck* (Německo)

BSA (hovězí sérový albumin): *Serva* (Německo)

Destilovaná voda

Detergent: Nonidet NP40 (4-Nonylphenyl-polyethylene glycol) *Sigma Aldrich* (CZ)

Dodecylsíran sodný (SDS): *BIORAD* (USA)

EDTA (ethyldiamintetraoctová kyselina): *Active Motif* (Belgie)

Ethanol: P-lab (CZ)

Enzym: Micrococcal Nuclease: *New England Biolabs* (UK)

FBS (Fetální hovězí sérum): *ThermoFisher Scientific* (USA)

Formaldehyd (37% vodný roztok): *Sigma Aldrich* (CZ)

GelRed Nuclei Acid Stain Solution: 10 000x in water, *Biotium* (USA)

Hypotonický pufr 10x: *Active Motif* (Belgie)

Chlorid sodný: *Active Motif* (Belgie)

Inhibitory: Halt™ Protease Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x: *ThermoFisher Scientific* (USA)

Kyselina kumarová: *Sigma Aldrich* (CZ)

Luminol: *Sigma Aldrich* (CZ)

Master Mix SsoFast™ EvaGreen® Supermix: *BIORAD* (USA)

Médium: *LONZA BioWhittaker® RPMI 1640* s L-Glutamínem, FBS a ATB (USA)

Odtučněné sušené mléko: *BIORAD* Blotting-Grade Blocker (USA)

PBS pufr (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄; 0,2 mM K₂HPO₄; pH 7,4): *Sigma Aldrich* (CZ)

Peroxid vodíku vodný roztok: *Fluka Analytical* (Německo)

Proteázový inhibiční koktejl (PIC): *Active Motif* (Belgie)

Proteináza K: (2 mg/ml) *Sigma Aldrich* (CZ)

Protilátky:

- RNA pol. II mouse antibody IgG 0,2 mg/ml; *Active Motif* (Belgie)
- Bridging antibody for mouses IgG; *Active Motif* (Belgie)
- *TEAD1 rabbit antibody*; *Cell Signalling* (USA)
- TEF1 rabbit polyclonal antibody 1 mg/ml; *GeneTex* (USA)
- TEF1 mouse monoclonal antibody 2,66 mg/ml; *Sigma Aldrich* (CZ)
- Negative Control IgG; *Active Motif* (Belgie)
- Rabbit IgG isotype control antibody 5 mg/ml; *GeneTex* (USA)
- Goat-anti-rabbit IgG – HRP; *Santa Cruz Biotechnology* (USA)

Přenosový pufr (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2)

Pufr pro elektroforézu 10x TGS (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3) *BIORAD* (USA)

Pufr pro enzym: Micrococcal Nuclease Buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.9): *New England Biolabs* (UK)

RNázaA (10 mg/ml): *ThermoFisher Scientific* (USA)

Sigma voda: *Sigma Aldrich* (CZ)

Standard pro elektroforézu: *BIORAD* Precision Plus Protein Standards, All Blue (USA)

Standard pro elektroforézu DNA: 100 bp DNA ladder *Promega* (USA)

Substrát: *ThermoFisher Scientific* Super Signal West Femto Trial Kit (USA)

TAE pufr 50x (2 M Tris-acetát, 0,05 M EDTA, pH 8.3)

TEMED (tetramethylethylendiamin): *Sigma Aldrich* (CZ)

Tris (tris(hexomethyl)aminomethan) pufr (0,1M; pH 8,8)

TTBS pufr (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6)

Vzorkový pufr pro DNA elektroforézu: Blue/ Orange 6x Loading Dye: *Promega* (USA)

Vzorkový pufr Leammli pro SDS elektroforézu (2,4 ml 1M Tris o pH 6,8; 0,8 g SDS; 4 ml 100% glycerol; 0,01% bromfenolová modř; 1 ml merkaptoethanolu; 2,8 ml vody)

3.1.3.1. Kity

- Kit pro Co-Imunoprecipitaci: Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit invitrogen: *Thermo Fisher Scientific* (SB pufr; HB pufr; C1 a C2 roztoky; LB pufr; 5x LWB pufr; 5x IP; Dynabeads™ M-270 Epoxy; EB pufr)
- Kit pro ChIP: ChIP-IT® Express Enzymatic: *Active Motif* (10x Glycin; ChIP pufr 1 a 2; 1x Lysis pufr; 10x PBS; Proteináza K 0,5 mg/ml; RNáza A 10 µg/µl; Protein-G Magnetické kuličky; Reverse-Crosslink pufr; Proteináza K Stop roztok; Inhibiční roztok proteáz; Enzymatický koktejl; 5 M NaCl; 0,5M EDTA; Pufr pro eluci AM2; 100 mM PMSF; 10x Hypotonický pufr)
- Kit pro čištění chromatinu: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Sytem: *Promega* (Membrane Wash Solution; Bind Solution ; Nuclease Free Water; Collection Tubes; SV Minicolumns)
- Kit pro izolaci genomové DNA: Wizard® Genomic DNA Purification kit: *Promega* (DNA Rehydration Solution; Cell Lysis Solution; Nuclei Lysis Solution; Protein Precipitation Solution; RNasa A Solution)

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace a pasážování buněk

Leukemické T-buňky byly kultivovány při teplotě 37° C, v atmosféře 5% CO₂ v RPMI 1640 médiu obsahující antibiotika (100 jednotek penicilinu a 0,1 mg streptomycinu na 1 ml média) a 10% fetální hovězí sérum. Buňky byly vždy pasážovány v takovém časovém horizontu, aby nepřesáhly koncentraci 700 000 buněk /ml.

3.2.2. Příprava chromatinu

Buňky byly nasazeny tak, aby se jejich koncentrace v průběhu experimentu pohybovala v rozmezí 500 000 – 700 000 buněk/ml. Z kultivační láhve byl odebrán požadovaný počet buněk tak, aby jejich výsledná koncentrace v celkovém objemu byla 10 000 000 buněk. Poté byly buňky centrifugovány (při 20° C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Následně byl pelet buněk resuspendován v 10 ml roztoku 1xPBS a opět stočen (při 20° C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Poté byl odstraněn supernatant a k buňkám byla přidána Fixační soluce (20 ml média BioWhittaker® RPMI 1640 a 0,54 ml 37% formaldehydu) a po dobu 7 minut byl vzorek ponechán na třepačce při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl vzorek stočen (při 20° C, 3 min na 400x g; ALC PK 110). Poté byl supernatant odstraněn a pelet buněk byl opět resuspendován v 10 ml roztoku 1xPBS a ihned stočen (při 20° C, 3 min na 400x g; ALC PK 110). Následně byl opět odstraněn supernatant a k buňkám byl přidán Glycin-Stop roztok (8 ml dH₂O, 1 ml 10x PBS a 1ml 10x Glycin). Buňky byly v roztoku ponechány 7 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Následně byly buňky stočeny (při 20° C, 10 min na 500x g; ALC PK 110). Po stočení byly buňky promyty 1 ml roztoku 1xPBS a stočeny (při 4° C, 4 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Poté byl pipetou odstraněn supernatant a pelet buněk byl resuspendován v 500 µl Hypotonického pufru (450 µl 10x Hypotonický pufr a 50 µl dH₂O) a ponechán 15 minut na ledu. Po uplynutí doby bylo ke vzorku přidáno 25 µl detergentu (Nonidet NP40) a roztok s buňkami byl opatrně promíchán pipetou. Poté byl vzorek stočen (při 4° C, 30 sekund na 12 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) a supernatant byl opatrně pipetou odstraněn. Získaná jádra buněk byla resuspendována v 350 µl 10x naředěném Micrococcal Nuclease pufru s proteázovými inhibitory (HaltTM Protease Phosphatase Inhibitor Cocktail).

3.2.3. Enzymatické štěpení chromatinu

Vzorek získaných jader v Micrococcal Nuclease pufru s inhibitory byl temperován 5 minut na 37° C. 1 µl enzymu Micrococcal Nuclease byl přidán do 99 µl 50% glycerolu. Do vzorku bylo po jeho vytemperování na 37° C přidáno 5 µl roztoku enzymu a obsažený chromatin byl štěpen po dobu 8 minut při teplotě 37° C. Vzorek byl vortexován každé dvě minuty. Reakce byla zastavena přidáním 7 µl 0,5M EDTA. Vzorek byl následně chlazen 10 minut na ledě a poté stočen (při 4° C, 10 min na 18 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Vzorek byl využit pro imunoprecipitaci jak pomocí proteinu G, tak i pomocí kuliček Dynabeads.

Před kontrolou míry enzymatického štěpení chromatinu bylo nutné chromatin decroslinkovat. K 50 µl vzorku chromatinu bylo přidáno stejné množství Reverse Cross-link pufru a vzorek byl zahříván při 95° C po dobu 15 minut. Po 15 minutách byly do vzorku přidány 2 µl RNázy A. Poté byl vzorek zahříván při 37° C po dobu 15 minut. Po uplynutí doby byly do vzorku napipetovány při laboratorní teplotě 2 µl Proteinázy K a následně byl vzorek zahříván po dobu 60 minut při 37° C. Po uplynutí doby byly do vzorku napipetovány 2 µl Stop Proteinázy K a získaný vzorek chromatinu byl využit pro identifikaci míry štěpení pomocí elektroforézy.

3.2.4. Příprava genomové DNA

Z kultivační láhve byl odebrán takový objem buněk, aby koncentrace buněk pro experiment nepřesáhla hodnotu 1 000 000 buněk. Pro izolaci genomové DNA byl využit protokol z Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Buněčná kultura byla nejprve stočena (při 20° C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Následně byl pelet buněk resuspendován v 1 ml roztoku 1xPBS a opět stočen (při 20° C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k buňkám bylo přidáno 600 µl Nuclei Lysis roztoku a 3 µl roztoku RNázy. Vzorek byl inkubován 30 minut při 37° C. po uplynutí doby a zchlazení vzorku na laboratorní teplotu bylo k vzorku přidáno 200 µl Protein Precipitation roztoku. Vzorek byl krátce vortexován a pak ponechán 5 minut na ledu. Poté byl vzorek centrifugován (při 4° C, 4 min na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Po centrifugaci byl supernatant přenesen do 600 µl isopropanolu. Vzorek byl v ruce promíchán a následně centrifugován (při 4° C, 1 min na 14 000x g; centrifuga

5424R, Eppendorf). Poté byl supernatant odstraněn a k peletě buněk bylo přidáno 600 µl 70% ethanolu. Vzorek byl v ruce promíchán a centrifugován (při 4° C, 1 min na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Následně byl ethanol odstraněn a peleta buněk resuspendována v 200 µl DNA Rehydration roztoku. Poté byl vzorek inkubován 60 minut při 65° C. Nakonec byla změřena koncentrace a čistota vyizolované genomové DNA na spektrofotometru (*DENOVIX Ds-11 FX+*).

3.2.5. Elektroforéza

0,75 g L-agarózy bylo rozpuštěno v 50 ml 1xTAE pufru. Agaróza se v roztoku rozpouštěla v mikrovlnné troubě po dobu 50 s. Do rozehrátého gelu byly přidány 4 µl GelRed Nuclei Acid Stain a ještě vařící byl přenesen do předem vyvážené aparatury, kde gel ztuhl.

Před nanesením na gel byl rozštěpený chromatin čištěn pomocí kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Sytem. Ke 200 µl vzorku chromatinu bylo napipetováno stejné množství Membrane Binding Solution. SV Minicolumn (SVM) bylo vloženo do Collection Tube (CT) a vzorek, naředěn Membrane Binding solution v poměru 1:1, byl přenesen do SVM. Vzorek byl centrifugován (při 20° C, 1 min na 16 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Roztok proteklý do CT se odstranil a do SVM bylo přidáno 700 µl Membrane Wash Solution, Vzorek byl opět centrifugován (při 20° C, 1 min na 16 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Proteklý roztok se znovu odstranil a do SVM bylo napipetováno 500 µl Membrane Wash Solution, Vzorek byl stočen (při 20° C, 5 min na 16 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Následně se SVM v CT centrifugovala (při 20° C, 1 min na 16 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) pro vysušení SVM. SVM bylo přeneseno do nové CT a bylo do něj přidáno 50 µl Nuclease-Free Water. SVM bylo inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě a následně stočeno (při 20° C, 1 min na 16 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Nově vzniklý čistý vzorek chromatinu byl využit pro elektroforézu a pro stanovení koncentrace chromatinu na spektrofotometru (*DENOVIX Ds-11 FX+*).

K 15 µl vzorku chromatinu bylo přidáno 5 µl vzorkového pufru (Blue/ Orange 6x Loading Dye). Jako standard byl využit 100 bp DNA ladder, kdy bylo smícháno 5 µl

standardu se 3 μ l vzorkového pufru. Elektroforéza probíhala 70 minut při napětí 100 V v aparatuře (Bio-Rad-Mini-Sub® Cell GT Cell) vyplněné 300 ml 1xTAE pufrem (6 ml 50x TAE, 294 ml dH₂O).

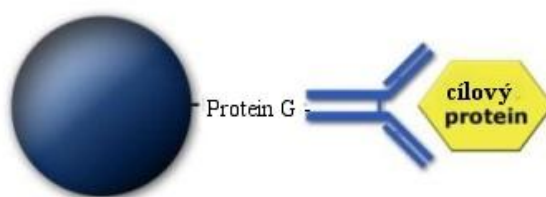
3.2.6. Imunoprecipitace pomocí G-proteinu

K imunoprecipitaci pomocí proteinu G byl využit kit od firmy Active Motif. Ke všem třem vzorkům obsahujícím 50 μ l chromatinu bylo přidáno 25 μ l Protein-G Magnetic Beads, 10 μ l ChIP Pufru 1, 1 μ l PIC, 10 μ l destilované vody a protilátky, které jsou pro jednotlivé vzorky uvedeny v Tabulce 1. Protilátky byly přidány do reakce vždy jako poslední. Před přidáním byly magnetické kuličky resuspendovány pipetou a zvortexovány. Vychytávání cílového proteinu nesoucí DNA pomocí magnetických kuliček s navázaným G proteinem je znázorněno na obrázku 16 na straně 49.

