

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biochemie



VERONIKA KÚDELOVÁ

Rekombinantní příprava DNA vazebné domény transkripčního
faktoru TEAD1 pro studium jeho interakcí s DNA

Recombinant preparation of DNA binding domain of transcription factor
TEAD1

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Růžena Lišková

Praha, 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a konzultantky Mgr. Růženy Liškové a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Veronika Kúdelová

ABSTRAKT

Proteiny TEAD patří do významné rodiny transkripčních faktorů, které se během vývoje organismu podílí na regulaci jeho růstu a diferenciaci buněk prostřednictvím aktivace exprese nejrůznějších genů. Tato rodina sdílí dvě vysoce konzervovaná místa, a to TEA DNA vazebnou doménu, po které tyto proteiny získaly název, a doménu, pomocí níž transkripční faktory váží další koaktivátory. Protože TEAD proteiny nejsou samy o sobě schopné transkripce, interagují s řadou koaktivátorů, které umožňují regulovat transkripci požadovaného genu. Poruchou regulace aktivity TEAD proteinů může docházet ke vzniku nádorových onemocnění. Proto v dnešní době hrají proteiny rodiny TEAD nemalou roli při vývoji nových protinádorových léčiv.

Jedním ze způsobů inhibice těchto proteinů je zabránění jejich vazbě na DNA, tedy blokáce aktivního místa v DNA vazebné doméně. Tato bakalářská práce se zabývá rekombinantní expresí zmíněné DNA vazebné domény transkripčního faktoru TEAD1, která je prodloužená o aminokyseliny v nestrukturované oblasti. Po nalezení vhodných podmínek produkce bylo přistoupeno k produkci ve velkém objemu následované purifikací a ověřením identity proteinu. Nakonec byla potvrzena schopnost interakce produkovaného proteinu s DNA. Připravený protein bude tedy možné využít ke studiu způsobů jeho interakce s DNA, což do budoucna může napomoci k nalezení látek blokujičích aktivitu transkripčního faktoru TEAD1.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rekombinantní exprese, purifikace proteinu, DNA vazebný protein, regulace transkripce, buněčná signalizace, TEAD1, transkripční faktor, DNA vazebná doména

ABSTRACT

TEAD proteins belong to a significant family of transcription factors that contribute to the regulation of organism growth and cell differentiation during its development by activating the expression of a wide variety of genes. This family shares two highly conserved sites, the TEA DNA binding domain, after which the proteins have been named, and the domain by which transcription factors bind other coactivators. Because TEAD proteins are not able to activate transcription themselves, they interact with a number of coactivators. These coactivators allow the transcription of the gene of interest to be regulated. Failure of TEAD protein activity regulation can lead to cancer. Therefore, TEAD family proteins nowadays play an important role in the development of new anticancer drugs.

One way of inhibiting these proteins is to block the active site in their DNA binding domain, thus, to block their binding to DNA. This bachelor thesis deals with recombinant expression of said DNA binding domain of transcription factor TEAD1, which is extended by amino acids in unstructured regions. After finding suitable conditions of protein production, we proceeded to large volume production which was followed by purification and protein identity verification. Finally, the ability of the produced protein to interact with DNA was confirmed. Thus, the prepared protein can be used to study the ways in which it interacts with DNA, that in the future may help to find TEAD1 transcription factor blocking agents (*In Czech*).

KEYWORDS

Recombinant expression, protein purification, DNA binding protein, transcription regulation, cell signalling, TEAD1, transcription factor, DNA binding domain

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Novákovi Ph.D. za vedení bakalářské práce a cenné rady a Mgr. Růženě Liškové za její obětavou pomoc a trpělivost jak v laboratoři, tak při sepisování této práce.

Mé velké díky patří i všem kolegům Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace ve Vestci za morální podporu a vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a partnerovi za neuvěřitelně velkou podporu během celého mého studia, bez které bych dnes nebyla tam, kde jsem.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Teoretický úvod	10
1.1 TEAD rodina transkripčních faktorů	10
1.1.1 Význam TEAD proteinů	11
1.1.2 Funkce proteinu TEAD1	11
1.1.3 Ostatní proteiny rodiny TEAD	12
1.2 Funkční domény TEAD proteinů	12
1.2.1 TEA DNA vazebná doména	13
1.2.1.1 DNA vazebný motiv	15
1.2.2 YAP vazebná doména	16
1.2.2.1 Koaktivátory	17
1.3 Cílové geny TEAD proteinů a jejich funkce	21
1.3.1 Regulace TEAD transkripčních faktorů	22
1.3.1.1 Genová regulace řízená afinitou transkripční faktorů k DNA	25
2 Cíle práce	27
3 Materiál	28
3.1 Přístroje a pomůcky	28
3.2 Chemikálie a enzymy	29
3.3 Bakteriální kmeny	30
3.4 Vektory a oligonukleotidy	30
3.5 Roztoky, pufrý a média	30
4 Metody	32
4.1 Produkce proteinu TEAD1-DBD	32
4.1.1 Transformace kompetentních buněk plasmidem	32
4.1.2 Vlastní produkce proteinu TEAD1 DBD	32
4.1.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	33
4.2 Výběr vhodných podmínek produkce	33
4.2.1 Koncentrace induktoru IPTG	33
4.2.2 Doba produkce	34
4.2.3 Teplota produkce	34
4.3 Purifikace	34
4.3.1 Velkoobjemová produkce DNA vazebné domény proteinu TEAD1	34
4.3.2 Izolace proteinů z produkční kultury bakterií	35
4.3.3 Afinitní chromatografie	35

4.3.4	Odštěpení histidinové kotvy thrombinem	36
4.3.5	Gelová permeační chromatografie	36
4.3.6	Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu.....	36
4.4	Ověření schopnosti TEAD1-DBD vázat dvouřetězcovou DNA.....	37
4.4.1	Příprava dvouřetězcové DNA	37
4.4.2	Vytvoření komplexů (TEAD1-DBD)-DNA a příprava vzorků pro nativní elektroforézu 37	
4.4.3	Nativní elektroforéza.....	38
4.4.4	Specifické barvení nukleových kyselin a proteinů	38
5	Výsledky	39
5.1	Test produkce proteinu TEAD1-DBD.....	39
5.2	Výběr vhodných podmínek produkce	40
5.2.1	Koncentrace induktoru IPTG	40
5.2.2	Doba produkce	41
5.2.3	Teplota produkce	41
5.3	Purifikace.....	42
5.3.1	Afinitní chromatografie a odštěpení polyhistidinové kotvy.....	42
5.3.2	Gelová permeační chromatografie	44
5.3.3	Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu.....	45
5.4	Ověření schopnosti TEAD1-DBD vázat dvoušroubovici DNA	47
6	Diskuze	50
7	Závěr.....	53
	Použitá literatura.....	54

Seznam zkratek

AMOT	protein Angiomotin, regulátor Hippo signální dráhy
<i>Ankrd1</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „Ankyrin repeat domain-containing protein 1“)
APS	peroxodisíran amonný
<i>AREG</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující protein Amphiregulin
ATTS	jiný název pro TEA doménu; její název je složen z prvních písmen proteinů, ve kterých byla nalezena: AbaA, TEC1, TEF-1 a Scalloped
<i>AXL</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující receptorovou tyrosinkinasu
<i>Birc2</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protein“)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát, druhý posel vytvořený adenylátcyklasou
<i>CTGF</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „connective tissue growth factor“)
<i>CYR61</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „cystein-rich 61“)
DBD	funkční doména TEAD proteinů vázající DNA (z anglického „DNA binding domain“)
<i>DDIT4</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „DNA damage inducible transcript“)
dsDNA	dvouvláknová DNA (z anglického „double-stranded DNA“)
DTT	1,4-dithiothreitol
<i>E. coli</i>	bakterie <i>Escherichia coli</i>
<i>EDN</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD kódující protein Endothelin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI-FT-ICR	hmotnostní spektrometrie s iontovým sprejem a iontově-cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací
<i>Fgfr4</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „Fibroblast growth factor receptor 4“)
FOX	transkripční faktor vázající DNA (z anglického „Forkhead box protein“)
<i>GLUT1</i>	1. exon cílového genu <i>GLUT1</i>
HeLa buňky	nádorové buňky pocházející z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina
Hpo	proteinkinasa Hippo, základní komponenta Hippo signální dráhy u drosophily
IAP	proteinová rodina inhibitorů kaspas (z anglického „Inhibitor of apoptosis proteins“)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
LATS	kinasa působící v Hippo signální dráze (z anglického „Large tumor suppressor“)
LB médium	Luria-Bertani médium
M-CAT	specifická sekvence DNA, kterou váže TEAD ve svalech (z anglického „Muscle cytosine, adenine, thymine“)
MOB	MOB-kinasový aktivátor Hippo signální dráhy (z anglického „Mps one binder“)
MST	kinasa působící v Hippo signální dráze (z anglického „Mammalian sterile 20-like“)

MWCO	mezní hodnota molekulové hmotnosti (z anglického „molecular weight cut-off“)
<i>MYC</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „Myc proto-oncogene protein“)
<i>NAIP</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „NLR family apoptosis inhibitor protein“)
NF2	regulátor Hippo signalizační dráhy neurofibromin 2
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAXs	transkripční faktor (z anglického „Paired box proteins“)
PDZ motiv	strukturní motiv aktivační domény YAP proteinu, akronym z názvu proteinů, ve kterých byl jako první nalezen
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
Rho	skupina proteinů malých GTPas, které fungují jako modulátory aktinového cytoskeletu
rpm	otáčky za minutu (z anglického „revolutions per minute“)
RUNX	transkripční faktor (z anglického „Runt-related transcription factor“)
SAV	protein Salvador, základní komponenta Hippo signalizační dráhy
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SMADs	transkripční faktor (z anglického „mothers against decapentaplegic homologs“)
ssDNA	jednovláknová DNA (z anglického „single-stranded DNA“)
SV40	enhancer opičího viru 40 (z anglického „simian virus 40“)
TAZ	koaktivátor proteinu TEAD (z anglického „transcriptional co-activator with PDZ-binding motif“)
TBD	TEAD-vazebná doména koaktivátoru YAP (z anglického „TEAD binding domain“)
TBE pufr	Tris-borát-EDTA pufr
TBX5	transkripční faktor (z anglického „T-box transcription factor 5“)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEAD	rodina transkripčních faktorů obsahujících TEA doménu (z anglického „transcriptional enhancer activator domain“)
TEF-1	jiný název pro TEAD1 (z anglického „transcriptional enhancer factor“)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan
TDU	jiný název pro Vg motiv u VGLL koaktivátorů, nazývaný též TONDU
TP73	transkripční faktor (z anglického „Tumor protein 73“)
<i>TRAIL</i>	cílový gen transkripčního faktoru TEAD (z anglického „Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vg	protein Vestigial, koaktivátor Sd u doosophily
VGLL	koaktivátor proteinu TEAD (z anglického „Vestigial-like protein“)
WW doména	strukturní motiv YAP koaktivátoru obsahující dva vysoce konzervované tryptofany
YAP	koaktivátor proteinu TEAD (z anglického „YES-associated protein“)
YBD	funkční doména TEAD proteinů vázající YAP koaktivátor (z anglického „YAP binding domain“)

1 Teoretický úvod

1.1 TEAD rodina transkripčních faktorů

Tato rodina transkripčních faktorů byla objevena díky jadernému proteinu TEF-1 (z anglického „transcriptional enhancer factor“, později pojmenovaném TEAD1) vázaného na enhancer opičího viru 40 (SV40) v lidských HeLa buňkách¹, konkrétně na motivy GT-IIC a Sph enhanceru SV40².

Proteiny TEAD rodiny transkripčních faktorů sdílí vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménu nazývanou TEA doména³ (viz Obr. 1). Zkratka jejich názvu pochází z anglického „transcriptional enhancer activator domain“, tedy proteiny obsahující transkripční aktivační doménu, která nasedá na enhancer genu⁴. TEA doména obsahuje něco málo přes 70 aminokyselin a je nazývána též jako ATTS doména podle prvních písmen proteinů, ve kterých byl její motiv nalezen³. Prvním z proteinů je AbaA, který reguluje vývoj nepohlavních spor u *Aspergillus nidulans* a ukončuje vegetativní růst; dále protein Tec1, který se podílí na aktivaci Ty1 retrotranspononu u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*; lidský protein TEF-1 (tedy TEAD1) a v neposlední řadě protein Scalloped (sd) zodpovědný za vývoj křídel, nervové soustavy a smyslových orgánů u rodu *Drosophila*^{5,6}.

		TEA doména							
						90			
mTEAD1	1	IEPSS	WSGSESP	AENMERM	SDSADKPIDN	DAEGV	WSPDIEQSFQEALAI	YPPCGRRKIILSDEG	KMYGRNELIARIYIKL
mTEAD2		MGDPRTGAPLDDGGG	+T+++EG	S+EGTGG	+EGVGGDGGSP	+++++	+++++	+++++	+++++
mTEAD3		+ASN+	+TANS++	G+AR+DG	+EGL++G+++	+++++	+++++	+++++	+++++
mTEAD4		+TSNE	++SPD++EGSSISGG	+QAL+++++		+++++	+++E+R+++++	+++++TE++	+++++H+++
						91		180	
mTEAD1		RTGKTRTRKQVSSHI	QVLARRK	SRDFHSKL	K	DQTAQDKALQ	HMAAMSSAQIVSATA	IHNKLGKLP	IPRPT
mTEAD2		+++++	+++++	++EIQ+++	+	++VS+++F+	T++T++++LI++PS	LQA+++PS+	+Q
mTEAD3		+++++	+++++	V+EYQVGI	+AMNL++VS+++++	S++S+++++SV	LQ++FSP+SPL+QAV	+SSSR++SSPLL+	
mTEAD4		+++++	+++++	A+EIQAA++	+	++A+N++++	S+++++S	F+S+ML+AR	GP
						181		270	
mTEAD1		Q	PGSSQDVKPFVQQ	AYPIQPAVTAPIP	GFEPTSAPAPS	VPAWQGRSIGT	KLRLVEFSAPLEQQR	DPDSYNKHLFVHIGH	
mTEAD2		P	+WNVP++++S+A	PFSVSLT+PAS	DL+	+Y+PPALS+LPPP	APSP++++A+AL++A	R+Q+I++++V+PPD	AV++FQR+++++SQ
mTEAD3		+Q++P+++I+++A+P		+++++PLPPALN	SY+SLAPL+AAASA	TASA++++D+T+ASS	R+++L+Y+++M+V++	+++T+S+++++Q	
mTEAD4		+ ++T+H++++S+N		T++V++PL	+L+	+++SPAG+T++PS	AFLA+P+++++ASS	++WML+++++R+Q	+++T+++++SQ
						271		360	
mTEAD1		ANHSYSDPLESVDI	RQIYDKFPEKKGGLK	ELFGKGPQNAFFLVK	FWADLNC	NIQDDA	GAFYGVSSQY	ESSENMTVTCST	KVC
mTEAD2		QCP+PGA+P+++++V	+++++	++YDR++PH+++++	+++++	WGPSAEEAG	SSGGG+G+++++	++R+L++L+++S	+++
mTEAD3		T+PAF+++P++A++V	+++++	++YE+++P+++++	+++++	T++EGP	+++++	S+ADS++ISV++	+++
mTEAD4		SSP+++++Y++T+++	+++++	+++ER++S+++++	+++++	T	++D+EG	S+++++	++P+++II+++
						361		450	
		C-terminální konec							
mTEAD1		SFGKQVVEKVEVEYA	RFENGRFVYRINRSP	MCEYMINFIHKLKHL	PEKYMMNSVLENFTI	LLVVTNRDTQETLLC	MACVFEVSNSEHGAAQ		
mTEAD2		+++++R+	QL+D+++++LL+++	++++LV++L+++RQ+	++R+++++S	+Q+++++L+++	T+Y++++T++R+++		
mTEAD3		+++++L+	+++++H+++	+++++	+++++	+Q+++S++S+++V	I+F++++T++++		
mTEAD4		+++++Y+++HYL+++H+++	L+++++	+++++	+++++	+Q+++++S	I+Y++++A++++		
						451		Množství aminokyselin	
mTEAD1		HHIYRLVKD						426	
mTEAD2		Y+++++R+						445	
mTEAD3		++V+K++++						439	
mTEAD4		+++++E						427	

Obr. 1 Porovnání aminokyselinových sekvencí čtyř proteinů tead u myši. Konzervované části jsou označeny rámečkem (TEA doména a C-terminální oblast) a shodné aminokyseliny TEAD proteinů s TEAD1 symbolem +. Převzato a upraveno⁷.

U savců patří do této rodiny čtyři proteiny: **TEAD1** (též nazývaný TEF-1 nebo NTEF-1), **TEAD2** (ETF, ETEF-1, TEF-4), **TEAD3** (DTEF-1, TEF-5, ETFR-1) a **TEAD4** (RTEF1, TEF-3, ETFR-2, FR-19)⁶. Jak už bylo výše zmíněno, společným znakem těchto čtyř proteinů je téměř identická TEA DNA vazebná doména na N-konci (téměř 99% shoda)⁸. Ostatní části proteinů jsou značně variabilní, až na C-koncovou část, která je, podobně jako TEA doména, také konzervovaná (viz Obr. 1)⁷.

1.1.1 Význam TEAD proteinů

TEAD proteiny hrají významnou roli při vývoji a růstu organismu a jejich exprese byla zaznamenána již u dvoubuněčného myšího embrya⁹. Vzájemně se od sebe liší výskytem v nejrůznějších tkáních v různých fázích vývoje organismu. Téměř všechny tkáně obsahují alespoň jednu formu proteinu TEAD, přičemž např. v plicním epitelu lze nalézt všechny čtyři formy¹⁰. Funkce TEAD proteinů je nejhojněji zkoumána u myších homologů, které se od lidských liší minimálně: u TEAD1 se myší homolog liší od lidského ze 426 aminokyselin pouze ve třech⁷. TEAD proteiny jsou zodpovědné za proliferaci buněk, jejich diferenciaci a bránění apoptose¹¹; za kardiogenezi; myogenezi; vývoj neurální lišty¹²; struny hřbetní nebo trofoektodermy⁶. Významnou roli však hrají také při rakovině¹³.

1.1.2 Funkce proteinu TEAD1

Inaktivace proteinu *tead1* u myši v embryonálním vývoji vede ke smrti v důsledku vážných srdečních defektů^{14,15}. Histologická vyšetření srdcí těchto embryí odhalila abnormálně tenkou stěnu komory, což dokazuje, že je *tead1* nezbytný pro tvorbu myokardu¹⁴. TEAD1 se dále podílí na vývoji a růstu kosterního a hladkého svalstva, vývoji nervového systému či ledvin a dýchacího ústrojí^{5,6,16}. V některých případech lze jeho funkci nahradit jinou formou proteinu z rodiny TEAD; není to však úplně vždy možné (viz výše zmíněný vývoj srdečního svalu)⁵.

Tento protein je však také exprimován v různé míře v mnoha tkáních u dospělých myší, a to zejména v plicích, srdci, ledvinách, mozku či v kosterním svalstvu¹⁰. U dospělých lidí je zvýšená exprese TEAD1 spojena s rakovinou slinivky břišní nebo s rakovinou prostaty. Zvýšená hladina proteinu TEAD1 byla dále zaznamenána u rakoviny žaludku, prsu, plic, jater, tlustého střeva, karcinomu vaječníku, nádorů zárodečných buněk, Kapsiho sarkomu nebo melanomů⁶.

1.1.3 Ostatní proteiny rodiny TEAD

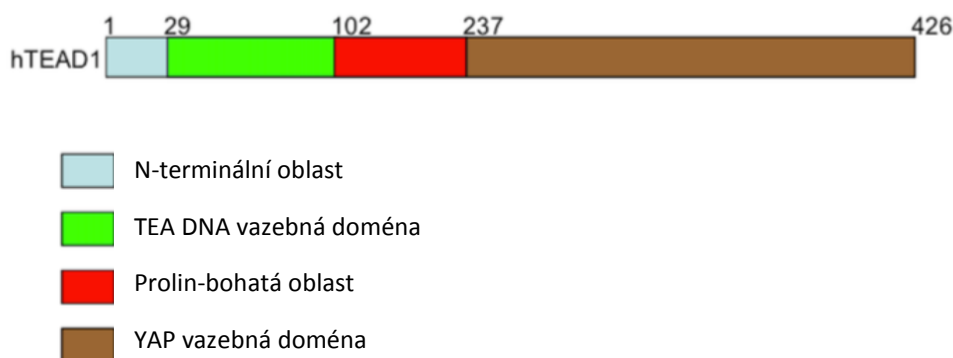
Nejhojnějším proteinem této rodiny transkripčních faktorů je *tead2*, který se vyskytuje v embryonálním vývoji u myši během prvních 7 dnů, přičemž jeho výskyt byl zaznamenán již v dvoubuněčném myším embryu^{9,10}. Podílí se na vývoji struny hřbetní; jeho inaktivace však není pro embryo smrtelná. V pozdějších stádiích vývoje jeho množství v organismu klesá a jeho přítomnost je omezena jen na některé tkáně (mozek, plíce, ledviny či střevo)⁵. Z počátku vývoje je možné ho nahradit proteinem *tead1*. Pokud dojde k porušení *tead2* genu, myší embrya se vyvíjí normálně, avšak s vyšší predispozicí pro poruchu mozku. Pokud ale dojde k současnému porušení i genu pro *tead1*, umírají embrya ještě před narozením s velkým množstvím vážných vývojových vad, které jsou závažnější, než u embryí s porušeným genem pouze pro *tead1*¹⁵.

TEAD3 byl z této rodiny transkripčních proteinů objeven jako poslední. Během vývoje organismu je specificky exprimován v placentě a několika embryonálních tkáních, kde ovlivňuje diferenciaci buněk¹⁶. Jeho přesná funkce během vývoje však ještě doposud nebyla objasněna¹⁷.

V raném embryonálním vývoji se TEAD4 uplatňuje při diferenciaci buněk trofoektodermu. Dojde-li k vypnutí nebo porušení genu pro TEAD4, diferenciaci vůbec nenastane, ovšem vypne-li se gen až po diferenciaci, embryo se bude vyvíjet normálně dál¹⁸. TEAD4 se v pozdějším vývoji také podílí na aktivaci genů kosterního svalstva¹⁶.