Tabulka 1: Uvedené protilátky a jejich přidaná množství ke vzorkům obsahujícím 50 μ l enzymaticky štěpeného chromatinu

protilátky	Chromatin (štěpený 15 minut) 50 μ l		
	vzorek č. 1	vzorek č. 2	vzorek č. 3
RNA polymeráza II	5 μ l	-	-
Bridging Ab	1 μ l	-	-
TEAD1	-	-	5 μ l
Negative control IgG	-	5 μ l	-

Všechny vzorky byly inkubovány přes noc v lednici při 4° C na rotátoru. Následující den byly vzorky centrifugovány (při 4° C, 1 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Poté byly vzorky umístěny na magnetický stojánek (Tube Magnetic Separation Rack) a odstraněn supernatant. Magnetické kuličky nesoucí protein-G byly na magnetickém stojánku promyty nejprve 800 μ l ChIP Pufrem 1 a následně dvakrát 800 μ l ChIP Pufrem 2 (oba od firmy *Active Motif*). Po odstranění supernatantu byly všechny tři vzorky resuspendovány v 50 μ l AM2 Pufru a ponechány 15 min na rotátoru při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byly vzorky centrifugovány (při 4° C, 1 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) a ke každému bylo přidáno 50 μ l Reverse-cross link pufru. Po umístění na magnetický stojánek byly získány vzorky.



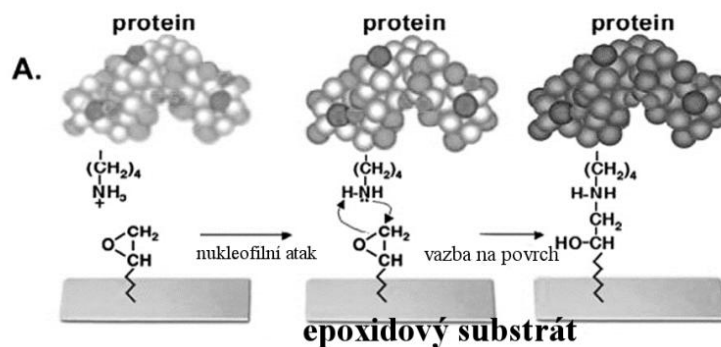
Obrázek 16: Mechanismus vychytávání cílového proteinu s navázanou DNA pomocí magnetických kuliček nesoucí G protein.

Vzorky získané imunoprecipitací pomocí G-proteinu byly následně inkubovány 15 minut při teplotě 95° C, poté do každého vzorku byly přidány 2 µl Proteinázy K. Po přidání Proteinázy K byly vzorky inkubovány 60 min při teplotě 37° C. Po 60 minutách byly do vzorků přidány 2 µl Proteinázy K Stop. Vzorky byly využity pro qPCR analýzu.

3.2.7. Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads

3.2.7.1. Navázání protilátky na kuličky Dynabeads

Imunoprecipitace probíhala dle protokolu Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit. Na analytických vahách bylo do ependorfy naváženo 7,5 mg kuliček Dynabeads. Kuličky byly promyty 1 ml roztoku C1. Pomocí magnetického stojánu byl odstraněn roztok C1 a ke kuličkám bylo přidáno 375 µl roztoku C1 obsahující protilátku. Protilátka byla připravena v roztoku C1 tak, aby výsledné množství protilátky bylo 50 µg. Podle koncentrace protilátky bylo přidáno její požadované množství a doplněno do výsledného objemu 375 µl roztokem C1. Nakonec bylo přidáno 375 µl roztoku C2. Výsledný roztok o objemu 750 µl obsahující kuličky Dynabeads a požadovanou protilátku byl inkubován přes noc na rotátoru při laboratorní teplotě. Mechanismus navázání protilátky na kuličky Dynabeads mající na svém povrchu epoxidovou skupinu je zobrazen na obr. 17 na straně 50. Druhý den byl roztok pomocí magnetického stojánu odstraněn, kuličky byly nejprve promyty 800 µl HB pufrém, poté 800 µl LB pufrém a nakonec 3x 800 µl SB pufrém. Po třetím přidání HB pufru byly kuličky inkubovány 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl na magnetickém stojánu roztok odsát a ke kuličkám bylo přidáno 750 µl HB pufru a 7,5 µl 2% azidu.



Obrázek 17: Mechanismus navázání proteinu na magnetické kuličky Dynabeads. Kuličky mají na svém povrchu epoxydovou skupinu, prostřednictvím které reagují s aminoskupinou proteinu. Převzato a upraveno z [109].

3.2.7.2. Postup imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads

Na magnetickém stojánku byl z kuliček odsát SB pufr, ve kterém byly kuličky v lednici uchovány. Azid byl z kuliček vymyt pomocí 900 μl 0,1% roztoku BSA. Kuličky byly inkubovány na rotátoru v roztoku 0,1% BSA při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Poté byly kuličky promyty 3x 900 μl Extrakčního pufru. Složení Extrakčního pufru je znázorněno v tabulce 2 na straně 51. Po posledním promytí bylo ke kuličkám přidáno 50 μl chromatinu v 850 μl Extrakčního pufru. Ze vzorku chromatinu v Extrakčním pufru bylo před přidáním ke kuličkám odebráno 20 μl na detekci pomocí metody western blot (WB). Magnetické kuličky s přidáním chromatinem byly inkubovány při 4° C 30 minut.

Po 30 minutách byl roztok na magnetickém stojánku odstraněn, pouze 20 μl bylo uchováno na detekci WB. Magnetické kuličky poté byly promyty 3x 900 μl Extrakčního pufru, následně 3x 900 μl LWB (800 μl 5xLWB, 3 200 μl dH₂O) pufru. Po promytí bylo ke kuličkám napipetováno 200 μl HPHEB pufru a vzorky byly inkubovány 20 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byly kuličky umístěny na magnetický stojánek a z kuliček byl získán vzorek po imunoprecipitaci. Poté bylo ke kuličkám přidáno 150 μl HPHEB pufru a inkubace na rotátoru probíhala 10 minut při pokojové teplotě. Složení pufru HPHEB je znázorněno v tabulce 3 na straně 51. Na magnetickém stojánku bylo získáno další množství vzorku po imunoprecipitaci. Získaný vzorek byl využit pro PCR analýzu, Western blot a pro hmotnostní spektrometrii.

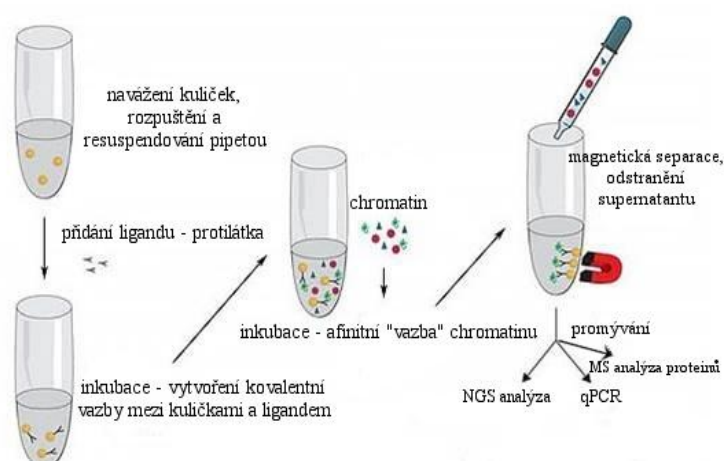
Tabulka 2: Uvedené reagencie a jejich množství potřebná k přípravě Extrakčního pufru o celkovém objemu 10 ml.

reagencie	V (ml)
5X IP	2,0
Inhibitory	0,1
5 M NaCl	0,2
H ₂ O	7,7
Celkový objem	10,0

Tabulka 3: Uvedené reagencie a jejich množství potřebná k přípravě HPHEB pufru o celkovém objemu 1 ml.

reagencie	V (μl)
H ₂ O	965
0,5 M EDTA	1
Amoniak (aq) 25% p.a.	34
Celkový objem	1000

Ke kuličkám bylo nakonec přidáno 750 μl SB pufru a 7,5 μl 2% azidu. Kuličky byly uchovávány v lednici. Obecné schéma imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads je znázorněno na obr. 18.



Obrázek 18: Obecné schéma imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads. Převzato a upraveno z [110].

3.2.8. SDS elektroforéza

Elektroforéza je elektromigrační metoda, která umožňuje dělení látek na základě rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Nejčastěji se využívá elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS uděluje všem proteinům stejný záporný náboj a tím zajišťuje, že se proteiny dělí podle své velikosti.

Pro SDS elektroforézu byly přichystány dva gely: dělicí gel, v němž dochází k rozdělení jednotlivých proteinů a zaostřovací gel, kde se jednotlivé zóny vzorku zaostřují. Složení obou gelů je znázorněno v tabulce 4. Elektroforéza byla prováděna v aparatuře (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra cell) naplněné 500 μ l TGS (25mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% w/v SDS; pH 8.3) pufrém. TGS pufr byl naředěn vodou v poměru 1:10. K vzorkům, které byly získány imunoprecipitací pomocí kuliček Dynabeads byl přidáván vzorkový pufr 4x Leammli tak, aby byl naředěn v poměru 1:4. Připravené vzorky byly povařeny při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Poté byly vzorky centrifugovány (při 20° C, 30 sec na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) a nanесeny na gel. Elektroforéza probíhala prvních 15 min při napětí 100 V a dalších 50 min při napětí 150 V.

Tabulka 4: Použité reagenty a jejich množství pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu.

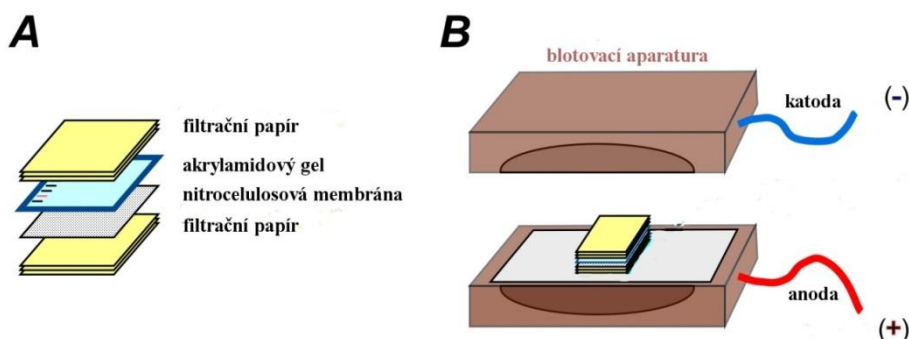
reagenty	dělicí gel (ml)	zaostřovací gel (ml)
30% akrylamid	1,6700	0,4300
1,5 M Tris (pH 8.8)	1,2500	-
0,5 M Tris (pH 6.8)	-	0,3100
10% SDS	0,0500	0,0250
10% APS	0,0500	0,0250
TEMED	0,0025	0,0025
dH ₂ O	1,9800	1,7000

3.2.9. Přenos proteinů

Přenos (z angl. blotting) je metoda, jež se využívá nejen pro přenos proteinů (Western blot), ale rovněž také pro DNA (Southern blot) či RNA (Northern blot). Po proběhlé elektroforéze se rozdělené proteiny přenáší z gelu na nitrocelulosovou

membránu a poté dochází k jejich vizualizaci prostřednictvím imunodetekce, při níž dochází k interakci primární a sekundární protilátky.

Pro přenos proteinů byla využita speciální aparatura (Trans-blot® SD Semi-dry transfer cell) Ze dvou filtračních papírů, gelu a nitroceluloseové membrány byla vytvořena sendvičová struktura, jejíž uspořádání je zobrazené na obr. 19. Všechny komponenty sendvičového uspořádání byly předem namočené v přenosovém pufru (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2). Přenos proteinů probíhal 60 minut při napětí 15 V.



Obrázek 19: Schéma přenosu proteinů z gelu na nitrocelulóзовou membránu. V části A je znázorněna sendvičová struktura jednotlivých komponentů. V B části je znázorněna blotovací aparatura, která je nezbytná pro správný přenos proteinů na membránu. Převzato a upraveno z [111].

Po 60minutovém přenosu proteinů byla membrána blokována v 5 ml roztoku 5% mléka na třepačce (Mixing Block MB-102) při laboratorní teplotě po dobu 45 minut. Po uplynutí doby blokování byla membrána promyta v 10 ml TTBS pufru (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6). Poté byla membrána inkubována do dalšího dne v lednici při 4° C v 5 ml roztoku 5% mléka obsahující 4 µl primární protilátky.

Druhý den byla membrána promyta 3x 10 minut v 10 ml TTBS pufru. Po promytí byla membrána ponechána 45 min při laboratorní teplotě na třepačce v 5 ml roztoku 1%

mléka, do kterého byly přidány 2 μ l sekundární protilátky. Nakonec byla membrána promyta 3x 5 minut v 10 ml TTBS pufru a namočena 45 sekund v roztoku pro vizualizaci, který byl připraven smícháním roztoku 1 a 2 (1: 0,1 M Tris o pH 8.8; 0,018% peroxid vodíku; 2: kyselina kumarová, luminol). Množství použitých reagensů v roztoku pro vizualizaci jsou uvedeny v tabulce 5. Smícháním obou zmíněných roztoků vznikl chemiluminiscenční substrát, který reaguje s křenovou peroxidázou, která je konjugovaná se sekundární protilátkou. Křenová peroxidáza přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje tak, že vyzáří světlo. Vyzářené světlo bylo na membráně detekováno CCD kamerou (ChemiDocTMMP Imaging Systém).

Tabulka 5: Použité reagensie a jejich množství pro přípravu roztoku 1 a 2, jejichž smícháním vznikne roztok pro vizualizaci nitrocelulóзовé membrány.

reagensie	roztok 1 (ml)	roztok 2 (ml)
Luminol	-	10,000
Kyselina kumarová	-	0,044
0,1 M Tris (pH 8.8)	10,000	-
Hydrogen Peroxide Solution	0,007	-

3.2.10. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR z angl. Polymerase chain reaction) je metoda, při které dochází k mnohonásobné amplifikaci DNA. Ke zmnožení úseků DNA musí být jednotlivé úseky na začátku i na konci ohraničeny primery.