1.2 Funkční domény TEAD proteinů

Strukturu TEAD proteinů lze zjednodušit na 4 části (domény – viz Obr. 2).



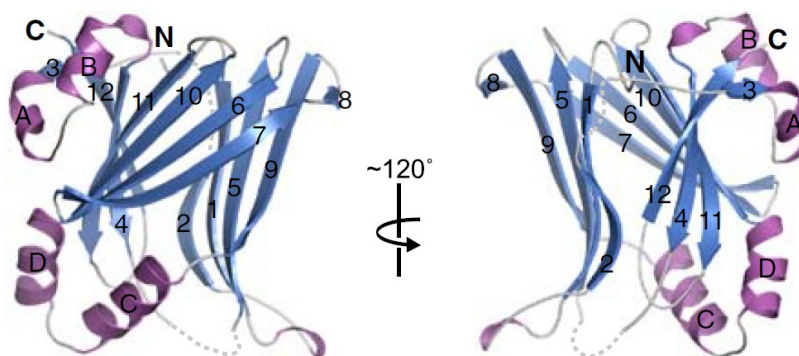
Obr. 2 Schematická struktura zvířecího TEAD/TEF proteinu. Převzato a upraveno⁶.

Nejvariabilnější částí u TEAD rodiny proteinů je N-terminální oblast. Jedná se o úsek se záporným nábojem bohatý na serin, který je značně fosforylován. N-konec může interagovat s koaktivátory⁶.

Podobně variabilní částí je i tzv. prolin-bohatá oblast (viz Obr. 2), která je například pro krysí *tead1* pouze z 20 % identická se stejnou oblastí krysího *tead4*¹⁹. Prolin-bohatá oblast je zároveň

spoluzodpovědná za vazbu transkripčních koaktivátorů YAP či TAZ; variabilita této oblasti pravděpodobně zodpovídá za rozdílné interakce TEAD proteinů s YAP a TAZ²⁰.

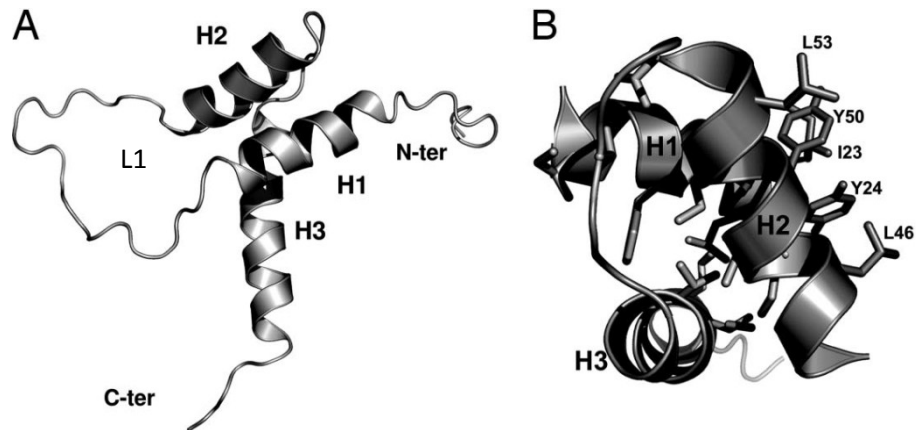
Naopak velice konzervovanou částí TEAD proteinů je již zmíněná TEA doména a C-konec nazývaný jako YAP vazebná doména, či zkráceně YBD (z anglického „YAP binding domain“)²¹. Jedná se o transaktivační doménu, která slouží k interakci s transkripčním koaktivátorem. Byla popsána její 3D struktura, a to pro lidský TEAD1 a TEAD2 a pro myši tead4. Všechny tyto tři struktury si byly nápadně podobné, což dokazuje konzervovanost YAP vazebné domény během evoluce. YBD se skládá z 12 β -vláken, dvou β -skládaných listů s 5 a 7 vlákny, které tvoří tzv. β -sendvič; a 4 α -helixů, uspořádaných do dvou motivů helix-turn-helix²¹⁻²³ (viz Obr. 3).



Obr. 3 Struktura YAP vazebné (transaktivační) domény TEAD2: β -vlákna jsou obarvena modře, α -helixy fialově a smyčky jsou obarveny šedě, zároveň je označen N- a C-konec proteinu. Převzato a upraveno²².

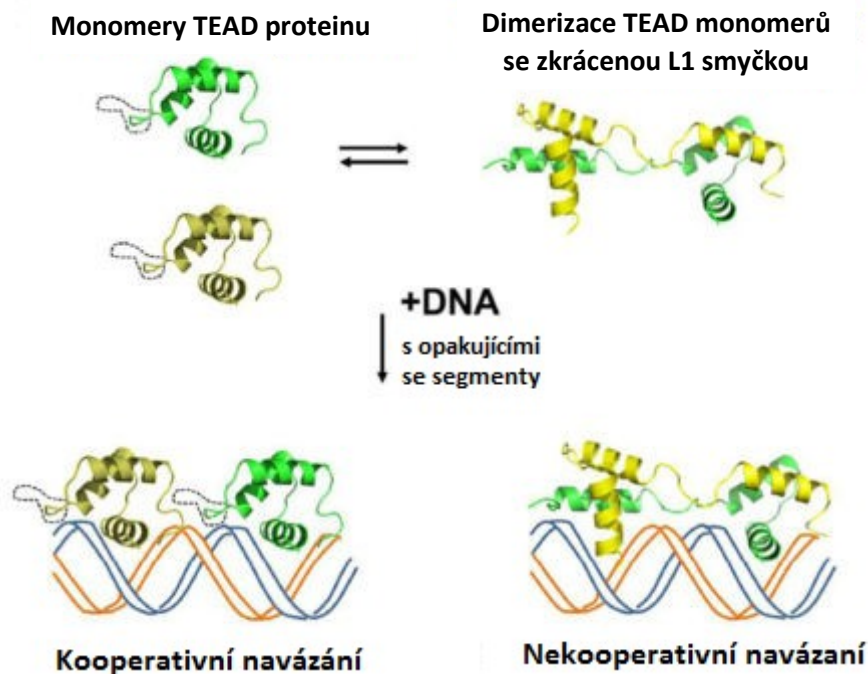
1.2.1 TEA DNA vazebná doména

První struktura TEA vazebné domény byla objevena pomocí metody NMR (z anglického „nuclear magnetic resonance“)²⁴. NMR analýza odhalila, že je TEA doména globulárním proteinem složeným ze tří helixů (H1, H2 a H3) propojených dvěma smyčkami a nestrukturovanými oblastmi (viz Obr. 4). První dva α -helixy (H1 a H2) jsou vůči sobě téměř v antiparalelní poloze. Třetí helix (H3) slouží ke stabilizaci celé struktury pomocí hydrofobních interakcí a pomocí tří serinů (S65, S66 a S76) umožňuje rozpoznávání povrchu DNA. Pomocí fosforylace jednoho či více z výše uvedených serinů je možné měnit afinitu TEA domény k DNA a tím regulovat transkripční aktivitu TEAD proteinů. Ve struktuře L1 smyčky byla objevena rezidua, která byla také zodpovědná za vazbu na DNA (viz Obr. 4 a 6, str. 15).



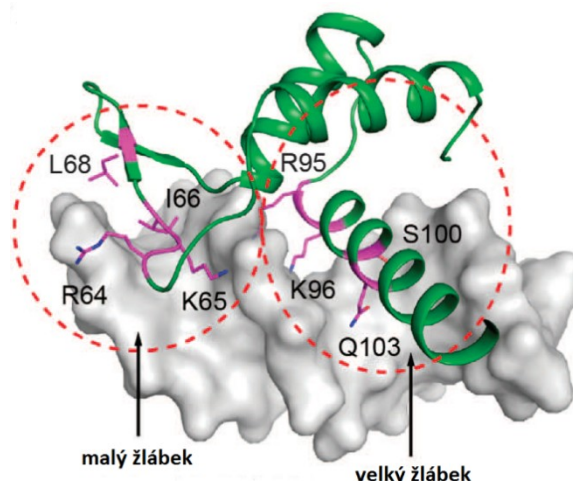
Obr. 4 Struktura TEA domény: (A) Stučkový diagram TEA domény s vyznačenými α -helixy H1, H2 a H3, smyčkou L1 a N-terminální a C-terminální oblastí. (B) Stabilizace struktury TEA domény pomocí hydrofobních interakcí reziduí na helixu H3 značených tyčinkovou strukturou. Převzato a upraveno²⁴.

Studie z roku 2016 potvrzuje pomocí částečné krystalografické struktury TEA domény – tj. bez L1 smyčky, která spojuje α -helixy H1 a H2 – sekundární strukturu zjištěnou pomocí NMR²⁵. Zároveň poukazuje na důležitost L1 smyčky, která je zodpovědná za kooperativní vazbu TEAD proteinu na DNA s opakujícími se vazebnými motivy. Pokud se smyčka L1 zkrátí, nedochází ke kooperativní vazbě TEAD proteinů. Vytvoří-li se mutant se zkrácenou L1 smyčkou, dojde ke vzniku dimeru. Ten ovšem není schopen kooperativní vazby na opakující se vazebné motivy DNA kvůli sterickému bránění (zkrácené L1 smyčky nejsou dostatečně flexibilní – viz Obr. 5).



Obr. 5 Zobrazení kooperativní vazby TEAD monomerů na opakující se segmenty DNA a sterické bránění v případě dimeru vzniklého ze dvou monomerů se zkrácenou L1 smyčkou. Převzato a upraveno²⁵.

K pochopení regulačního mechanismu transkripce genu zprostředkovaného pomocí TEAD proteinu přispěla studie z roku 2017, která zveřejnila krystalovou strukturu proteinu TEAD4 v komplexu s DNA (konkrétně s M-CAT DNA elementem). Pomocí mutací TEAD4 bylo možné odhalit specifický a detailní mechanismus rozpoznávání DNA pomocí TEA domény. Na DNA vazebné doméně byla identifikována dvě vazebná místa, která řídí specifičnost a vazbu na sekvenci genu (viz Obr. 6). Mutací příslušných míst proteinu TEAD4 došlo ke snížení obsazenosti promotorové oblasti cílových genů, tedy i narušení samotné transkripce, což vedlo k inhibici růstu a tvorbě kolonií buněk HGC-27 u nádorů žaludku²⁶.



Obr. 6 TEA DNA vazebná doména v komplexu s DNA: DBD (značena zeleně) s DNA (značenou šedě) s malým a velkým žlábkem; fialově jsou znázorněny aminokyseliny, jejichž mutace deaktivuje DNA vazebnou schopnost TEA vazebné domény proteinu TEAD4. Převzato a upraveno²⁶.