Primery byly navrženy v databázi Ensembl pro exon a enhancer genu *C-MYC* a pro enhancer genu *GLUT1* tak, aby každý primer měl zastoupení CG párů mezi 50-60%, délku 20 párů bází a neobsahoval sekundární struktury ani netvořil dimery. Navržené primery byly testovány na jejich efektivitu. Testování primerů bylo provedeno tak, že byla připravena ředící řada vyizolované genomové DNA. Každý následující vzorek byl 10x vyředěn Sigma vodou oproti původnímu. Aby byla efektivita PCR 100%, hodnoty C_T (z angl. cycle of threshold) by se od sebe měly lišit o 3,32. Platí, že pokud je efektivita 100%, tak v každém proběhlém cyklu se množství DNA zdvojnásobí. V tomto

případě PCR reakce běží dle 2^n , kde n je počet proběhlých cyklů. Účinnost PCR lze získat ze sklonu standardní křivky. Standardní křivka byla získána vynesemím závislosti koncentrace genomové DNA na hodnotách C_T . C_T je hodnota cyklu, kdy došlo k přeskočení fluorescence nad práh pozadí. Pomocí hodnoty sklonu standardní křivky lze vypočítat efektivitu dle následujícího vzorce:

$$E = \left(10^{\frac{1}{\text{slope}}} - 1 \right) \times 100$$

Na PCR destičku byly do jednotlivých jamek nanášeny vzorky tak, že vždy do jedné jamky bylo pipetováno 10,5 μl vzorku; 2 μl roztoku primerů (80 μl Sigma vody, 10 μl Forward primeru a 10 μl Reverse primeru) a 12,5 μl Master mix. Destička se vzorky byla centrifugována (při 20° C, 30 sec na 400x g; centrifuga Concentrator Plus, Eppendorf) a poté vložena do přístroje (CFX 96TM Real-Time System). PCR zahrnovalo 40 cyklů (vzorek byl nejprve zahříván 30 s na 95° C, poté následně 5 s na 95° C a nakonec 20 s při 60° C) a bylo následováno měřením křivek tání.

4. Výsledky

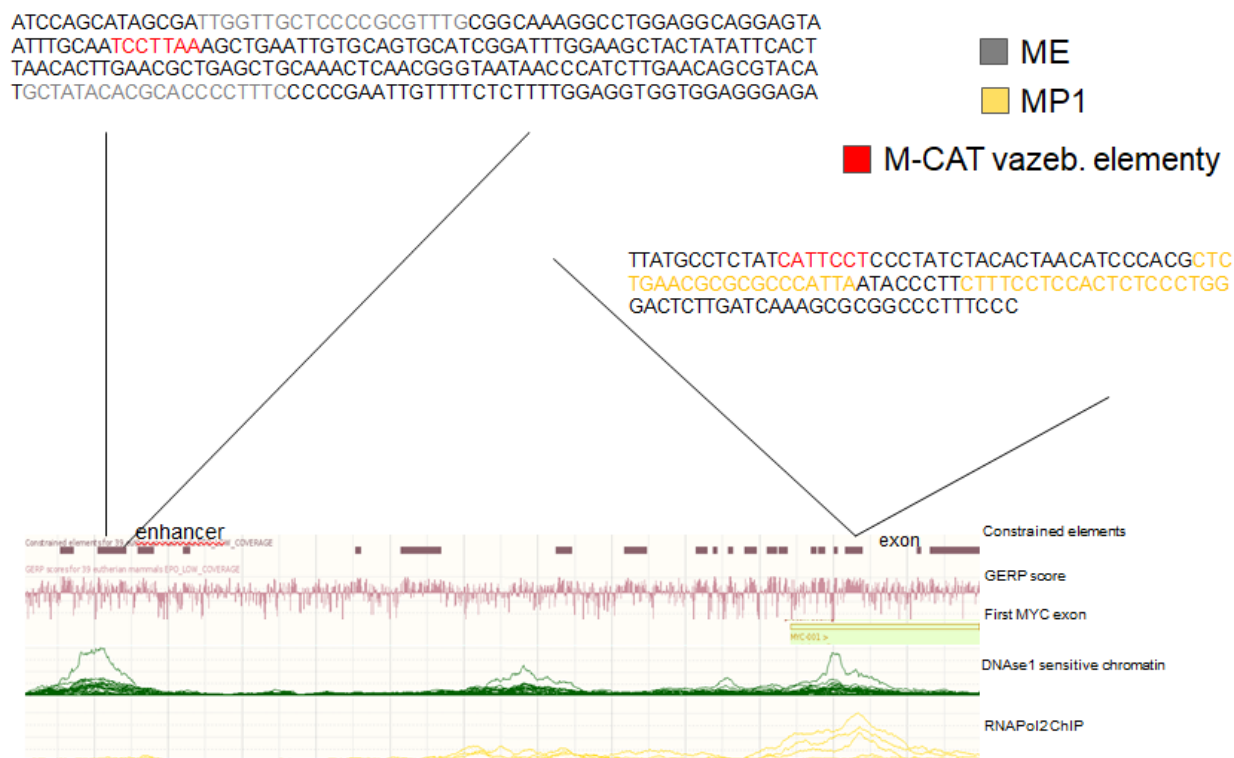
Jelikož doposud nebyla provedena ChIP-Seq analýza TEAD1 na lidských leukemických buňkách. Z tohoto důvodu a z důvodu výskytu aktivního chromatinu v místech M-CAT vazebných elementů jsme se rozhodli provést ChIP analýzu cílových genů (*C-MYC* a *GLUT1*) TEAD1. ChIP analýza byla provedena na buňkách linie Jurkat. Jedná se o buňky akutní lymfoblastické leukémie T-buněčné populace. Cílové geny TEAD1 *C-MYC* a *GLUT1* patří mezi dva klíčové regulátory glykolýzy, které jsou rovněž cílem Hippo signální dráhy v lidských leukemických buňkách [10].

4.2. Navržení primerů pro PCR a jejich efektivita

Primery pro geny *C-MYC* a *GLUT1*, jejichž exprese je regulována transkripčním faktorem TEAD1 byly navrženy pomocí databáze Ensembl a analyzovány na přítomnost sekundárních struktur pomocí programu GeneRunner.

4.1.1. Navržení a pozice primerů pro gen *C-MYC*

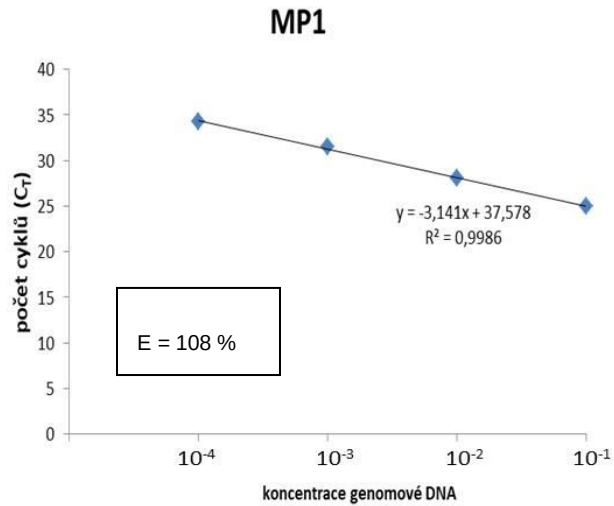
Pro gen *C-MYC* byly navrženy dva primery, jeden pro enhancer a jeden pro exon genu. Sekvence navržených primerů jsou znázorněny na obr. 20 na straně 57.



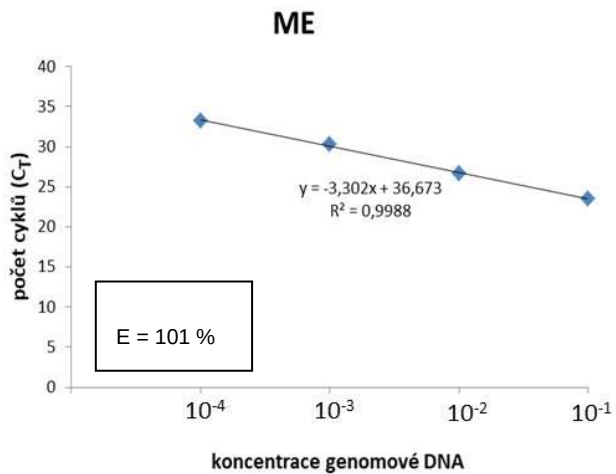
Obrázek 20: Sekvence navržených primerů pro gen *C-MYC*. Primer ME je navržen pro enhancer genu a primer MP1 pro exon genu *C-MYC*. V obrázku jsou červeně vyznačeny nejbližší M-CAT vazebné sekvence. Převzato a upraveno z [10].

4.1.2. Efektivita primerů pro gen *C-MYC*

Efektivita primerů byla spočítaná dle vzorce v odstavci 3.2.10. na straně 55 ze standardní křivky získané vynesemím závislosti koncentrace použité genomové DNA na hodnotách C_T cyklů. Standardní křivky a efektivity pro jednotlivé primery genu *C-MYC* jsou znázorněny na obr. 21 a 22 na straně 58.

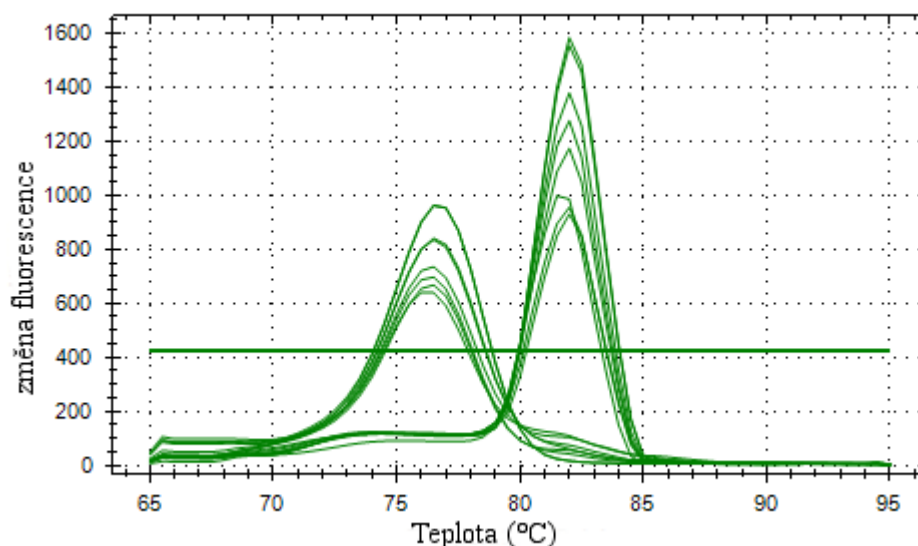


Obrázek 21: Graf závislosti koncentrace genomové DNA na počet cyklů C_T s vyjádřenou standardní křivkou pro primer MP1 z exonu genu *C-MYC*. V rámečku je uvedena efektivita pro daný primer.



Obrázek 22: Graf závislosti koncentrace genomové DNA na počet cyklů C_T s vyjádřenou standardní křivkou pro primer ME z enhanceru genu *C-MYC*. V rámečku je uvedena efektivita pro daný primer.

Ke zjištění skutečnosti, zda v průběhu PCR reakce nevznikají nespecifické produkty, byly využity křivky tání. Křivky tání se získají ze závislosti změny fluorescence na teplotě. Křivky tání pro navržené primery genu *C-MYC* jsou znázorněny na obr. 23.

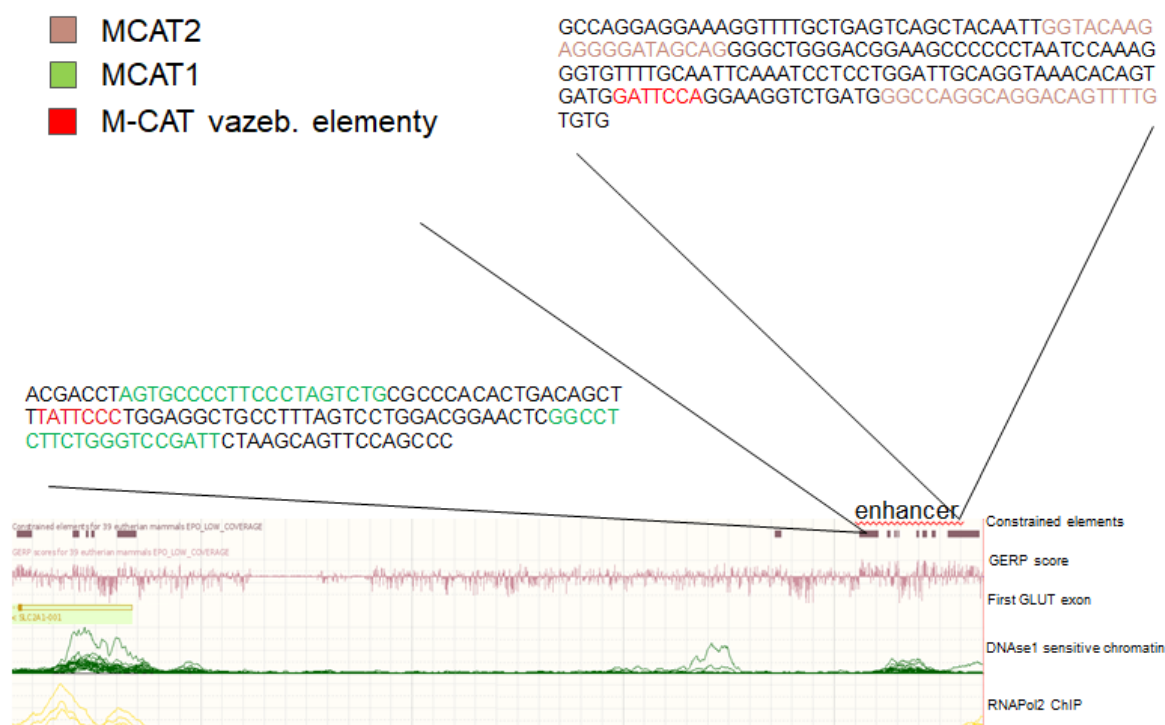


Obrázek 23: Křivky tání pro navržené primery genu *C-MYC*.

Z obr. 23 je vidět, že křivky tání pro oba navržené primery mají pouze jeden vrchol. To potvrzuje, že reakce byla čistě specifická.

4.1.3. Navržení a pozice primerů pro gen *GLUT1*

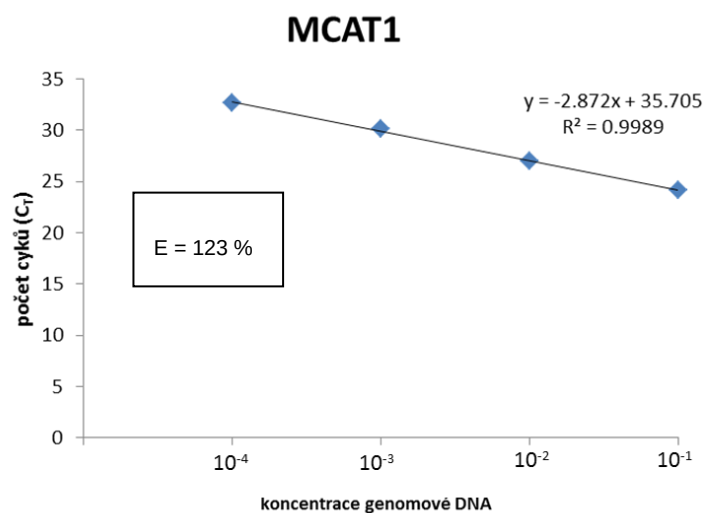
Pro gen *GLUT1* byly navrženy pomocí databáze Ensembl dva primery, oba byly z enhanceru genu. Sekvence jednotlivých primerů a jejich pozice jsou znázorněny na obr. 24 na straně 60.



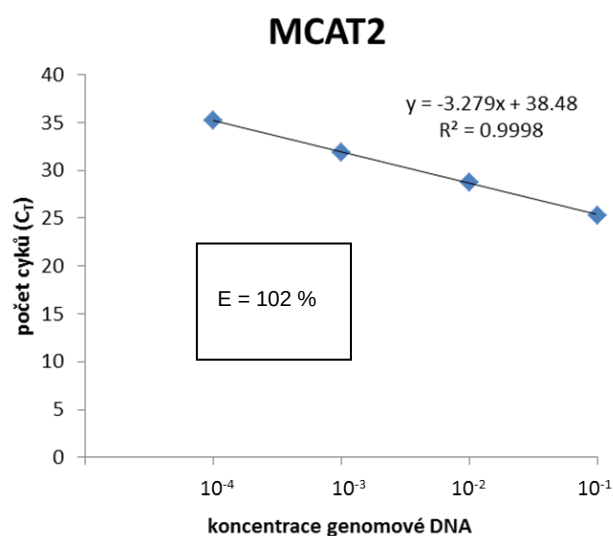
Obrázek 24: Sekvence navržených primerů pro gen *GLUT1*. Primery MCAT1 i MCAT2 jsou navrženy pro enhancer genu *GLUT1*. V obrázku jsou červeně vyznačeny nejbližší M-CAT vazebné sekvence. Převzato a upraveno z [10].

4.1.4. Efektivita primerů pro gen *GLUT1*

Efektivita pro primery MCAT1, MCAT2 byla spočítaná dle vzorce v odstavci 3.2.10. na straně 55. Efektivita byla spočítána ze směrnice standardní křivky získané vynesemím závislosti koncentrace použité genomové DNA na hodnotách C_T cyklů. Standardní křivky a efektivity pro jednotlivé primery genu *GLUT1* jsou znázorněny na obr. 25 a 26 na straně 61.

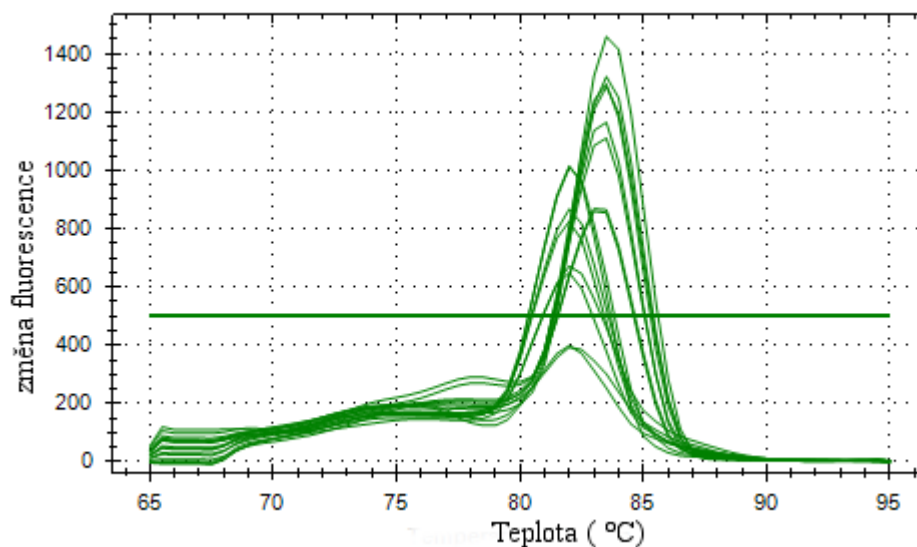


Obrázek 25: Graf závislosti koncentrace genomové DNA na počet cyklů C_T s vyjádřenou standardní křivkou pro primer MCAT1 z enhanceru genu *GLUT1*. V rámečku je uvedena efektivita pro daný primer.



Obrázek 26: Graf závislosti koncentrace genomové DNA na počet cyklů C_T s vyjádřenou standardní křivkou pro primer MCAT2 z enhanceru genu *GLUT1*. V rámečku je uvedena efektivita pro daný primer.

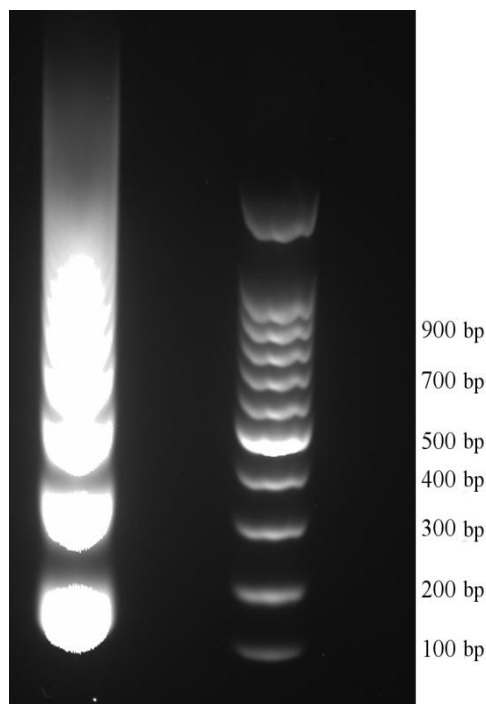
Fakt, že i v případě primerů z genu GLUT1 běžela PCR specificky, je pomocí křivek tání dokázán na obr. 27. Všechny křivky tání mají i v tomto případě pouze jeden vrchol.



Obrázek 27: Křivky tání pro navržené primery genu C-MYC.

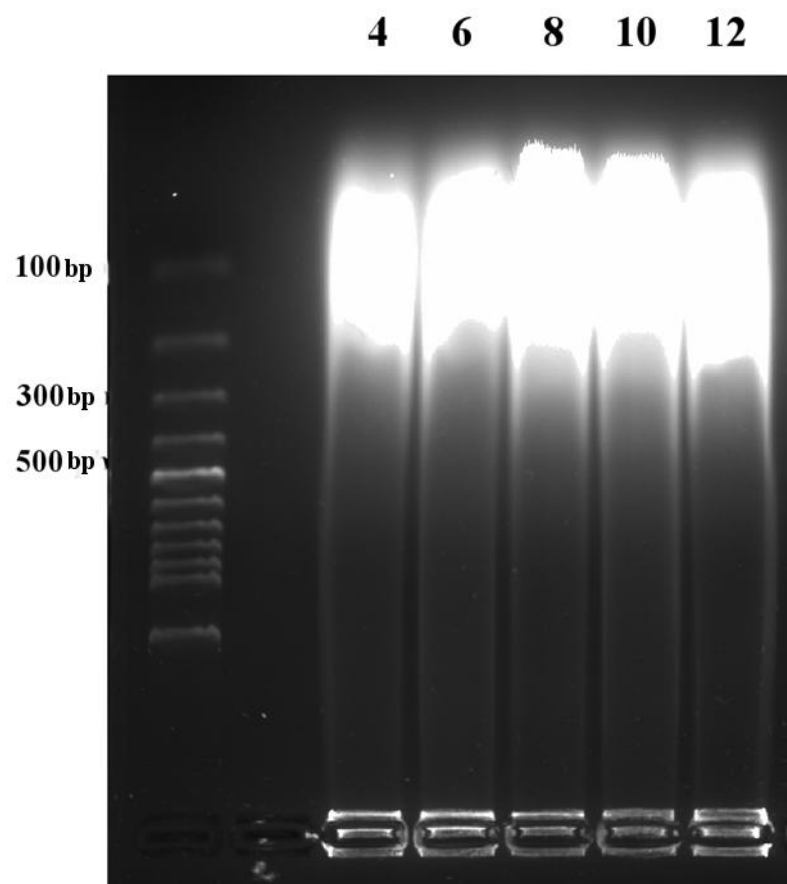
4.3. Izolace chromatinu a enzymatické štěpení

Chromatin byl izolován z buněčné linie Jurkat za využití kitu CHIP-IT[®] Express Enzymatic od firmy Active Motif. Ke štěpení chromatinu byl nejprve využit Enzymatic Shearing Coctail z kitu. Chromatin byl štěpen po dobu 12 minut. Míra štěpení chromatinu je znázorněna na obr. 28 na straně 63.



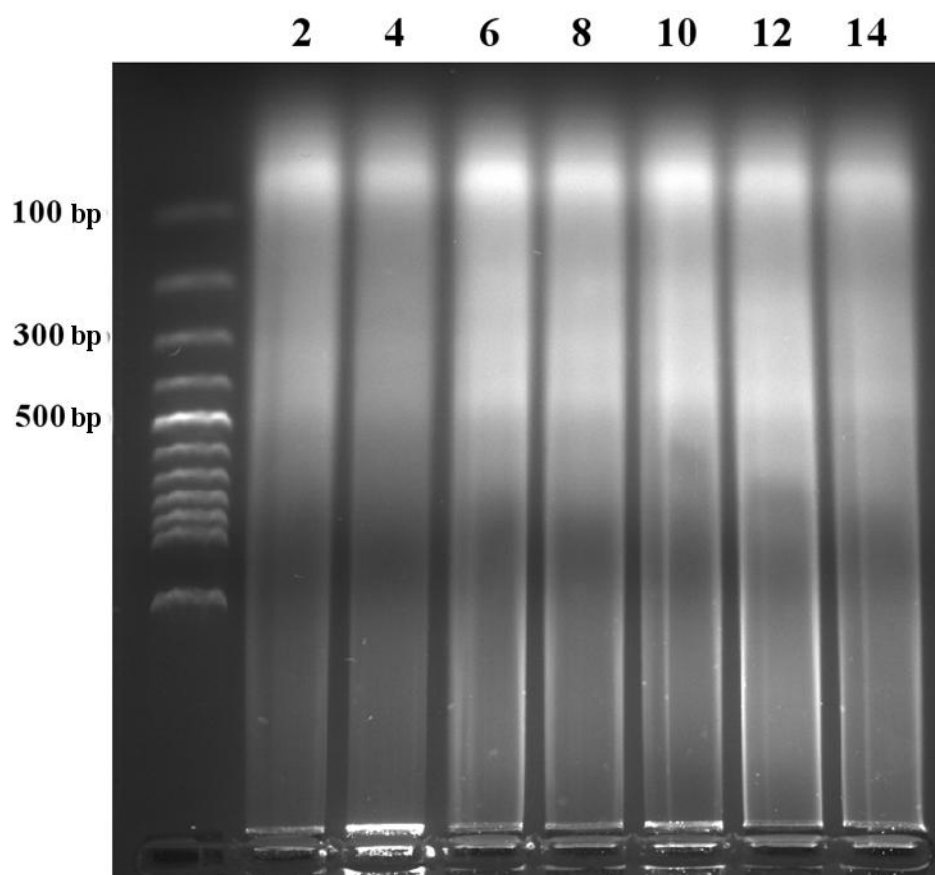
Obrázek 28: Míra rozštěpení chromatinu po 12 minutovém enzymatickém štěpení. V levé části je získaný chromatin z buněčné linie Jurkat a napravo je standard DNA Ladder 100 bp.

Z obr. 28 je vidět, že většina rozštěpeného chromatinu se pohybuje v rozmezí mezi 100-500 bp, ale ve vzorku byla přítomna i část nerozštěpeného chromatinu. Protože se mi dlouhou dobu nepodařilo úspěšně izolovat chromatin, nejprve jsme předpokládali, že je problém v enzymu. Z tohoto důvodu jsme objednali enzym Micrococcal Nuclease (*New England Biolabs*). Nejprve byl optimalizován čas štěpení chromatinu pro enzym Micrococcal Nuclease. Pro štěpení byly použity časy: 4, 6, 8, 10, 12 minut. Výsledek optimalizace štěpení enzymem Micrococcal Nuclease je znázorněn na obr. 29 na straně 64.