1.2.1.1 DNA vazebný motiv

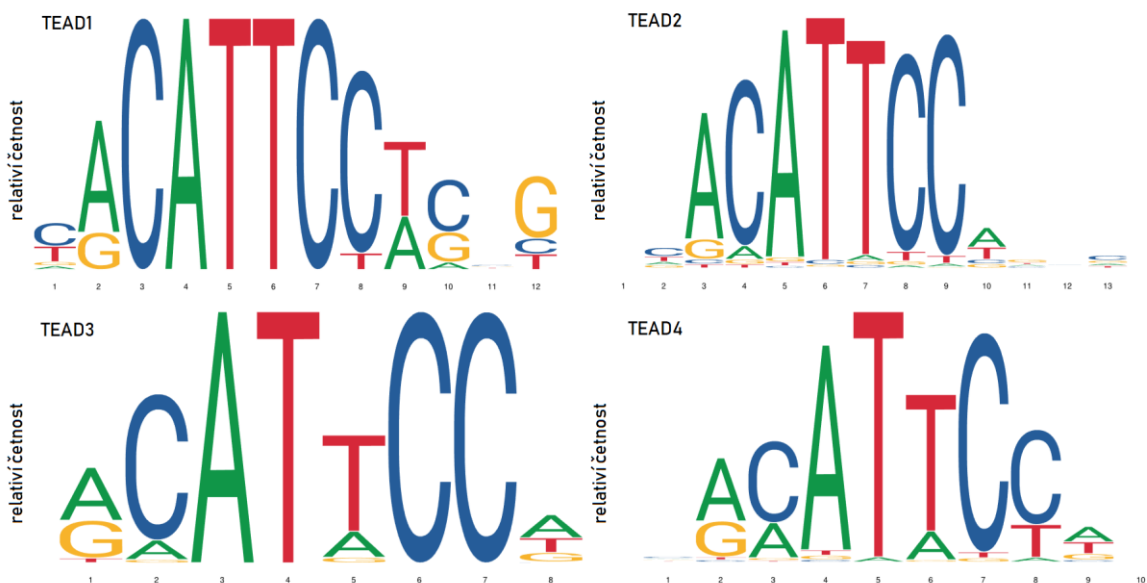
Rodina proteinů TEAD byla, jak již bylo dříve zmíněno, nalezena na enhanceru opičího viru 40 (SV40) v lidských HeLa buňkách na motivech GT-IIC a Sph enhanceru SV40². Pro vazbu TEAD proteinů je pak důležitá sekvence 5'-TGGAATGT-3'¹.

Dále byla nalezena také sekvence s nejvyšší afinitou pro izolovanou TEA doménu: 5'-N[A/T/G]G[A/T/C]ATNT-3', ve které N značí jakoukoli bázi²⁴.

TEAD proteiny se mohou dále vázat i na takzvané M-CAT elementy^{2,27}, jejichž název pochází z anglického „Muscle Cytosine, Adenine, Thymine“²⁸. Ty se nacházejí v promotorových a enhancerových oblastech genů exprimovaných v srdeční svalovině nebo v buňkách hladkého a kosterního svalstva. Mají tedy významný vliv na regulaci genů během vývoje svalů či svalových onemocnění s tím souvisejících. Patří mezi ně například srdeční troponin T, těžký řetězec β -myosinu nebo α -aktin v hladkém i kosterním svalstvu⁸. Přítomnost M-CAT elementů však byla zaznamenána i u jiných genů, kupříkladu u zmíněného enhanceru opičího viru SV40, dále v promotorových oblastech genů pro choriový somatomotropin a Foxa2. Vazebnou sekvencí elementů umožňující nasednutí TEAD proteinů je 5'-CATTCC-3'⁸. Vyskytuje-li se

v promotorových oblastech více takovýchto sekvencí, může docházet ke kooperativní vazbě mezi TEAD proteiny, přičemž prostorová vzdálenost mezi těmito sekvencemi je rozhodujícím faktorem transkripční aktivity genu²⁸. Dále bylo zjištěno, že proteiny rodiny TEAD jsou schopny se vázat pouze na dvouřetězcovou DNA s M-CAT elementy, nikoli na jednořetězcovou²⁹.

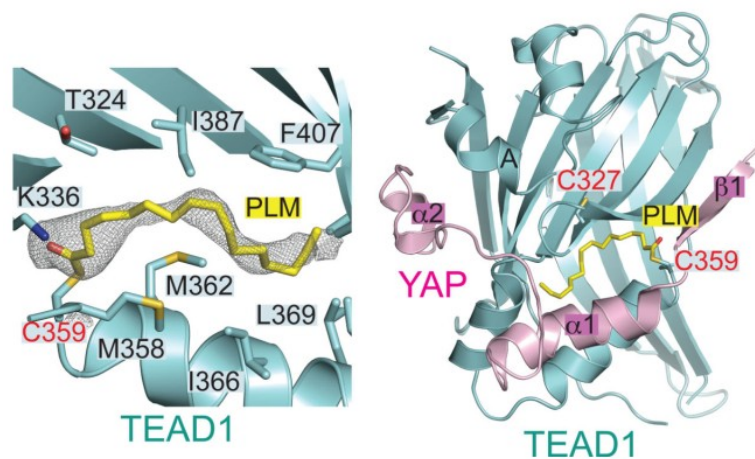
Jednotlivé TEAD proteiny se od sebe mírně liší v DNA vazebných sekvencích (motivech). Tato odlišnost je zobrazena na obrázku 7, kde svislé osy udávají četnost bází v dané části sekvence a podélné osy pak relativní pozici dané báze.



Obr. 7 Relativní zastoupení bází jednotlivých TEAD proteinů v DNA vazebných sekvencích. Převzato a upraveno³⁰.

1.2.2 YAP vazebná doména

Jak již bylo dříve zmíněno (viz 1.2), struktura YAP vazebné domény (YBD) slouží k navázání koaktivátorů a je tvořena jedním β -sendvičem a čtyřmi α -helixy. YBD bývá posttranslačně modifikována kyselinou palmitovou^{31,32}. Jedná se o S-palmitoylaci, což je vysoce konzervovaný proces, který se vyskytuje u všech eukaryotických organismů, a slouží k regulaci tvorby proteinů; může probíhat buď spontánně nebo enzymaticky. Při S-palmitoylaci dochází k reverzibilnímu kovalentnímu připojení 16uhlíkaté mastné kyseliny na konzervovaný cysteinový zbytek prostřednictvím thioesterové vazby; cysteinový zbytek se nachází v hydrofobní (lipidové) kapse domény mezi β -skládanými listy³¹ (viz Obr. 8). Navzdory odhalení mechanismu palmitoylace YBD však zůstává její význam z hlediska regulace TEAD proteinů nejasný. Současné studie však naznačují, že je palmitoylace TEAD proteinů esenciální pro správné skládání TEAD transkripčních faktorů (tedy i vazby s koaktivátory) a pro buněčnou expresi¹⁷.



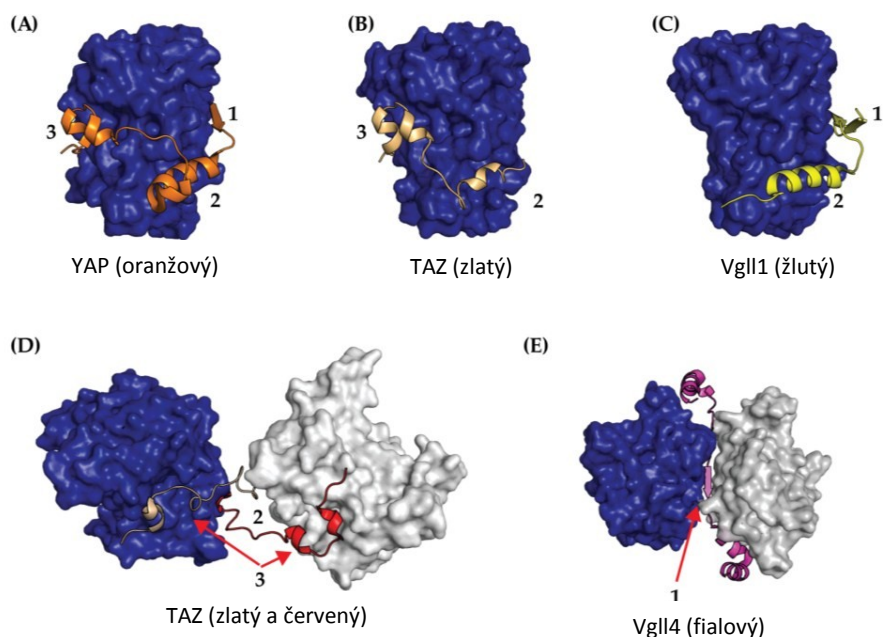
Obr. 8 *Struktura vazby palmitové kyseliny v komplexu lidského proteinu TEAD1 (YBD domény) s částí YAP koaktivátoru vázající se na TEAD: první obrázek zleva: kyselina palmitová (značena žlutě tyčinkovou strukturou) vázaná k YBD (na cystein 359, rezidua v okolí kyseliny palmitové a celá struktura YBD jsou značeny azurově); druhý obrázek zleva: komplex kyseliny palmitové s YBD a navázaným YAP koaktivátorem (značen růžově). Převzato a upraveno³².*

Palmitát ve vazbě s YBD neinteraguje přímo s koaktivátorem, ale mění alostericky konformaci transaktivační domény (konkrétně na vazebném místě 3 a jeho okolí – viz Obr. 9), čímž přispívá ke zpevnění struktury TEAD proteinů^{31,32}. Tím reguluje vazbu YAP proteinu, ale nemá vliv na vazbu koaktivátoru Vgll. Vstup do hydrofobní kapsy je maskován β 1-vláknem YAP nebo Vgll4 β 1-vláknem³³.

1.2.2.1 Koaktivátory

Transkripční faktory rodiny TEAD nemohou samy o sobě indukovat transkripci cílových genů, protože postrádají doménu schopnou aktivovat transkripci (aktivační doménu)². K aktivaci transkripce potřebují koaktivátory, tedy proteiny s aktivační doménou, která umožňuje transkripci daného genu. Tyto proteiny se však neváží přímo na DNA, nýbrž na transaktivační doménu (viz Obr. 3, str. 13) transkripčních faktorů, čímž vytváří heterodimer (viz Obr. 9) schopný aktivace transkripce genu¹³. Některé koaktivátory mohou sloužit i k regulaci konformace chromatinu⁶.

Bylo identifikováno několik proteinů, které jsou schopny ovlivnit expresi cílových genů díky vazbě na transkripční faktory rodiny TEAD. Existuje mnoho způsobů jejich dělení. Jedním z nich je dělení do tří skupin na YAP a jemu podobný TAZ, Vgll proteiny a koaktivátory nukleárních receptorů rodiny p160³³.