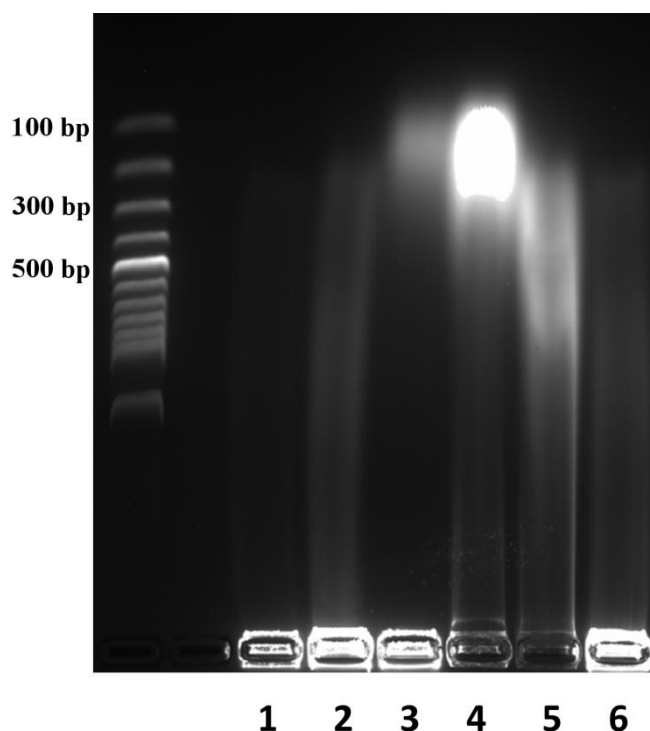
Obrázek 29: Míra rozštěpení chromatinu po 4, 6, 8, 10 a 12 minutovém enzymatickém štěpení. V levé části je standard DNA Ladder 100 bp a napravo chromatin štěpený enzymem Micrococcal Nuclease.

Ačkoli množství enzymu použité pro štěpení chromatinu bylo stejné v obou případech (obr. 26, obr. 27), tak na obr. 27 došlo k přestěpení chromatinu již po 4 minutách. Většina chromatinu se nachází mezi 100 – 200 bp. Z tohoto důvodu byl enzym Micrococcal Nuclease naředěn 10x oproti koncentraci použité v případě obr. 26, 27. Naředěným enzymem byla provedena optimalizace štěpení chromatinu s časy 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 minut. Výsledek je znázorněn na obr. 30 na straně 65.



Obrázek 30: Míra rozštěpení chromatinu po 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 minutovém enzymatickém štěpení. V levé části je standard DNA Ladder 100 bp a napravo štěpený chromatin 10x naředěným enzymem Micrococcal Nuclease. U všech časů je zjevné, že chromatin je nadále přestěpený, ale ne v tak vysoké míře jako v případě na obr. 17. Většina chromatinu se pohybuje v rozmezí 300 – 200 bp.

Z obrázku je patrné, že i při použití 10x menší koncentrace enzymu pro štěpení, chromatin je stále nadměrně rozštěpený. Z tohoto důvodu začaly být testovány jednotlivé stěžejní komponenty kitu CHIP-IT[®] Express Enzymatic od firmy Active Motif pro izolaci a štěpení chromatinu. Mezi testovanými komponenty byla zahrnuta RNázaA, Proteináza K a Reverse Cross-link pufr. Testování bylo provedeno pro jednotlivé kroky izolace chromatinu, které jsou uvedeny v odstavci 3.2.3. na straně 46. K testování byl využit chromatin štěpený 8 minut enzymem Micrococcal Nuclease. Výsledky testování jsou zobrazeny na obr. 31 na straně 66.



Obrázek 31: Testování komponent kitu pro izolaci a štěpení chromatinu od firmy Active Motif.

1: vzorek chromatinu s Reverse Cross-link puforem 1:1

2: vzorek chromatinu s Reverse Cross-link puforem 1:1 povařen 15 minut při 95°C

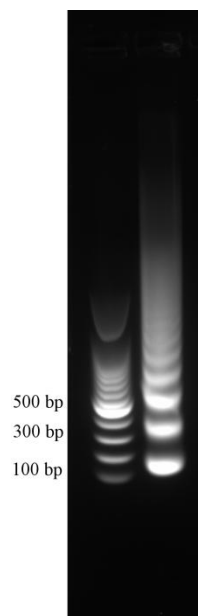
3: vzorek chromatinu s Reverse Cross-link puforem 1:1 povařen 15 minut při 95°C a poté přidán 1 µl RNázyA a inkubováno 15 minut při 37°C

4: vzorek chromatinu s Reverse Cross-link puforem 1:1 povařen 15 minut při 95°C následně přidán 1 µl RNázyA a inkubováno 15 minut při 37°C poté přidány 2 µl Proteinázy K a inkubace 60 min 37°C

5: vzorek chromatinu s Reverse Cross-link puforem 1:1 povařen 15 minut při 95°C následně přidány 2 µl Proteinázy K a inkubace 60 min 37°C

6: vzorek chromatinu s Reverse Cross-link puforem 1:1 povařen 15 minut při 95°C a následná inkubace 60 min při 37°C

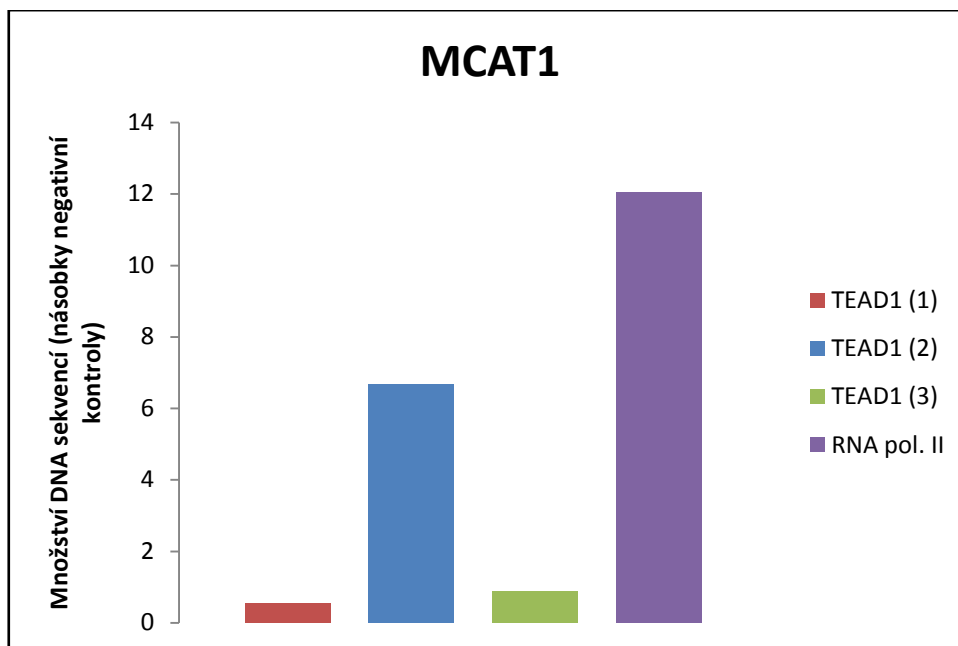
Z obr. 31 je pravděpodobné, že přeštěpení chromatinu, které je znázorněné na obr. 29 a 30 je zřejmě způsobené RNázou A a/nebo Proteinázou K. Pravděpodobně byly RNáza A a Proteináza K kontaminovány DNázovou aktivitu. Po objednání nové Proteinázy K a RNázy A vedlo k získání chromatinu, který byl z velké většiny rozštěpen enzymem Micrococcal Nuclease na úseky o velikosti v rozmezí 200-500 bp. Izolovaný chromatin je znázorněn na obr. 32 na straně 67.



Obrázek 32: Míra rozštěpení chromatinu po 8 minutovém štěpení enzymem Micrococcal Nuclease. V levé části je standard DNA Ladder 100 bp a napravo je získaný chromatin z buněčné linie Jurkat.

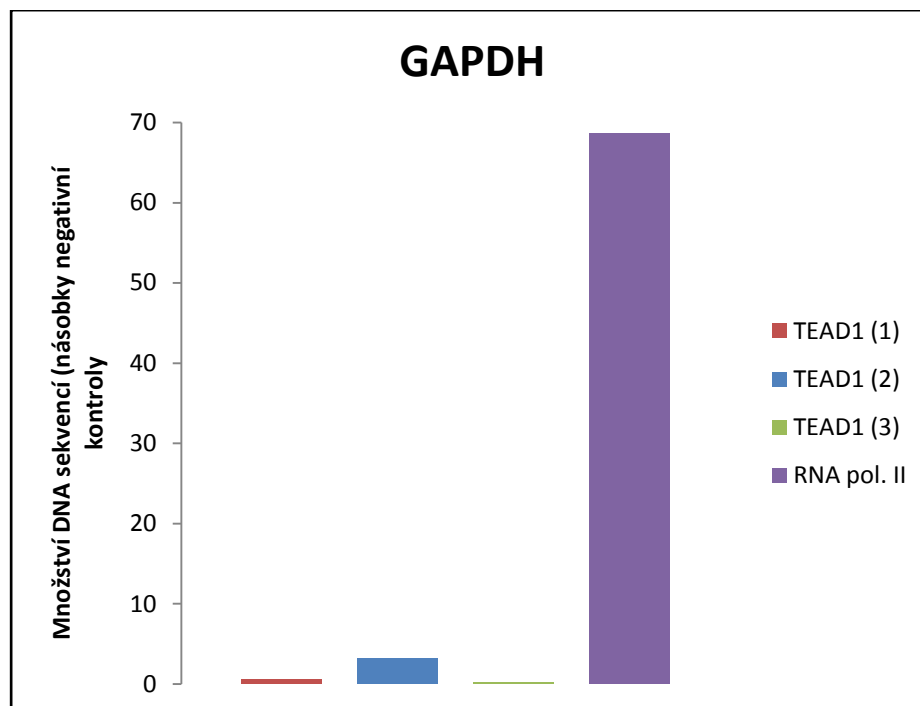
4.4. Imunoprecipitace pomocí G-proteinu

Imunoprecipitace pomocí G-proteinu byla využita nejen na zjištění efektivity primárních protilátek TEAD1 pro imunoprecipitaci, ale také pro imunoprecipitaci samotnou. Použité protilátky pro imunoprecipitaci pomocí proteinu-G byly následující: TEAD1 Rabbit Ab Cell Signalling-TEAD1 (1); TEF-1 Ab GeneTex-TEAD1 (2); TEAD1 Ab Sigma Aldrich-TEAD1 (3), RNA polymeráza II + Bridging Ab for Mouse IgG a negativní kontrola IgG. Vzorky získané imunoprecipitací byly vyhodnoceny pomocí metody PCR. Výsledek imunoprecipitace vyhodnocený metodou PCR pro primer MCAT1 z genu *GLUT1* je znázorněn na obr. 33 na straně 68.



Obrázek 33: Výsledek PCR po imunoprecipitaci pomocí proteinu G. Protilátka je použita proti transkripčnímu faktoru TEAD1 od tří různých výrobců. (1) - Cell Signalling, (2) – GeneTex, (3)- Sigma Aldrich. Jako pozitivní kontrola je použit vzorek po imunoprecipitaci protilátkou RNA polymeráza II.

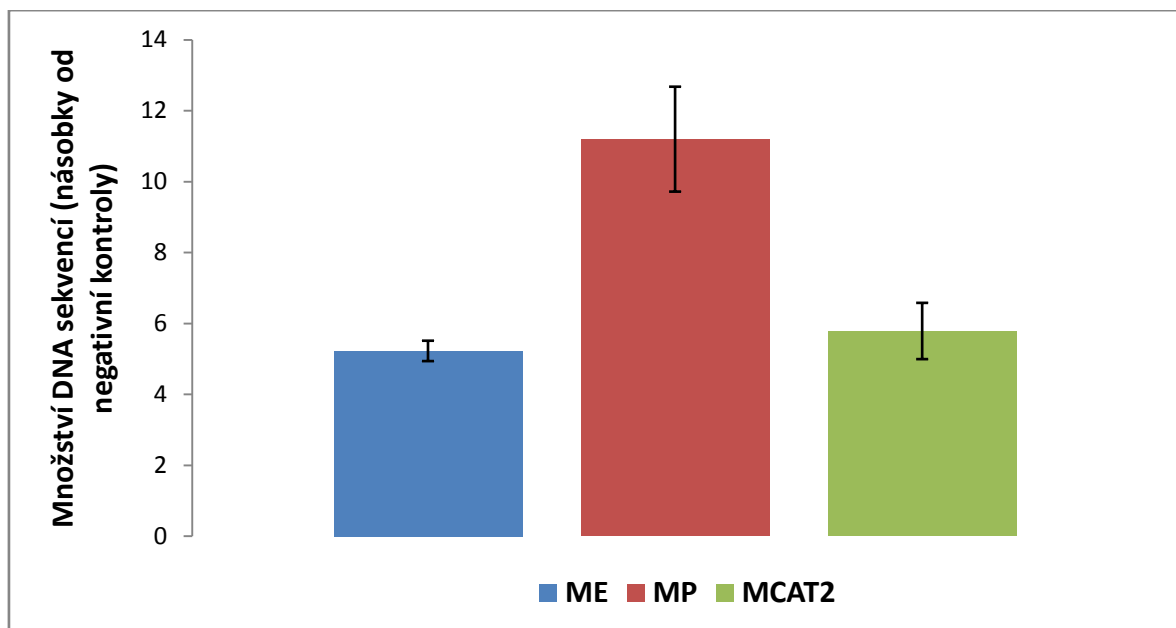
Z výsledků na obr. 33 je zřejmé, že nejúčinnější protilátkou pro imunoprecipitaci je protilátka proti TEAD1 od firmy GeneTex. Jako kontrolu jsme použili primer z genu GAPDH. Jedná se o gen, který je neustále přepisovaný. Výsledek pro primer GAPDH je znázorněn na obr. 34 na straně 69.



Obrázek 34: Výsledek PCR po imunoprecipitaci protilátkou TEAD1 pomocí proteinu G. Protilátka je od tří různých výrobců. (1) - Cell Signalling, (2) – GeneTex, (3)- Sigma Aldrich.

Z obr. 34 vyplývá, že PCR probíhalo, což detekujeme na vzorku, kdy jsme použili k imunoprecipitaci protilátku proti RNA polymeráze II. Vzorek RNA polymerázy v obou případech potvrzuje, že se jedná o aktivní místo v genomu. Dále je z obr. 34 patrné, že v promotoru genu GAPDH není přítomen TEAD1.

Vzorek získaný imunoprecipitací protilátkou TEAD1 od firmy GeneTex byl vyhodnocen pomocí PCR pro primery z genu *C-MYC* (ME, MP1) a *GLUT1* (MCAT2). Výsledek PCR je zobrazen na obr. 35 na straně 70.



Obrázek 35: Výsledek PCR po imunoprecipitaci protilátkou TEAD1 od firmy GeneTex pomocí proteinu G. PCR bylo provedeno s primery pro gen *C-MYC* (ME, MP1) a *GLUT1* (MCAT2). V grafu jsou pro jednotlivé primery znázorněny chybové úsečky.

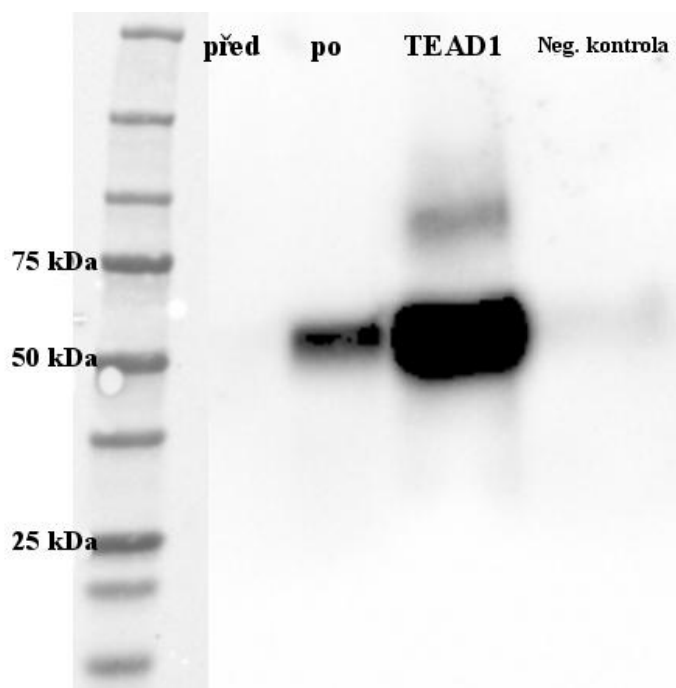
Z obr. 35 je vidět, že TEAD1 se s vyšší afinitou váže na M-CAT vazebné elementy v promotorové oblasti genu *C-MYC*. Dále se TEAD1 váže s podobnou afinitou na M-CAT elementy přítomné v enhanceru genu *C-MYC* a v enhanceru genu *GLUT1*.

4.5. Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads

Nejúčinnější protilátka – TEAD1 od firmy GeneTex vybraná metodou imunoprecipitace pomocí proteinu-G byla navázána na kuličky Dynabeads a využita pro imunoprecipitaci.

4.5.1. Western Blot

Proteiny obsažené ve vzorcích získané imunoprecipitací byly nejprve rozděleny SDS elektroforézou a přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Pro imunodetekci byly detekovány chemiluminiscenčním způsobem. Detekce nitrocelulosové membrány CCD kamerou je zobrazena na obr. 36 na straně 71.



Obrázek 36: Detekce proteinů po imunoprecipitaci protilátkami TEAD1 a Negativní kontrolou. Vzorek „před“ znázorňuje množství chromatinu použitého k imunoprecipitaci, vzorek „po“ je odebrán po navázání proteinu TEAD1 s DNA na protilátku a zbylé dva vzorky jsou získané imunoprecipitací protilátkou TEAD1 a králíčí negativní kontrolou.

Na obr. 36 je vidět vysoké množství imunoprecipitací získaného TEAD1 o velikosti 48 kDa. Dále pozoruje komplex o velikosti 90 kDa. Jedná se o komplex TEAD1 pravděpodobně s DNA či jiným proteinem. Ve vzorku „po“ je patrná detekce proteinu o stejné velikosti jako TEAD1. Je možné, že imunoprecipitace nemá 100% výtěžek nebo došlo k uvolnění těžkého řetězce protilátky IgG z kuliček. Těžký řetězec IgG má téměř stejnou velikost (50 kDa) jako transkripční faktor TEAD1 (48 kDa).

Vzorky získané imunoprecipitací pomocí kuliček Dynabeads budou v nejbližší době využity pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.

5. Diskuse

V rámci této diplomové práce byla pomocí ChIP analýzy experimentálně potvrzena přítomnost TEAD1 jak v genu *C-MYC* tak v genu *GLUT1*. TEAD transkripční faktory se uplatňují při regulaci exprese proteinů, které v organismu ovlivňují růst a proliferaci buněk a zabraňují apoptóze [4]. Rodina transkripčních faktorů TEAD a jejich aktivita je regulována Hippo signální dráhou, vazbou s koaktivátory a post-translačními modifikacemi [15,40]. Jejich funkce je přísně regulovaná a nepostradatelná pro správný vývoj tkání a orgánů. Mutace a deregulace v Hippo signální dráze vedou k velkému výskytu nádorových onemocnění [18]. Z výše uvedených důvodů jsou TEAD proteiny zajímavým cílem pro vývoj protinádorových léčiv. Ke snížení efektivity TEAD proteinů může dojít inhibicí vazby s jejich koaktivátory. Mezi látky, které brání vazbě TEAD na koaktivátor YAP, patří verteporfin [112]. Dalším možným způsobem, jak inhibovat růst nádorů, by mohla být inhibice vazby TEAD transkripčních faktorů na DNA. K vývoji takového léčiva je nejprve nutné znát, jak přesně se TEAD prostřednictvím TEA domény váže na DNA. Ačkoli byly vyřešeny různé struktury pro TEA domény, povaha interakce nebyla doposud zcela objasněna [35,36]. Tyto látky by buď mohly obsahovat TEA vazebnou doménu a soupeřily by s TEAD transkripčními faktory o vazbu na M-CAT vazebné elementy nebo by se přímo vázaly na TEAD, čímž by se inhiboval vznik komplexu TEAD s DNA.

Transkripční faktor C-MYC kódovaný genem, jehož exprese je řízena Hippo signální dráhou a transkripčním faktorem TEAD, reguluje mimo jiné metabolismus glukózy v nádorových buňkách [10]. Dalším potencionálním cílem nádorové léčby by mohla být právě regulace proteinů, které jsou kódovány geny pro *C-MYC* a *GLUT1*. Transkripční faktor C-MYC a glukózový transportér GLUT1 jsou stěžejní pro zvýšený příjem glukózy nádorovou buňkou z extracelulárního prostředí [10,67]. Nádorové buňky využívají anaerobní glykolýzu k zisku ATP a její meziprodukty k biosyntéze v anabolických drahách, čímž podporují vlastní proliferaci [67,113]. Na druhou stranu C-MYC i GLUT1 jsou po aktivaci T-buněk stěžejní pro jejich metabolické přeprogramování. Metabolické přeprogramování aktivovaných T-buňkám umožňuje diferenciaci, proliferaci a vykonávání jejich efektorových funkcí [57,58,68].

V této diplomové práci byla nejprve izolována genomová DNA, která byla použita pro stanovení efektivity navržených primerů pro geny *C-MYC* a *GLUT1*. Tyto dva geny byly vybrány z toho důvodu, jelikož v nich byly nalezeny konzervované M-CAT vazebné motivy v místě aktivního chromatinu [10]. Spočítané efektivity pro jednotlivé primery z genu *C-MYC* jsou zobrazeny na obr. 21 a 22 na straně 58 a z genu *GLUT1* na obr. 25 a 26 na straně 61. Z uvedených obr. vyplývá, že většina hodnot efektivit primerů se pohybuje lehce přes 100 %. To může být způsobeno nepřesným pipetováním nebo obtížným ředěním celogenomové DNA, které bylo vyizolováno poměrně velké množství. Výjimkou je primer MCAT1 z genu *GLUT1* jehož efektivita je vyšší než 120 %. To může být způsobeno vzájemnou interakcí reverse a forward primerů, nespecifitou v amplifikovaných regionech nebo nepřesnostmi během pipetování.

Dále byl izolován chromatin z buněčné linie Jurkat. K izolaci chromatinu byl použit Kit CHIP-IT[®] Express Enzymatic od firmy Active Motif. První chromatin, který byl izolací získán, je zobrazen na obr. 28 na straně 63. Chromatin byl štěpen po dobu 12 minut enzymem, který byl součástí kitu. Jelikož kit pro izolaci chromatinu byl používán již předtím, nebylo dostatek všech reagentů a bylo potřeba objednat kit nový. Bohužel od začátku používání nového kitu se nám nepodařilo získat a enzymaticky rozštěpit chromatin, který by se následně mohl využít pro imunoprecipitaci. Nejprve jsme se domnívali, že je problém v používaném enzymu, který mohl být málo stabilní a náchylný na změnu fyzikálních podmínek. Opětovným rozmrazováním a zmrazováním mohla být narušena efektivita tohoto enzymu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli optimalizovat štěpení enzymem Micrococcal Nuclease. Ačkoli množství enzymu použitého ke štěpení bylo stejné jako na obr. 28 na straně, došlo k přeštěpení chromatinu viz obr. 29 na straně 64. Jelikož v tomto případě došlo k přeštěpení chromatinu, rozhodli jsme se enzym Micrococcal Nuclease 10x naředit. I s 10x nižším množstvím enzymu chromatin byl pořád přeštěpený viz obr. 30 na straně 65. Bylo nám divné, že by oba použité enzymy byly nefunkční. Proto jsme se rozhodli otestovat funkci jednotlivých komponentů obsažených v kitu používaného při izolaci chromatinu. Z výsledků testování jednotlivých komponentů nového kitu (obr. 31 na straně 66) je vidět, že pokud po enzymatickém štěpení do vzorku nepřidáme Proteinázu K a RNázuA, vzorky chromatinu jsou standardně přítomny v jamce. Po přidání RNázyA došlo dokonce k výraznému nárůstu chromatinu v oblasti 100 – 500 bp. To je zřejmě způsobené tím,

že RNázaA je nejspíš kontaminována nukleázami s afinitou k DNA. Po přidání Proteinázy K nejspíš nedošlo k zastavení a vyštěpení proteinů ve vzorku a samotná Proteináza K také způsobovala degradaci chromatinu. Proto si myslíme, že Proteináza K a RNázaA obsažené v kitu byly kontaminovány dalšími enzymy (nukleázami), případně byly samy nefunkční a z tohoto důvodu se nepodařilo dlouhou dobu optimální chromatin vyizolovat. Toto tvrzení podporuje i fakt, že pokud byly použity reagenty od jiných dodavatelů, podařilo se chromatin izolovat. Ten je zobrazen na obr. 32 na straně 67.

Následně byl chromatin použit pro imunoprecipitaci. Nejprve byla imunoprecipitací pomocí G-proteinu vybrána protilátka, která je nejúčinnější pro chromatinovou imunoprecipitaci transkripčního faktoru TEAD1. Tato protilátka byla poté použita pro imunoprecipitaci pomocí G-proteinu i pomocí kuliček Dynabeads. Výtěžek TEAD1 imunoprecipitací pomocí kuliček Dynabeads je znázorněn na obr. 36 na straně 71. Z výsledku WB je patrné, že imunoprecipitací se získalo poměrně velké množství transkripčního faktoru TEAD1. Toto množství však nebylo dostatečné pro detekci barvením CoomassieTM Brilliant Blue. Z výsledku blotu ve vzorku „po“ je dále vidět fragment o stejné velikosti jako TEAD1. Tento fragment může odpovídat buď proteinu TEAD1, který se veškerý nenavázal na protilátku proti TEAD1 a část ho zůstala v roztoku. Další možností je, že mohl dojít k rozpadu protilátky a detekoval se těžký řetězec IgG protilátky. Ten potom reagoval se sekundární protilátkou a byl vizualizován CCD kamerou. Dále pozorujeme fragment o velikosti 90 kDa. Proteiny vyprecipitované společně s TEAD1 budou v nejbližší době identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads má však jedno úskalí. Ačkoli se k protilátkám navázaným na kuličky Dynabeads přidává 2% azid sodný, aby životnost protilátek byla co možná nejdelší, tak záleží na době, po kterou jsou kuličky s navázanou TEAD protilátkou uchovány. Protilátka je nejúčinnější v době její navázání na kuličky. Čím delší dobu je protilátka na kuličky navázána, tím její efektivita pro imunoprecipitaci klesá. Z tohoto důvodu jsme pro imunoprecipitaci využili i protein-G. Tato imunoprecipitace má výhody v tom, že se používá malé množství protilátky oproti kuličkám Dynabeads. Nevýhody této imunoprecipitace jsou především v tom, že

k navázání proteinu na protilátku je nutná inkubace do dalšího dne. Navíc protein-G a protilátky se nedají použít opakovaně a vždy je nutná jejich opětovná příprava.

Vzorky získané imunoprecipitací pomocí G-proteinu byly vyhodnoceny metodou PCR. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 35 na straně 70. Z výsledků PCR vyplývá, že TEAD1 se váže s vyšší afinitou na M-CAT vazebné elementy přítomné v exonu genu *C-MYC*. To je pravděpodobně způsobené orientací M-CAT vazebných elementů. Ten je v enhanceru genu *C-MYC* orientovaný ve směru 5' → 3' vzhledem ke směru transkripce. Naopak nižší afinita vazby TEAD1 k M-CAT vazebným elementům přítomným v enhanceru genu *GLUT1* a enhanceru genu *C-MYC* je způsobena jejich opačnou orientací tedy 3' → 5' vzhledem ke směru transkripce. Tyto výsledky odpovídají výsledkům, které jsou součástí jiného projektu řešeného v naší laboratoři. V rámci tohoto projektu se pomocí metody fluorescenční anizotropie stanovuje K_D vazby rekombinantně připravené TEA domény a vybraných M-CAT motivů *in vitro*. Z dosavadních výsledků tohoto projektu plyne, že vazba rekombinantně připravené TEA domény k DNA má vyšší hodnotu K_D pro enhancer genu *GLUT1* a *C-MYC* a nižší pro exon genu *C-MYC*. Tyto výsledky odpovídají výsledkům na obr. 35.