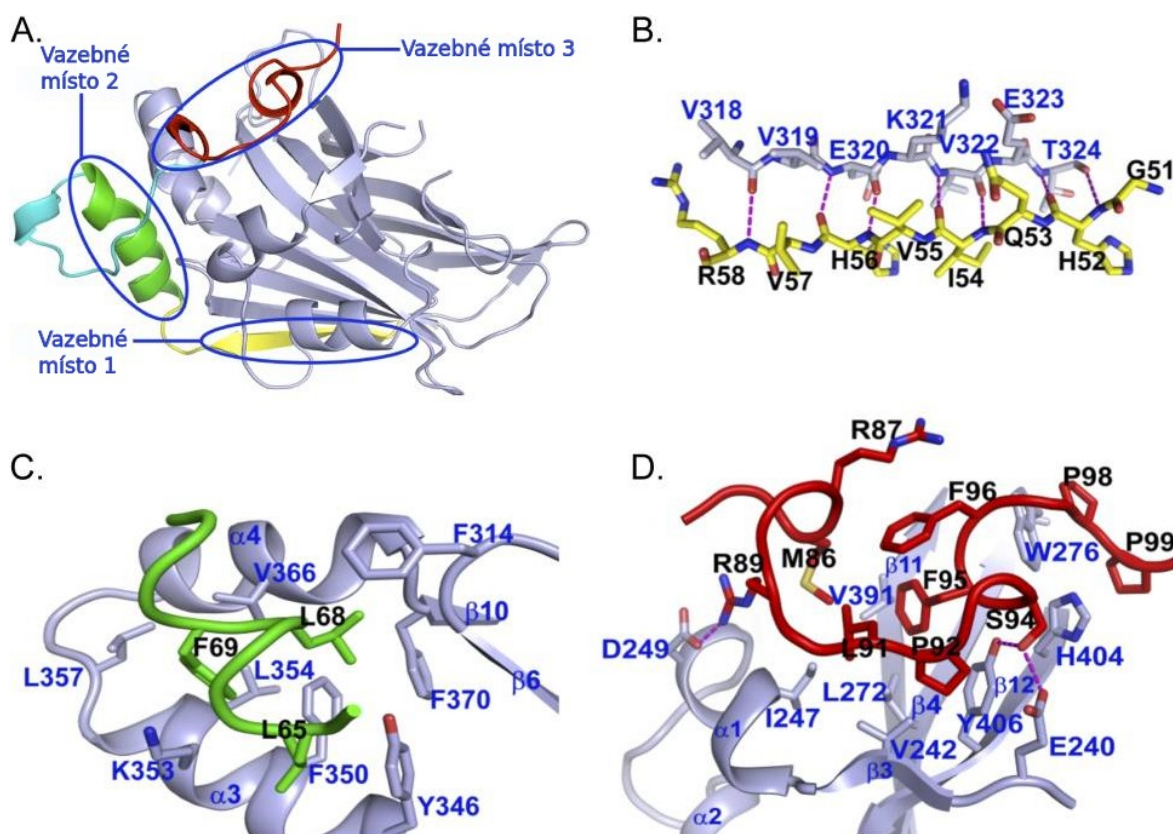


Obr. 9 Krystalové struktury YBD TEAD proteinu s navázanými koaktivátory: YBD (značena modře a šedě) s: (A) YAP (oranžový); (B) TAZ (zlatý); (C) Vgll1 (žlutý); (D) TAZ (zlatý a červený) a (E) Vgll4 (fialový). Na obrázcích (D) a (E) jsou znázorněny dimery YBD vzniklé interakcí s koaktivátory. TEAD vazebná místa jsou značena čísly 1, 2 a 3. Převzato a upraveno¹⁷.

1.2.2.1.1 YAP

Prvním objeveným koaktivátorem savčích TEAD proteinů byl YAP, jehož název vznikl z anglického „YES-associated protein“, protože byl objeven ve vazbě na tyrokinasu YES²⁰. Jako transkripční koaktivátor se YAP vazbou na transkripční faktor podílí na regulaci růstu a proliferaci buněk během vývoje a je zároveň limitujícím faktorem míry exprese TEAD proteiny regulovaných genů. S tím souvisí jeho nadměrná exprese a nukleární lokalizace v nádorových buňkách plic, jater, ledvin, prsu, střev či vaječníků³⁴. Stejně jako proteiny rodiny TEAD, je i tento protein vícedoménový a velmi evolučně konzervovaný²¹.

Na transaktivační doménu TEAD proteinů se váže pomocí TEAD-vazebné domény (TBD z anglického „TEAD binding domain“) na svém N-konci. Pokud není YAP ve vazbě s TEAD proteinem, je jeho TBD v nestrukturovaném stavu²². Krystalové struktury komplexu transaktivační domény proteinu TEAD s derivátem proteinu YAP obsahujícím pouze TEAD vazebnou doménu (sekvence délky 50-100 aminokyselin) poskytly informace o místech interakce těchto dvou segmentů proteinů^{21,22}. Mezi zmíněnými segmenty byla nalezena tři místa interakce a nazvána jako vazebná místa 1-3 (viz Obr. 10)²¹.



Obr. 10 **Struktura komplexu YAP vazebné domény TEAD1 a TEAD vazebné domény YAP koaktivátoru:** YAP vazebná doména (znázorněna šedou barvou), TEAD vazebná doména (znázorněna barevně). Interakce YAP-TEAD je u vazebného místa 1 (B) znázorněna žlutou barvou, u vazebného místa 2 (C) znázorněna zelenou barvou a u vazebného místa 3 (D) znázorněna červenou barvou. Jednotlivá interagující rezidua jsou vypsána. Převzato a upraveno²¹.

Vazebné místo 1 je tvořeno 7 intramolekulárními vodíkovými vazbami mezi peptidovými páteřemi β 1-vlákniny YAP a β 7-vlákniny TEAD proteinu, které vzájemně tvoří antiparalelní β -list²¹. Delece β 1-vlákniny u YAP proteinu nemá vliv na interakci YAP a TEAD proteinů.

Vazebné místo 2 se skládá z α 1-helixy YAP, který je vložen do drážky mezi α 3 a α 4-helixem^{21,23}. Mezi helixy dochází ke vzniku hydrofobních interakcí, které komplex stabilizují. Mutace v α 1-helixu YAP či jeho zkrácení na N-konci nemá vliv na interakci YAP-TEAD.

U vazebného místa 3 interaguje Ω -smyčka YAP proteinu s hydrofobní kapsou TEAD proteinu tvořenou β 4, β 11, β 12-skládanými listy a α 1 a α 4-helixem²¹. Struktura je v tomto místě stabilizována van der Waalovými silami, vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi. Na rozdíl od koaktivátoru TAZ obsahuje YAP PXX Φ P motiv (P je prolin, X je jakákoliv aminokyselina a Φ značí hydrofobní rezidua), který se vyskytuje v Ω -smyčce spojující dva krátké α -helixy na N-konci a je esenciální pro vazbu YAP s TEAD proteinem^{23,35}.

Kromě TEAD vazebné domény obsahuje YAP i tzv. WW domény, což jsou malé peptidové úseky sloužící k interakci komplexu s lineárními peptidovými motivy jiných proteinů bohatých na prolin³⁶. Proces translokace z cytoplazmy do jádra je částečně řízen komplexem s LATS1 nebo

LATS2 kinasou, které ovlivňují právě tuto doménu³⁷. WW domény se v YAP proteinu objevují v závislosti na jeho isoformě. YAP1 má jednu WW doménu, YAP2 má dvě a YAP2-L (YAP2-long) obsahuje 16 aminokyselin dlouhý segment vložený do své aktivační domény³⁸.

K ovlivnění míry exprese genu slouží YAP proteinu také jeho další aktivační doména s PDZ motivem, která se, stejně jako doména aktivující transkripci, nachází na C-konci koaktivátoru. Stejně jako WW doména, i PDZ motiv se podílí na translokaci YAP proteinu do jádra buňky^{37,39}. Pokud dojde k delecí PDZ motivu u YAP2 mutantů, objevují se tyto proteiny pouze v cytoplazmě a nedochází k jejich translokaci do jádra³⁹.

1.2.2.1.2 TAZ

Homologem proteinu YAP je TAZ protein (z anglického „transcriptional co-activator with PDZ-binding motif“). Tyto dva koaktivátory se spolu shodují ve 45 % primární sekvence⁴⁰. Stejně jako YAP je i TAZ schopný interagovat se všemi čtyřmi transkripčními faktory rodiny TEAD, čímž zvyšuje jejich transkripční aktivitu. K navázání využívá doménu na svém N-konci, která je téměř totožná s TEAD vázající doménou proteinu YAP¹⁹. Na rozdíl od svého homologu neobsahuje TAZ protein dvě WW domény, ale pouze jednu¹¹.

Jak již bylo dříve zmíněno, zásadním rozdílem mezi těmito koaktivátory je zkrácení linkeru na N-konci TAZ proteinu, kdy je absence PXXΦP motivu (vyskytujícího se u YAP koaktivátoru) nahrazena souborem interakcí TAZ s TEAD proteinem, díky čemuž se na TEAD váže se stejnou afinitou jako YAP³³. Díky této absenci je TAZ schopen vytvářet s TEAD proteinem dva různé typy vazeb na základě stechiometrie. Je-li TAZ s TEAD proteinem v poměru 1:1, vzniká struktura podobná YAP-TEAD komplexu; pokud je však stechiometrie 2:2, dojde ke vzniku komplexu, který je tvořen dvěma proteiny TEAD spojenými pomocí dvou koaktivátorů TAZ⁴¹ (viz Obr. 9, str. 18).

1.2.2.1.3 VGLL

VGLL proteiny (z anglického „Vestigial-like“) patří do rodiny konzervovaných proteinů, které získaly svůj název po proteinu Vestigial (Vg), se kterým sdílí stejný Vg motiv nazývaný TONDU či TDU doména⁴². Vestigial protein se vyskytuje u drosophily a společně se svým partnerem Scalloped (Sd), transkripčním faktorem, hrají zásadní roli při vývoji a růstu křídel.

Zatím byly nalezeny čtyři savčí proteiny nazvané VGLL1-4, které, stejně jako YAP a TAZ, neobsahují žádnou DNA vazebnou doménu a uplatňují své transkripční regulační funkce prostřednictvím vazby na TEAD proteiny pomocí Vg motivu³³ (viz Obr 9, str. 18). VGLL koaktivátory si kromě TDU domény nejsou vůbec sekvenčně podobné a v ostatních částech proteinu se značně liší^{13,42}. Zmíněný TONDU motiv se skládá z 25 aminokyselin a slouží k interakci VGLL koaktivátoru s TEAD proteiny. U savců a drosophily je velmi evolučně konzervovaný⁴². Zatímco VGLL1-3 mají TDU doménu na N-konci, koaktivátor VGLL4 obsahuje

dva motivy TONDU na svém C-konci. Přesný mechanismus interakce mezi TEAD a VGLL však doposud nebyl plně objasněn³³.

Koaktivátor VGLL4 se od ostatních proteinů této rodiny liší přítomností druhého TDU motivu (viz Obr 9D, str. 18). Díky tomu může například regulovat proces apoptosy prostřednictvím negativní regulace inhibitoru proteinů apoptosy. Bylo také prokázáno, že u myši i u člověka je při rakovině plic značně snížena exprese tohoto proteinu v daných tkáních. Při zvýšené expresi VGLL4 byl pozorován výrazný pokles růstu buněk rakoviny. Dále bylo zjištěno, že zmíněný koaktivátor inhibuje aktivitu YAP-TEAD transkripčního komplexu. VGLL4 soutěží s YAP koaktivátorem o vazebné místo na TEAD proteinu a po navázání prostřednictvím dvou TDU domén působí jako inhibitor transkripce⁴³.