Pro přípravu DNA knihovny je nutné ještě optimalizovat čištění vzorku pomocí kuliček AMPure XP. Tímto čištěním se vzorky odstraní od nečistot a zůstanou pouze fragmenty DNA o velikosti větší než 100 bp. DNA knihovna bude dále využita pro NGS.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce byla nově potvrzena vazba TEAD1 na M-CAT vazebné elementy v enhanceru a promotoru genu *C-MYC* a v enhanceru genu *GLUT1*. Afinita této vazby závisí zřejmě na orientaci M-CAT vazebného elementu.

7. Seznam použité literatury

- [1] D. Pan, The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer, *Dev. Cell.* 19 (2010) 491–505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011.
- [2] W. Wang, X. Li, J. Huang, L. Feng, K.G. Dolinta, J. Chen, Defining the protein-protein interaction network of the human hippo pathway., *Mol. Cell. Proteomics.* 13 (2014) 119–31. doi:10.1074/mcp.M113.030049.
- [3] K. Sugimachi, M. Nishio, S. Aishima, Y. Kuroda, T. Iguchi, H. Komatsu, H. Hirata, S. Sakimura, H. Eguchi, Y. Bekki, K. Takenaka, Y. Maehara, A. Suzuki, K. Mimori, Altered Expression of Hippo Signaling Pathway Molecules in Intrahepatic Cholangiocarcinoma, *Clin. Transl. Res. Oncol.* 93 (2017) 67–74. doi:10.1159/000463390.
- [4] D. Pan, Hippo signaling in organ size control, *Genes Dev.* 21 (2007) 886–897. doi:10.1101/gad.1536007.
- [5] T. Moroishi, C.G. Hansen, K.-L. Guan, The emerging roles of YAP and TAZ in cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 73–79. doi:10.1038/nrc3876.
- [6] A. Mitani, T. Nagase, K. Fukuchi, H. Aburatani, R. Makita, H. Kurihara, Transcriptional Coactivator with PDZ-binding Motif Is Essential for Normal Alveolarization in Mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (2009) 326–338. doi:10.1164/rccm.200812-1827OC.
- [7] K. Schlegelmilch, M. Mohseni, O. Kirak, J. Pruszk, J.R. Rodriguez, D. Zhou, B.T. Kreger, V. Vasioukhin, J. Avruch, T.R. Brummelkamp, F.D. Camargo, Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation., *Cell.* 144 (2011) 782–95. doi:10.1016/j.cell.2011.02.031.
- [8] B. Zhao, L. Li, K. Tumaneng, C.-Y. Wang, K.-L. Guan, A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP)., *Genes Dev.* 24 (2010) 72–85. doi:10.1101/gad.1843810.
- [9] J.-S. Mo, H.W. Park, K.-L. Guan, The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer., *EMBO Rep.* 15 (2014) 642–56. doi:10.15252/embr.201438638.

- [10] K. Vališ, P. Talacko, V. Grobárová, J. Černý, P. Novák, Shikonin regulates C-MYC and GLUT1 expression through the MST1- YAP1-TEAD1 axis, (2016). doi:10.1016/j.yexcr.2016.10.018.
- [11] J.C. Boggiano, P.J. Vanderzalm, R.G. Fehon, Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway., *Dev. Cell.* 21 (2011) 888–95. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.028.
- [12] The Sterile 20-like Kinase Tao-1 Controls Tissue Growth by Regulating the Salvador-Warts-Hippo Pathway, *Dev. Cell.* 21 (2011) 896–906. doi:10.1016/J.DEVCEL.2011.09.012.
- [13] F.-X. Yu, B. Zhao, N. Panupinthu, J.L. Jewell, I. Lian, L.H. Wang, J. Zhao, H. Yuan, K. Tumaneng, H. Li, X.-D. Fu, G.B. Mills, K.-L. Guan, Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling, *Cell.* 150 (2012) 780–791. doi:10.1016/j.cell.2012.06.037.
- [14] J.-S. Mo, F.-X. Yu, R. Gong, J.H. Brown, K.-L. Guan, Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors (PARs)., *Genes Dev.* 26 (2012) 2138–43. doi:10.1101/gad.197582.112.
- [15] F.-X. Yu, K.-L. Guan, The Hippo pathway: regulators and regulations., *Genes Dev.* 27 (2013) 355–71. doi:10.1101/gad.210773.112.
- [16] J. Yu, Y. Zheng, J. Dong, S. Klusza, W.-M. Deng, D. Pan, Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded., *Dev. Cell.* 18 (2010) 288–99. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.012.
- [17] J. Chiang, J.A. Martinez-Agosto, Effects of mTOR Inhibitors on Components of the Salvador-Warts-Hippo Pathway, *Cells.* 1 (2012) 886. doi:10.3390/CELLS1040886.
- [18] D.A. Barron, J.D. Kagey, The role of the Hippo pathway in human disease and tumorigenesis., *Clin. Transl. Med.* 3 (2014) 25. doi:10.1186/2001-1326-3-25.
- [19] M.Z. Xu, T.-J. Yao, N.P.Y. Lee, I.O.L. Ng, Y.-T. Chan, L. Zender, S.W. Lowe, R.T.P. Poon, J.M. Luk, Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma, *Cancer.* 115 (2009) 4576–4585. doi:10.1002/cncr.24495.

- [20] L. Zender, M.S. Spector, W. Xue, P. Flemming, C. Cordon-Cardo, J. Silke, S.-T. Fan, J.M. Luk, M. Wigler, G.J. Hannon, D. Mu, R. Lucito, S. Powers, S.W. Lowe, Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach., *Cell*. 125 (2006) 1253–67. doi:10.1016/j.cell.2006.05.030.
- [21] P.-C. Hsu, B. You, Y.-L. Yang, W.-Q. Zhang, Y.-C. Wang, Z. Xu, Y. Dai, S. Liu, C.-T. Yang, H. Li, B. Hu, D.M. Jablons, L. You, YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells., *Oncotarget*. 7 (2016) 51922–51933. doi:10.18632/oncotarget.10458.
- [22] M. Bartucci, R. Dattilo, C. Moriconi, A. Pagliuca, M. Mottolese, G. Federici, A. Di Benedetto, M. Todaro, G. Stassi, F. Sperati, M.I. Amabile, E. Pillozzi, M. Patrizii, M. Biffoni, M. Maugeri-Saccà, S. Piccolo, R. De Maria, TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells, *Oncogene*. 34 (2015) 681–690. doi:10.1038/onc.2014.5.
- [23] L. Wang, S. Shi, Z. Guo, X. Zhang, S. Han, A. Yang, W. Wen, Q. Zhu, Overexpression of YAP and TAZ is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer and related to the proliferation and metastasis of colon cancer cells., *PLoS One*. 8 (2013) e65539. doi:10.1371/journal.pone.0065539.
- [24] B.Z. Stanger, Quit your YAPing: a new target for cancer therapy., *Genes Dev*. 26 (2012) 1263–7. doi:10.1101/gad.196501.112.
- [25] J.H. Xiao, I. Davidson, D. Ferrandon, R. Rosales, M. Vigneron, M. Macchi, F. Ruffenach, P. Chambon, One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind in vitro to overlapping motifs in the domain Bi of the SV40 enhancer, *EMBO J*. 6 (1987) 3005–3013.
- [26] T. Ishiji, M.J. Lace, S. Parkkinen, R.D. Anderson, T.H. Haugen, T.P. Cripe, J.H. Xiao, I. Davidson, P. Chambon, L.P. Turek, Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells., *EMBO J*. 11 (1992) 2271–81.
- [27] A. Andrianopoulos, W.E. Timberlake, ATTS, a new and conserved DNA binding domain., *Plant Cell*. 3 (1991) 747–8. doi:10.1105/tpc.3.8.747.

- [28] P. Jacquemin, J.-J. Hwang, J.A. Martial, P. Dollé, I. Davidson, A Novel Family of Developmentally Regulated Mammalian Transcription Factors Containing the TEA/ATTS DNA Binding Domain, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 21775–21785. doi:10.1074/jbc.271.36.21775.
- [29] A. V. Pobbati, W. Hong, Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers, *Cancer Biol. Ther.* 14 (2013) 390–398. doi:10.4161/cbt.23788.
- [30] K.J. Kaneko, E.B. Cullinan, K.E. Latham, M.L. DePamphilis, Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse., *Development.* 124 (1997) 1963–73.
- [31] K.J. Kaneko, M.L. DePamphilis, Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors, *Dev. Genet.* 22 (1998) 43–55. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:1<43::AID-DVG5>3.0.CO;2-7.
- [32] C. Lopez-Anido, Y. Poitelon, C. Gopinath, J.J. Moran, K.H. Ma, W.D. Law, A. Antonellis, M.L. Feltri, J. Svaren, Tead1 regulates the expression of *Peripheral Myelin Protein 22* during Schwann cell development, *Hum. Mol. Genet.* 25 (2016) ddw158. doi:10.1093/hmg/ddw158.
- [33] K.J. Kaneko, M.J. Kohn, C. Liu, M.L. DePamphilis, Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure., *Genesis.* 45 (2007) 577–87. doi:10.1002/dvg.20330.
- [34] P. Jacquemin, J.J. Hwang, J.A. Martial, P. Dollé, I. Davidson, A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 21775–85.
- [35] A. Anbanandam, D.C. Albarado, C.T. Nguyen, G. Halder, X. Gao, S. Veeraraghavan, Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 17225–30. doi:10.1073/pnas.0607171103.
- [36] Z. Shi, F. He, M. Chen, L. Hua, W. Wang, S. Jiao, Z. Zhou, DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4, *Oncogene.* 36 (2017) 4362–4369. doi:10.1038/onc.2017.24.
- [37] S. Joshi, G. Davidson, S. Le Gras, S. Watanabe, T. Braun, G. Mengus, I. Davidson, TEAD transcription factors are required for normal primary myoblast differentiation in vitro and muscle regeneration in vivo, *PLOS Genet.* 13 (2017) e1006600. doi:10.1371/journal.pgen.1006600.

- [38] I.K. Farrance, J.H. Mar, C.P. Ordahl, M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 17234–40.
- [39] T. Yoshida, MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 8–17. doi:10.1161/ATVBAHA.107.155788.
- [40] K.C. Lin, H.W. Park, K.-L. Guan, Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD, *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017) 862–872. doi:10.1016/j.tibs.2017.09.003.
- [41] M.P. Gupta, P. Kogut, M. Gupta, Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 3168–77.
- [42] S.W. Jiang, M. Dong, M.A. Trujillo, L.J. Miller, N.L. Eberhardt, DNA binding of TEA/ATTS domain factors is regulated by protein kinase C phosphorylation in human choriocarcinoma cells., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23464–70. doi:10.1074/jbc.M010934200.
- [43] C.L. Noland, S. Gierke, P.D. Schnier, J. Murray, W.N. Sandoval, M. Sagolla, A. Dey, R.N. Hannoush, W.J. Fairbrother, C.N. Cunningham, Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling., *Structure.* 24 (2016) 179–186. doi:10.1016/j.str.2015.11.005.
- [44] P. Chan, X. Han, B. Zheng, M. DeRan, J. Yu, G.K. Jarugumilli, H. Deng, D. Pan, X. Luo, X. Wu, Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway, *Nat. Chem. Biol.* 12 (2016) 282–289. doi:10.1038/nchembio.2036.
- [45] H. Zhang, C.-Y. Liu, Z.-Y. Zha, B. Zhao, J. Yao, S. Zhao, Y. Xiong, Q.-Y. Lei, K.-L. Guan, TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13355–62. doi:10.1074/jbc.M900843200.
- [46] H. Zhang, H.A. Pasolli, E. Fuchs, Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 2270–5. doi:10.1073/pnas.1019603108.

- [47] Y. Zhou, T. Huang, A.S.L. Cheng, J. Yu, W. Kang, K.F. To, The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis., *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). doi:10.3390/ijms17010138.
- [48] M.Z. Xu, S.W. Chan, A.M. Liu, K.F. Wong, S.T. Fan, J. Chen, R.T. Poon, L. Zender, S.W. Lowe, W. Hong, J.M. Luk, AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma, *Oncogene*. 30 (2011) 1229–1240. doi:10.1038/onc.2010.504.
- [49] J. Dong, G. Feldmann, J. Huang, S. Wu, N. Zhang, S.A. Comerford, M.F. Gayyed, R.A. Anders, A. Maitra, D. Pan, Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals., *Cell*. 130 (2007) 1120–33. doi:10.1016/j.cell.2007.07.019.
- [50] Z. Wang, Y. Wu, H. Wang, Y. Zhang, L. Mei, X. Fang, X. Zhang, F. Zhang, H. Chen, Y. Liu, Y. Jiang, S. Sun, Y. Zheng, N. Li, L. Huang, Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) E89–E98. doi:10.1073/pnas.1319190110.
- [51] X. Cao, S.L. Pfaff, F.H. Gage, YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor., *Genes Dev.* 22 (2008) 3320–34. doi:10.1101/gad.1726608.
- [52] A. Landin Malt, A. Georges, J. Silber, A. Zider, D. Flagiello, Interaction with the Yes-associated protein (YAP) allows TEAD1 to positively regulate NAIP expression, *FEBS Lett.* 587 (2013) 3216–3223. doi:10.1016/j.febslet.2013.08.013.
- [53] O. Ma, W.-W. Cai, L. Zender, T. Dayaram, J. Shen, A.J. Herron, S.W. Lowe, T.-K. Man, C.C. Lau, L.A. Donehower, MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression., *Cancer Res.* 69 (2009) 2559–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2929.
- [54] R.C. Milewski, N.C. Chi, J. Li, C. Brown, M.M. Lu, J.A. Epstein, Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3, *Development*. 131 (2004) 829–837. doi:10.1242/dev.00975.