1.3 Cílové geny TEAD proteinů a jejich funkce

Hlavní uplatnění nacházejí TEAD proteiny během období růstu a vývoje organismu. Proto mezi hlavní cílové geny, které TEAD proteiny řídí, patří transkripční faktory ovlivňující proliferaci buněk, řídící jejich diferenciaci a bránící apoptose^{12,44}. Mezi faktory související s růstem jsou řazeny geny, které kódují proteiny nacházející se ve svalech. Jedná se jak o kosterní svalstvo, tak o hladké svalstvo stěn cév či srdeční sval, kde se mohou tyto proteiny v dospělosti podílet na regeneraci^{45,46}. Další skupinou jsou pak geny, jejichž zvýšená exprese má za následek vznik nádorových buněk, jejich rychlý růst, tvorbu metastáz⁴⁷ nebo rezistence vůči chemoterapeutické léčbě⁴⁸.

Prvními objevenými cílovými geny TEAD proteinů jsou *CTGF* (z anglického „connective tissue growth factor“)^{44,49} a *CYR61* (z anglického „cystein-rich 61“)^{47,50}, které spadají do rodiny extrabuněčných faktorů ovlivňující buněčné dělení, proliferaci, apoptosu, adhezi či transport iontů⁴⁹. Tyto dva proteiny se však podílí i na vzniku a růstu nádorů či způsobují rezistenci na chemoterapeutikum taxol při rakovině prsu⁵⁰. Promotorová oblast *CTGF* genu obsahuje několik CATTCC motivů pro vazbu TEAD transkripčních faktorů^{11,44}. Zvýšená hladina exprese *CTGF* byla zaznamenána např. u zmíněné rakoviny prsu⁵⁰, gliomů mozku, rakoviny jícnu či slinivky⁴⁹.

Dalším genem, jenž je aktivován TEAD proteiny, je *MYC* nebo *c-MYC*, jenž přispívá k řízení buňky aktivací dalších genů, čímž dochází k amplifikaci efektů koaktivátoru YAP/TAZ. Tento regulátor je tedy opět zodpovědný nejen za růst během vývoje a regeneraci, ale také za vznik řady onkologických onemocnění^{11,47}. Obdobným způsobem funguje i AXL, receptorová tyrosinkinasa, která podporuje růst a tvorbu metastáz a brání apoptose při hepatocelulárním karcinomu jater⁵¹; nebo endothelin-1/2 (EDN1/2), jenž je důležitým regulátorem funkce ledvin a při jeho zvýšené expresi mohou vznikat karcinomy⁴⁷.

Amphiregulin (AREG), člen rodiny epidermálních růstových faktorů, byl poprvé nalezen jako bifunkční růstový faktor, který měl schopnost inhibovat proliferaci určitých nádorových buněčných linií, zatímco podporoval buněčnou životaschopnost normálních buněk, např. fibroblastů nebo keratinocytů⁵². *AREG* byl zároveň identifikován jako jeden z cílových genů YAP proteinu v Hippo signalizační dráze, nicméně v promotorové oblasti tohoto genu nebyl nalezen žádný element vázající TEAD⁵³.

Naopak Vimentin, jehož nadměrná exprese je typická pro buňky kolorektálního karcinomu, je přepisován pomocí TEAD4, nikoli však v komplexu s koaktivátorem YAP/TAZ⁵⁴. Tento protein hraje za fyziologických podmínek významnou roli v buněčné adhezi, což z něj činí klíčovou molekulu při udržování endoteliální bariérové integrity¹¹. Při jeho zvýšené transkripci díky proteinu TEAD4 Vimentin přímo mění morfologii a snižuje pohyblivost buněk kolorektálního karcinomu⁵⁴.

Transkripční faktory rodiny TEAD slouží k aktivaci i dalších skupin proteinů, které se podílí na proliferaci buněk tím, že jsou schopné zabránit apoptose inhibicí kaspas 3, 7 a 9. Mezi proteiny rodiny IAP (z anglického „Inhibitor of apoptosis proteins“) patří např. NAIP, Survivin, Apollon, Birc2 nebo Livin⁵⁵. Při některých nádorových onemocněních fungují TEAD transkripční faktory spolu s koaktivátorem YAP/TAZ jako represory genů pro tumor supresory DDIT4 a TRAIL⁵⁶.

Poslední skupinou, exprimovanou TEAD proteiny, jsou geny vyskytující se ve svalových buňkách. Jak již bylo dříve zmíněno, TEAD proteiny (konkrétně TEAD1) se při vývoji organismu podílí na tvorbě myokardu¹⁴, kosterního a hladkého svalstva⁶. Ovlivňují geny kódující α -aktin hladkých i kosterních svalů, těžké řetězce srdečního α - a β -myosinu⁶ a transkripční faktor Myocardin, který je potřebný k aktivaci exprese nejrůznějších svalových genů⁴⁵. Protein Fgfr4 (z anglického „Fibroblast growth factor receptor 4“), řízený TEAD transkripčním faktorem, se podílí nejen na vývoji svalů, ale také na efektivní regeneraci svalové tkáně po poranění⁵⁷. Podobnou schopnost regenerace vykazuje protein Ankrd1, též regulovaný TEAD proteiny, jehož zvýšenou hladinu lze nalézt u myši s neurogenní svalovou atrofií⁴⁶.

1.3.1 Regulace TEAD transkripčních faktorů

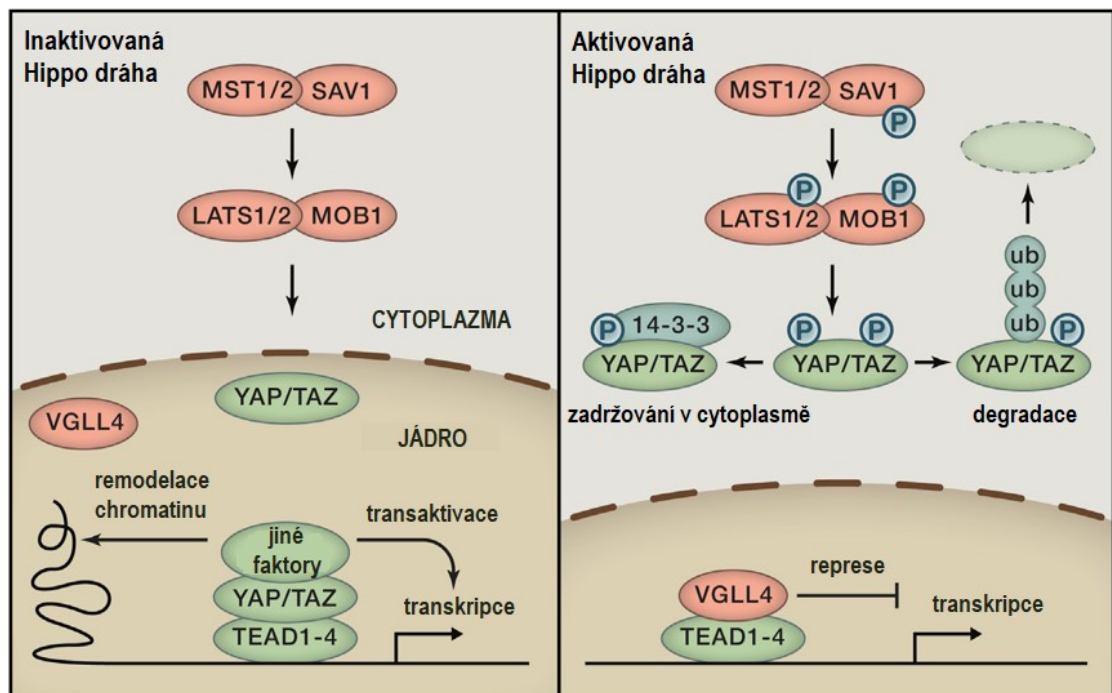
TEAD proteiny se v dnešní době stávají zajímavým cílem pro vývoj nových léčiv proti nádorovému bujení. Vzhledem k tomu, že je míra jejich exprese nejvyšší během vývoje organismu a v dospělosti jejich zvýšená produkce zapříčiňuje vznik nádorových onemocnění, dá se předpokládat, že by inhibitory těchto transkripčních faktorů měly mít jen minimum vedlejších účinků. Dosavadní studie se zabývají nejrůznějšími modifikacemi a blokacemi vzniku transkripčně aktivního YAP/TAZ-TEAD komplexu.

Důležitou roli při regulaci buněčného růstu, proliferaci a vývoji orgánů hraje tzv. Hippo signalizační dráha. Tato transkripční signální dráha byla poprvé identifikována v organismu

Drosophila a pojmenována po proteinu Hippo (Hpo). Mutace tohoto proteinu způsobovala poruchu fenotypu, konkrétně ztmavnutí, zvětšení a zrohovatění hlav drosophil, což připomínalo hrocha⁵⁸.

Hippo signální dráha je velmi evolučně konzervovaná, proto u savců nalezneme obdobné komponenty, jako jsou u drosophily. Homologem zmíněného Hpo je MST1/2 (z anglického „Mammalian sterile 20-like 1/2“). Mezi další proteiny tvořící kinasovou kaskádu jádra Hippo dráhy (viz Obr. 11) patří SAV1 (Salvador), LATS1/2 (z anglického „Large tumor suppressor homolog 1/2“) a v neposlední řadě MOB1A/B (MOBkinasový aktivátor 1A/B). Na čtyři zmíněné komponenty dráhy navazuje koaktivátor YAP nebo TAZ, který se váže přímo na TEAD⁶⁰.

Podobně jako je tomu u drosophily, je Hippo signální dráha i u savců považována za nádor-supresorovou dráhu, která je regulována především kaskádou proteinkinás závislých na fosforylaci. Signální dráha může být aktivována nejrůznějšími signály. Aktivovaná MST1/2 dále fosforyluje a aktivuje kinasu LATS1/2, MOB1A/B a SAV1. MST1/2 dále interaguje se SAV1, čímž zvyšuje svou kinasovou aktivitu k interakci a fosforylaci LATS1/2. Po navázání MOB1 dosáhne LATS1/2 plné aktivace a následně fosforyluje YAP nebo TAZ, čímž ho inaktivuje^{17,59,60}. V závislosti na místě fosforylace YAP (nebo TAZ) pak může být koaktivátor buď zadržován v cytoplasmě ve vazbě na protein 14-3-3 (fosforylace S127 YAP proteinu) nebo degradován pomocí ubikvitinace v proteasomu (fosforylace S381)^{40,61}. Nedojde tedy k translokaci YAP do jádra a nasednutí na transkripční faktor TEAD; na ten nasedá protein VGLL4, přítomný v jádře, který slouží jako represor transkripce cílového genu⁴³.



Obr. 11 Jádro Hippo signální dráhy: Inaktivovaná (vlevo) – dochází k iniciaci transkripce; Aktivovaná (vpravo) – nedochází k transkripci. Šípkami je znázorněna posloupnost dějů. Převzato a upraveno⁶⁰.

Pokud je signalizační dráha inaktivována (viz Obr. 11 vlevo), nedochází k fosforylační kaskádě. YAP/TAZ není fosforylován a dojde tedy k jeho translokaci do jádra. Tento mechanismus však ještě nebyl doposud objasněn¹⁷. Zde dochází ke kompetici YAP proteinu s VGLL, kdy YAP vykazuje vyšší afinitu k TEAD proteinu než VGLL, čímž vzniká YAP-TEAD komplex, který aktivuje transkripci daného genu. Komplex TEAD-YAP/TAZ je dále schopný vázat další nejrůznější transkripční faktory, jako je například FoxO1, TBX5, PAXs, SMADs, TP73 nebo RUNX1/2⁶². Tyto transkripční faktory tedy přispívají k regulaci růstu orgánů a buněčné proliferaci.

Hippo signalizační dráhu je tedy možno regulovat řadou nejrůznějších signálů, mezi které může patřit buněčná polarita a adheze. Zde sehrává zásadní roli protein angiomotin (AMOT), který inhibuje YAP nebo TAZ buď přímo vazbou na tento koaktivátor a nebo skrze kinasovou kaskádu aktivací LATS1/2 a MST1/2⁶³. Pomocí kinasové kaskády dokáže fosforylovat koaktivátor YAP a TAZ také protein Merlin nebo neurofibromin 2 (NF2), které přenášejí signály od plazmatické membrány⁶⁴. Dalším regulačním signálem této signalizační dráhy může být mechanotrandukce. V tomto případě dochází vlivem extracelulárního tlaku k aktivaci dráhy skrze nejrůznější proteiny, čímž v konečném důsledku dojde k fosforylaci YAP/TAZ⁶⁵. Na funkci Hippo dráhy má vliv i tzv. druhý posel cyklický monofosfát cAMP, jehož tvorbu pomocí adenylátcyklasy stimuluje G-protein spřažený s receptorem. Tento druhý posel poté aktivuje proteinkinasy A, čímž dojde k inhibici Rho GTPasy, která následně aktivuje (fosforyluje) LATS1/2. Takto aktivovaná LATS1/2 nakonec fosforyluje a tedy inaktivuje YAP⁶⁶. Na fosforylaci koaktivátorů YAP a TAZ má v neposlední řadě vliv také metabolismus glukosy, nebo lépe energetická bilance v buňce. Senzorem energetického stresu v buňce je AMP-aktivační proteinkinasa. Ta prostřednictvím modifikované kinasové kaskády inhibuje YAP fosforylaci na S127, čímž dochází k vazbě na cytoplazmatický protein 14-3-3 a nemožnosti translokace YAP koaktivátoru do jádra⁶⁷.

Jako tumorsupresory lze brát všechny výše zmíněné molekuly, které se podílí ať už přímo či zprostředkovaně na fosforylaci YAP/TAZ; jejich inhibice však může být problematická³⁵.

Prvním vytvořeným antionkogenem, který blokoval vazbu YAP koaktivátoru na TEAD protein, byl transkripční faktor TEAD2 bez DNA vazebné domény. Pro účely výzkumu byly vytvořeny transgenické myši s nadměrnou produkcí zmíněného TEAD2, myši s nadměrnou produkcí lidského YAP koaktivátoru v játrech a myši s produkcí jak daného zkráceného TEAD2, tak YAP proteinu. U myši s nadměrnou expresí YAP byl pozorován nadměrný nárůst tkáně jater s menšími a hustěji natěsnanými hepatocyty. Jaterní tkáň transgenických myši s hyperprodukcí zkráceného TEAD2 i YAP však nevykazovala žádné odchylky od normální tkáně. U těchto myši nedocházelo k nadměrnému růstu tkáně jater ani ke vzniku nádorů. Naopak nadměrná produkce zkráceného TEAD2 u myši bez nadměrné exprese YAP proteinu neovlivnila velikost ani strukturu jejich jater, dokonce ani expresi cílových genů YAP⁶⁸.

Stejná vědecká skupina následně přišla s dalším způsobem blokace vzniku komplexu YAP-TEAD a to pomocí malé molekuly z rodiny porfyrinů – verteporfinu⁶⁸. Verteporfin mění konformaci YAP koaktivátoru vazbou na jeho TEAD vazebnou doménu, čímž zamezuje vzniku komplexu s TEAD proteinem. Později bylo prokázáno, že verteporfin zvyšuje produkci proteinu 14-3-3, který zadržuje YAP v cytoplazmě, kde může na proteasomu dojít k degradaci tohoto koaktivátoru⁶⁹.

Transkripční aktivita TEAD proteinů může být narušena i vazbou tzv. super-TDU, což je část proteinu VGLL4, která je schopná vázat TEAD, inhibovat jeho aktivitu a snížit růst rakoviny žaludku u myši. V jádře buňky dochází ke kompetici super-TDU s YAP koaktivátorem o vazebné místo na TEAD proteinu. Navázáním super-TDU, který se váže s vyšší afinitou než samotný VGLL4, dochází k inhibici tohoto transkripčního faktoru⁷⁰.

Podobným způsobem funguje i uměle vytvořená molekula imitující část proteinu YAP. Jedná se o cyklický peptid tvořený částí TEAD vazebné domény YAP proteinu, který interaguje s TEAD proteinem na vazebném místě 3 (viz Obr. 10, str. 19). Tím dochází k blokaci vazebného místa pro YAP koaktivátor a inhibici funkce TEAD proteinu⁷¹.

V neposlední řadě je zajímavým cílem inhibice TEAD transkripčních faktorů lipidová kapsa, která se nachází v centru YAP vazebné domény těchto proteinů (viz kapitola 1.2.2). Tato hydrofobní kapsa obsahuje palmitát, který je zodpovědný za správné sbalení TEAD proteinů, jejich stabilitu a vazbu s YAP^{31,32}. Místo zmíněného palmitátu se však do této kapsy může vázat jiná malá molekula, např. kyselina flufenamová, která pak zabraňuje navázání YAP koaktivátoru, čímž TEAD inhibuje⁷². Dosavadní studie poukazují na fakt, že v nadcházejících letech se hlavním cílem zájmů regulace Hippo signální dráhy, a tedy i TEAD proteinů, stanou právě malé molekuly vázající se do lipidové kapsy, obdobně jako kyselina flufenamová^{17,35}.

1.3.1.1 Genová regulace řízená afinitou transkripčních faktorů k DNA

Pro pochopení regulace transkripce je nezbytné pochopit závislost míry exprese genu na DNA sekvenci jeho regulační oblasti. Ucelený pohled na tuto problematiku poskytla až studie, jež se zabývala efektivním měřením tisíců navržených a fluorescenčně značených promotorů, u kterých byl posuzován vliv na míru genové exprese pomocí vazebných míst transkripčních faktorů, počtu těchto míst, jejich vzájemné orientaci a afinitě transkripčních faktorů k těmto DNA sekvencím promotorů. Výsledky měření u kvasinek prokázaly závislost míry exprese genů na počtu vazebných míst pro transkripční faktory a také na vzdálenosti těchto míst od začátku genu. Dále byla také potvrzena specifická afinita transkripčních faktorů k daným DNA sekvencím a závislost míry afinity transkripčních faktorů k DNA na sekvenci DNA v blízkém okolí vazebného motivu⁷³.

Naopak jiná vědecká studie se zabývala rozdíly specifické afinity promotorů v MYC-dependentní genové regulaci. Byla objevena další vazebná místo pro MYC, do kterých se však

tento transkripční faktor váže s nižší afinitou. Tato slabší vazebná místa mohou fungovat dvojitým způsobem. V prvním případě, tzv. specifickém modelu, kdy mají MYC-dependentní geny pouze tato slabá vazebná místa, jsou geny aktivovány pouze vysokou koncentrací faktoru MYC. Je tomu tak proto, že nejprve dojde k obsazení míst jiných MYC-dependentních genů, v jejichž regulační oblasti se vyskytují vazebná místa s vyšší afinitou. Poté, pokud se faktor naváže na tato silná vazebná místa, může dojít k navázání MYC proteinu do oněch míst se slabší afinitou. V druhém případě geny obsahují jak tato slabá vazebná místa, tak i ta silná, tedy s vyšší afinitou. Zde poté dochází ke kvantitativní regulaci transkripce daného genu. Při nízkých koncentracích genu dochází k preferenčnímu navázání do míst s vysokou afinitou a gen je poté aktivován pouze slabě. Při vyšších koncentracích dochází obdobně jako v prvním případě k navázání do míst s nižší afinitou, čímž se aktivita genu zvyšuje. V druhém případě tedy mluvíme o tzv. modelu zesilovače⁷⁴.

Aktivita transkripčních faktorů může záviset také na množství a rozložení vazebných motivů v promotoru genu, popřípadě sekvenci, která se nachází v blízkosti těchto motivů. Tato problematika ovšem nebyla dosud u TEAD transkripčních faktorů zkoumána. Je však známo, že v některých promotorových oblastech genů je přítomno více vazebných motivů TEAD proteinů než v jiných. Dalo by se tedy předpokládat, že geny s vyšší frekvencí zmíněných motivů v promotorech budou TEAD transkripčními faktory přepisovány přednostně, oproti genům obsahující motivů méně. Příkladem může být první objevený cílový gen TEAD proteinů CTGF, jehož promotorová oblast obsahuje více vazebných motivů pro transkripční faktory TEAD^{11,44}.

2 Cíle práce

- Nalezení vhodných podmínek pro rekombinantní přípravu prodloužené DNA vazebné domény transkripčního faktoru TEAD1 (TEAD1-DBD)
- Expres a purifikace požadovaného proteinu v expresním systému *Escherichia coli*
- Ověření schopnosti připraveného proteinu vázat DNA

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy ML 104/01
Mettler Toledo, ČR
- Automatické pipety
Gilson, USA
Thermo Scientific, USA
Mettler Toledo, Švýcarsko
- Centrifuga (ultra) Avanti J-26 XP
Beckman Coulter, USA
- Centrifuga 5920R (výměnné rotory)
Eppendorf, Německo
- Centrifuga (stolní) Mini spin
Eppendorf, Německo
- Fotodokumentační box ChemiDoc MP
Bio-Rad, USA
- Universal Hood III
- Hmotnostní spektrometr Solerix XR
Bruker Daltonics, Německo
- Chromatografický systém NGC Quest 10
Bio-Rad, USA
- Kolona ENrich SEC 70 10 x 300 mm
Bio-Rad, USA
- Koncentrátory Ultra-4 Centrifugal Filters
(15 ml, 3000 MWCO a 4 ml, 10000 MWCO)
Merck, Německo
- Magnetická míchačka C-MAG HS 10 digital
Ika, Německo
- Membránové filtry (0,45 µm)
Merck, Německo
- Nosič Talon Superflow Metal Affinity Resin
Takara Bio, USA
- pH elektroda InLab Expert
Mettler Toledo, Švýcarsko
- pH metr Orion Star A111
Thermo Scientific, USA
- Předvážky HF-1200G
AND, USA
- Peristaltická pumpa Econo gradient pump
Bio-Rad, USA
- Souprava pro NATIVE PAGE SE250/SE260
Hoefer, USA
- Souprava pro SDS PAGE
Bio-Rad, USA
- Spektrofotometrický detektor LCD 5000
Ingos, ČR
- Spektrometr DeNovix DS-11 FX+
DeNovix, USA
- Stříkačka
Hamilton, USA
- Termostat s třepačkou Thermomixer comfort
Eppendorf, Německo
- Termostat
Pol-eko, Polsko
- Třepačka Multitron Pro
Biotrade, ČR
- Ultrazvukový homogenizátor UP200S
Hielscher, Německo
- Vortex MS 3 digital
Ika, Německo
- Zapisovač CR-200
Beckman, USA