- [55] N. Nishioka, K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R.O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E.M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa, H. Sasaki, The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass, *Dev. Cell.* 16 (2009) 398–410. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.003.
- [56] R.C. Osthus, H. Shim, S. Kim, Q. Li, R. Reddy, M. Mukherjee, Y. Xu, D. Wonsey, L.A. Lee, C. V Dang, Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 21797–800. doi:10.1074/jbc.C000023200.
- [57] G.R. Bantug, L. Galluzzi, G. Kroemer, C. Hess, The spectrum of T cell metabolism in health and disease, *Nat. Publ. Gr.* (2017). doi:10.1038/nri.2017.99.
- [58] N.J. MacIver, R.D. Michalek, J.C. Rathmell, Metabolic regulation of T lymphocytes., *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013) 259–83. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095956.
- [59] C.B. Wilson, E. Rowell, M. Sekimata, Epigenetic control of T-helper-cell differentiation, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 91–105. doi:10.1038/nri2487.
- [60] R.D. Michalek, V.A. Gerriets, S.R. Jacobs, A.N. Macintyre, N.J. MacIver, E.F. Mason, S.A. Sullivan, A.G. Nichols, J.C. Rathmell, Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets., *J. Immunol.* 186 (2011) 3299–303. doi:10.4049/jimmunol.1003613.
- [61] T.W. Mak, M. Grusdat, G.S. Duncan, C. Dostert, Y. Nonnenmacher, M. Cox, C. Binsfeld, Z. Hao, A. Brüstle, M. Itsumi, C. Jäger, Y. Chen, O. Pinkenburg, B. Camara, M. Ollert, C. Bindslev-Jensen, V. Vasiliou, C. Gorrini, P.A. Lang, M. Lohoff, I.S. Harris, K. Hiller, D. Brenner, Glutathione Primes T Cell Metabolism for Inflammation., *Immunity.* 46 (2017) 675–689. doi:10.1016/j.immuni.2017.03.019.
- [62] C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak, Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 931–947. doi:10.1038/nrd4002.
- [63] H. Chi, Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions., *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2012) 325–38. doi:10.1038/nri3198.

- [64] K. Inoki, T. Zhu, K.-L. Guan, TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival., *Cell*. 115 (2003) 577–90. doi:10.1016/S0092-8674(03)00929-2.
- [65] K.N. Pollizzi, C.H. Patel, I.-H. Sun, M.-H. Oh, A.T. Waickman, J. Wen, G.M. Delgoffe, J.D. Powell, mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8+ T cell differentiation, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 2090–2108. doi:10.1172/JCI77746.
- [66] D. Finlay, D.A. Cantrell, Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 109–117. doi:10.1038/nri2888.
- [67] C. V Dang, A. Le, P. Gao, MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities., *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 6479–83. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0889.
- [68] D.R. Wise, R.J. DeBerardinis, A. Mancuso, N. Sayed, X.-Y. Zhang, H.K. Pfeiffer, I. Nissim, E. Daikhin, M. Yudkoff, S.B. McMahon, C.B. Thompson, Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 18782–7. doi:10.1073/pnas.0810199105.
- [69] G.L. Semenza, Regulation of Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76 (2011) 347–353. doi:10.1101/sqb.2011.76.010678.
- [70] K.N. Pollizzi, J.D. Powell, Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 435–446. doi:10.1038/nri3701.
- [71] Q. Sun, X. Chen, J. Ma, H. Peng, F. Wang, X. Zha, Y. Wang, Y. Jing, H. Yang, R. Chen, L. Chang, Y. Zhang, J. Goto, H. Onda, T. Chen, M.-R. Wang, Y. Lu, H. You, D. Kwiatkowski, H. Zhang, Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 4129–4134. doi:10.1073/pnas.1014769108.
- [72] K. Düvel, J.L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A.I. Lipovsky, A.L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M.G. Vander Heiden, J.P. MacKeigan, P.M. Finan, C.B. Clish, L.O. Murphy, B.D. Manning, Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1., *Mol. Cell.* 39 (2010) 171–83. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022.

- [73] M. Laplante, D.M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth Control and Disease, *Cell*. 149 (2012) 274–293. doi:10.1016/J.CELL.2012.03.017.
- [74] D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer, *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011) 1–13. doi:10.1042/BST0390001.
- [75] S. Wang, F. Xie, F. Chu, Z. Zhang, B. Yang, T. Dai, L. Gao, L. Wang, L. Ling, J. Jia, H. van Dam, J. Jin, L. Zhang, F. Zhou, YAP antagonizes innate antiviral immunity and is targeted for lysosomal degradation through IKK ϵ -mediated phosphorylation, *Nat. Immunol.* 18 (2017) 733–743. doi:10.1038/ni.3744.
- [76] T. Kawai, S. Akira, The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition., *Int. Immunol.* 21 (2009) 317–37. doi:10.1093/intimm/dxp017.
- [77] H. Ishikawa, G.N. Barber, STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling, *Nature*. 455 (2008) 674–678. doi:10.1038/nature07317.
- [78] P. Borrow, L. Martínez-Sobrido, J.C. de la Torre, Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection., *Viruses*. 2 (2010) 2443–80. doi:10.3390/v2112443.
- [79] A.N. Theofilopoulos, R. Baccala, B. Beutler, D.H. Kono, TYPE I INTERFERONS (α/β) IN IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 307–335. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843.
- [80] Transcriptional regulation of effector and memory CD8⁺ T cell fates, *Curr. Opin. Immunol.* 25 (2013) 321–328. doi:10.1016/J.COI.2013.05.010.
- [81] J.T. Harty, V.P. Badovinac, Shaping and reshaping CD8⁺ T-cell memory, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 107–119. doi:10.1038/nri2251.
- [82] N.S. Joshi, W. Cui, A. Chandele, H.K. Lee, D.R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, S.M. Kaech, Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁺ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor., *Immunity*. 27 (2007) 281–95. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.010.

- [83] CRISPR knock out CTLA-4 enhances the anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes, *Gene*. 636 (2017) 36–41. doi:10.1016/J.GENE.2017.09.010.
- [84] J.E.D. Thaventhiran, A. Hoffmann, L. Magiera, M. de la Roche, H. Lingel, M. Brunner-Weinzierl, D.T. Fearon, Activation of the Hippo pathway by CTLA-4 regulates the expression of Blimp-1 in the CD8⁺ T cell., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E2223-9. doi:10.1073/pnas.1209115109.
- [85] Y. Zhu, S. Ju, E. Chen, S. Dai, C. Li, P. Morel, L. Liu, X. Zhang, B. Lu, T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses., *J. Immunol.* 185 (2010) 3174–83. doi:10.4049/jimmunol.1000749.
- [86] R.L. Rutishauser, G.A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I.A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, S.M. Kaeck, Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties, *Immunity*. 31 (2009) 296–308. doi:10.1016/J.IMMUNI.2009.05.014.
- [87] S.-H. Fu, L.-T. Yeh, C.-C. Chu, B.L.-J. Yen, H.-K. Sytwu, New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function., *J. Biomed. Sci.* 24 (2017) 49. doi:10.1186/s12929-017-0354-8.
- [88] M.J. McGeachy, A Hippo in the Fox(p3) house, *Nat. Immunol.* 18 (2017) 709–711. doi:10.1038/ni.3769.
- [89] J. Geng, S. Yu, H. Zhao, X. Sun, X. Li, P. Wang, X. Xiong, L. Hong, C. Xie, J. Gao, Y. Shi, J. Peng, R.L. Johnson, N. Xiao, L. Lu, J. Han, D. Zhou, L. Chen, The transcriptional coactivator TAZ regulates reciprocal differentiation of TH17 cells and Treg cells, *Nat. Immunol.* 18 (2017) 800–812. doi:10.1038/ni.3748.
- [90] M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, B. Stockinger, TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells, *Immunity*. 24 (2006) 179–189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- [91] D.R. Littman, A.Y. Rudensky, Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation., *Cell*. 140 (2010) 845–58. doi:10.1016/j.cell.2010.02.021.

- [92] L. Zhou, J.E. Lopes, M.M.W. Chong, I.I. Ivanov, R. Min, G.D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, D.R. Littman, TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function, *Nature*. 453 (2008) 236–240. doi:10.1038/nature06878.
- [93] J.-H. Hong, E.S. Hwang, M.T. McManus, A. Amsterdam, Y. Tian, R. Kalmukova, E. Mueller, T. Benjamin, B.M. Spiegelman, P.A. Sharp, N. Hopkins, M.B. Yaffe, TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation., *Science*. 309 (2005) 1074–8. doi:10.1126/science.1110955.
- [94] F. Zanconato, M. Cordenonsi, S. Piccolo, YAP/TAZ at the Roots of Cancer, *Cancer Cell*. 29 (2016) 783–803. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005.
- [95] S.Y. Lunt, M.G. Vander Heiden, Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27 (2011) 441–464. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
- [96] G. Santinon, A. Pocaterra, S. Dupont, Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways, (2016). doi:10.1016/j.tcb.2015.11.004.
- [97] Glucose sensing by ChREBP/MondoA–Mlx transcription factors, *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2012) 640–647. doi:10.1016/J.SEMCDB.2012.02.007.
- [98] W.W. Winder, D.G. Hardie, Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise., *Am. J. Physiol.* 270 (1996) E299-304.
- [99] S.K. Hindupur, A. González, M.N. Hall, The opposing actions of target of rapamycin and AMP-activated protein kinase in cell growth control., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a019141. doi:10.1101/cshperspect.a019141.
- [100] E. Enzo, G. Santinon, A. Pocaterra, M. Aragona, S. Bresolin, M. Forcato, D. Grifoni, A. Pession, F. Zanconato, G. Guzzo, S. Bicciato, S. Dupont, Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity, (n.d.). doi:10.15252/emj.

- [101] C. Dong, T. Yuan, Y. Wu, Y. Wang, T.W.M. Fan, S. Miriyala, Y. Lin, J. Yao, J. Shi, T. Kang, P. Lorkiewicz, D. St Clair, M.-C. Hung, B.M. Evers, B.P. Zhou, Loss of FBP1 by Snail-Mediated Repression Provides Metabolic Advantages in Basal-like Breast Cancer, *Cancer Cell*. 23 (2013) 316–331. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.022.
- [102] W. Feng, A. Gentles, R. V. Nair, M. Huang, Y. Lin, C.Y. Lee, S. Cai, F.A. Scheeren, A.H. Kuo, M. Diehn, Targeting Unique Metabolic Properties of Breast Tumor Initiating Cells, *Stem Cells*. 32 (2014) 1734–1745. doi:10.1002/stem.1662.
- [103] M. Cordenonsi, F. Zanconato, L. Azzolin, M. Forcato, A. Rosato, C. Frasson, M. Inui, M. Montagner, A.R. Parenti, A. Poletti, M.G. Daidone, S. Dupont, G. Basso, S. Bicciato, S. Piccolo, The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells, *Cell*. 147 (2011) 759–772. doi:10.1016/j.cell.2011.09.048.
- [104] M. Carrasco, I. Delgado, B. Soria, F. Martín, A. Rojas, GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3504–3515. doi:10.1172/JCI63240.
- [105] M.F. Offield, T.L. Jetton, P.A. Labosky, M. Ray, R.W. Stein, M.A. Magnuson, B.L. Hogan, C. V Wright, PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum., *Development*. 122 (1996) 983–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631275> (accessed February 10, 2018).
- [106] N. Gao, J. LeLay, M.Z. Vatamaniuk, S. Rieck, J.R. Friedman, K.H. Kaestner, Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development, *Genes Dev.* 22 (2008) 3435–3448. doi:10.1101/gad.1752608.
- [107] I. Cebola, S.A. Rodríguez-Seguí, C.H.-H. Cho, J. Bessa, M. Rovira, M. Luengo, M. Chhatriwala, A. Berry, J. Ponsa-Cobas, M.A. Maestro, R.E. Jennings, L. Pasquali, I. Morán, N. Castro, N.A. Hanley, J.L. Gomez-Skarmeta, L. Vallier, J. Ferrer, TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 615–626. doi:10.1038/ncb3160.
- [108] A.M. Tremblay, E. Missiaglia, G.G. Galli, S. Hettmer, R. Urcia, M. Carrara, R.N. Judson, K. Thway, G. Nadal, J.L. Selfe, G. Murray, R.A. Calogero, C. De Bari, P.S. Zammit, M. Delorenzi, A.J. Wagers, J. Shipley, H. Wackerhage, F.D. Camargo, The Hippo transducer YAP1 transforms activated satellite cells and is a potent effector of embryonal rhabdomyosarcoma formation., *Cancer Cell*. 26 (2014) 273–87. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.029.

- [109] Arrayit SuperEpoxy 1 and 2 Protein Microarray Substrate Slides - Epoxy Epoxysilane Epoxide Groups Slide E Covalent Protein Coupling, (n.d.). http://www.arrayit.com/Products/Microarray_Slides/Epoxy_Slides/epoxy_slides.html (accessed February 14, 2018).
- [110] Surface-Activated Dynabeads, (n.d.). <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/immunoprecipitation/surface-activated-dynabeads-magnetic-beads.html> (accessed February 14, 2018).
- [111] Imaging Systems for Westerns: Chemiluminescence vs. Infrared Detection, 2009 -, Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection, vol. 536, (n.d.). <http://www.springerlink.com/content/gt3658942x624vq6/fulltext.pdf> (accessed February 16, 2018).
- [112] Y. Liu-Chittenden, B. Huang, J.S. Shim, Q. Chen, S.-J. Lee, R.A. Anders, J.O. Liu, D. Pan, Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP., *Genes Dev.* 26 (2012) 1300–5. doi:10.1101/gad.192856.112.
- [113] L.M.R. Ferreira, Cancer metabolism: The Warburg effect today, *Exp. Mol. Pathol.* 89 (2010) 372–380. doi:10.1016/j.yexmp.2010.08.006.