- Zdroj napětí MP-250V Cleaver Scientific, UK

3.2 Chemikálie a enzymy

- 1,4-dithiothreitol (DTT) Sigma-Aldrich, USA
- 1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED) Sigma-Aldrich, USA
- 2-merkptoethanol Sigma-Aldrich, USA
- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina (HEPES) Sigma-Aldrich, USA
- Agar Oxoid, UK
- Akrylamid Serva, Německo
- Bromfenolová modř Serva, Německo
- Boritá kyselina Merck, Německo
- Comassie Brilliant Blue R-250 VWR International, USA
- Dihydrogenfosforečnan draselný Lach-Ner, ČR
- Dodecylsírán sodný (SDS) Avantor, USA
- Ethanol VWR International, USA
- Extrakt z kvasnic VWR International, USA
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) Serva, Německo
- GelRed barvivo Biotium, USA
- Glycin Sigma-Aldrich, USA
- Chloramfenikol Jersey Lab Supply, USA
- Chlorid kobaltnatý hexahdrát VWR International, USA
- Chlorid sodný Lach-Ner, ČR
- Imidazol Fluka chemika, Švýcarsko
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) VWR International, USA
- Kanamycin Serva, Německo
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) VWR International, USA
- Kyselina octová VWR International, USA
- Leupeptin VWR International, USA
- Methanol Lach-Ner, ČR
- *N,N*-metylen-bis-akrylamid Sigma-Aldrich, USA
- Peroxodisírán amonný (APS) VWR International, USA
- Pre-Stained Protein Standard SeeBlue™ Plus2 Invitrogen, USA
- Precision Plus Protein™ Unstained Standards Bio-Rad, USA
- Thrombin EMD Millipore Corp, USA

- Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) VWR International, USA
- Tris Lach-Ner, ČR
- Trypton Oxoid, UK
- Voda (LC/MS čistota) EMD Millipore Corp, USA

3.3 Bakteriální kmeny

- *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Stratagene, USA
Genotyp: F- *ompT hsdS*(_{TB-} _{MB-}) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU proL Cam*_r] [*argU ileY leuW* Strep/Spec_r]

3.4 Vektory a oligonukleotidy

- pET-28a(+)-TEAD1-DBD Generey, Čína
vloženo mezi místo EcoRI a NdeI
- *CTGF*-f (5'-AGT CAC ATT CCT CCG-3')
- *CTGF*-r (5'-CGG AGG AAT GTG ACT-3')
- *GLUT1* -f (5'-TTG CCT TAC AGC CGG-3')
- *GLUT1* -r (5'-CCG GCT GTA AGG CAA-3')

3.5 Roztoky, pufrы a média

- Akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%)
70 % (v/v) H₂O, 29 % (w/v) akrylamidu, 1 % (w/v) N,N-methylen-bis-akrylamidu
- Barvicí roztok pro SDS-PAGE gely
45 % (v/v) methanolu, 10 % (v/v) kyseliny octové, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- Ekvilibrační pufr (afinitní chromatografie)
25mM dihydrogenfosforečnan draselný, 1mM 2-merkaptoethanol, 0,5M chlorid sodný, pH 7,0, přefiltrováno
- Eluční pufr (afinitní chromatografie)
Ekvilibrační pufr, 0,5M imidazol, pH 7,0, přefiltrováno
- HEPES pufr (gelová chromatografie)
20mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM TCEP, pH 7,0, přefiltrováno
- LB agar
1,25 % (w/v) agaru v LB médiu, sterilizováno

- LB médium
1 % (w/v) tryptonu, 0,5 % (w/v) extraktu z kvasnic, 1 % (w/v) chloridu sodného, pH 7,4, sterilizováno
- Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely
55 % (v/v) H₂O, 35 % (v/v) ethanolu, 10 % (v/v) kyseliny octové
- Promývací pufr (afinitní chromatografie)
Ekvilibrační pufr, 30mM imidazol, pH 7, přefiltrováno
- TBE pufr 10× koncentrovaný
0,89M Tris, 0,89M boritá kyselina, 0,02M EDTA, pH 8,3
- Tris-Glycin SDS pufr
Komerční výrobek firmy Bio-Rad, USA
- Vzorkový pufr pro nativní elektroforézu neredukující
10mM Tris, 0,03 % (w/v) bromfenolové modře, 60 % (v/v) glycerolu, 60mM EDTA, pH 7,6
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 2× koncentrovaný redukující
50mM Tris, 12 % (v/v) glycerolu, 4 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) bromfenolové modře, 100mM DTT, pH 6,8

4 Metody

4.1 Produkce proteinu TEAD1-DBD

4.1.1 Transformace kompetentních buněk plasmidem

Pro produkci prodloužené TEA DNA vazebné domény proteinu TEAD1 (dále jen TEAD1-DBD: viz Obr. 12, str. 39) byl použit kmen bakterie *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL.

Tyto produkční buňky byly nejprve transformovány metodou tepelného šoku plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD, který obsahoval gen pro TEAD1-DBD vložený mezi restriční místa pro endonukleasy *NdeI* a *EcoRI*. Kromě zmíněné DNA vazebné domény se v plasmidu nacházela také sekvence kódující rezistenci na antibiotika kanamycin a chloramfenikol, histidinovou kotvu, lac operon nebo štěpné místo pro thrombin.

Produkční buňky dlouhodobě uchovávané při -80 °C byly ponechány rozmraznout na ledě a ke 100 µl této buněčné suspenze bylo přidáno 0,5 µl plasmidu o koncentraci 20,6 µg/µl. Po 20minutové inkubaci na ledu byl proveden 45s tepelný šok při teplotě 42 °C. Poté byly buňky přeneseny opět na led, přidán 1 ml sterilního LB média bez antibiotik a buňky byly 1 h inkubovány v termomixeru (550 rpm) při 37 °C. Takto vzniklá buněčná suspenze byla centrifugována na stolní centrifuze 5 min při 1000× g, následně z ní bylo odebráno 600 µl supernatanu a ve zbytku resuspendována bakteriální peleta. Na Petriho misku s LB agarem obsahujícím antibiotika kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml) bylo rozetřeno 30 µl tohoto buněčného koncentrátu. Misky byly inkubovány 16 h (přes noc) při 37 °C.

4.1.2 Vlastní produkce proteinu TEAD1 DBD

Čtyři zkumavky s 1 ml sterilního LB média s přídatkem kanamycinu (50 µg/ml) a chloramfenikolu (35 µg/ml) byly inokulovány vždy jednou kolonií narostlých bakterií z misky. Tyto noční kultury byly inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C a 250 rpm. Vždy dvě zkumavky s 1 ml LB média obsahujícím kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml) byly inokulovány 10 µl z každé noční kultury. Celkem 8 zkumavek se vzorky bylo ponecháno třepat 2 h při 37 °C a 250 rpm. Poté bylo do 4 zkumavek (vždy jedné z každé kolonie) přidáno 1M IPTG tak, aby byla jeho výsledná koncentrace ve zkumavce 0,5 mM. Zbylé zkumavky nebyly indukovány. Všech 8 zkumavek bylo opět umístěno na třepačku a inkubovány při 37 °C a 250 rpm 2 h.

Po inkubaci byly kultury centrifugovány 10 min při 1000× g a vzniklá peleta resuspendována ve 100 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Vzniklé vzorky byly elektroforeticky analyzovány v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.

4.1.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Pro elektroforetickou separaci byl připraven gel skládající se z 15% separačního a 5% zaostřovacího polyakrylamidového gelu (viz Tab. 1). Vzorky byly zahřáty na teplotu 95 °C po dobu 5 min a následně centrifugovány 10 min při 5000× g na stolní centrifuze. Do jamek gelu bylo nanášeno 5 µl proteinového standardu a 10 µl od každého vzorku. Elektroforéza probíhala nejprve při konstantním proudu 15 mA na gel (o rozměrech 8,5×7,5×0,1 cm, složení viz Tab. 1) v prostředí Tris-Glycin SDS pufru, a poté, po zaputování vzorků do separačního gelu, byla tato hodnota zvýšena na 25 mA.

Tab. 1 Složení separačního a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE (na 5 ml)

Složka	Objem složek (ml)	
	15% Separací gel	5% Zaostřovací gel
H ₂ O	1,1	0,68
30% Akrylamidová směs	2,5	0,17
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	-
1M Tris (pH 6,8)	-	0,13
10% Dodecylsírán sodný (SDS)	0,05	0,01
10% Peroxodisírán amonný (APS)	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

Po proběhnutí elektroforézy (cca 50 min) byla provedena vizualizace separovaných proteinů obarvením pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue po dobu 10 min a následným odbarvením pozadí, tedy míst gelu, která neobsahují protein, v odbarvovacím roztoku. Takto připravený gel byl následně vyfocen ve fotodokumentačním boxu. Nakonec byly gely umístěny do 1% kyseliny octové, ve které byly dlouhodobě uchovávány.

4.2 Výběr vhodných podmínek produkce

Postupem stejným jako v kapitole 4.1.1 byly připraveny kolonie buněk na miskách a následně vytvořeny noční kultury inokulací 1 kolonie buněk do 100 ml sterilního LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a chloramfenikolem (35 µg/ml). Tyto noční kultury byly inkubovány 16 h při teplotě 37°C a 250 rpm.

4.2.1 Koncentrace induktoru IPTG

Do 14 zkumavek bylo k 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky inokulováno vždy 5 µl noční kultury. Po 2 h třepání při 37 °C a 250 rpm byl ke každému vzorku přidán příslušný objem

1M IPTG tak, aby jednotlivé zkumavky obsahovaly dané koncentrace IPTG v rozmezí od 0 do 1,0 mM. Po indukci byly buněčné kultury inkubovány při 37 °C a 220 rpm 2 h. Po inkubaci byly kultury centrifugovány 10 min při 1000× g a vzniklá bakteriální peleta resuspendována ve 100 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Vzniklé vzorky byly elektroforeticky analyzovány obdobně jako v kapitole 4.1.3.

4.2.2 Doba produkce

Podobně jako u optimalizace koncentrace induktoru v předchozí kapitole, bylo i zde inokulováno 14 zkumavek s 1 ml LB média a antibiotiky 5 µl noční kultury. Po 2 h třepání při 37 °C a 250 rpm bylo ke každému vzorku přidáno 1M IPTG tak, aby jeho výsledná koncentrace ve zkumavce činila 0,5 mM. Následně byly vzorky umístěny na třepačku a inkubovány požadovanou dobu v rozmezí 0 až 24 h při teplotě 37 °C a 220 rpm, přičemž kontrolní vzorek byl po indukci ihned centrifugován 10 min při 1000× g a vzniklá bakteriální peleta resuspendována ve 100 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Ostatní vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny stejným způsobem jako kontrolní vzorek. Všechny vzorky byly poté elektroforeticky analyzovány obdobně jako v kapitole 4.1.3.

4.2.3 Teplota produkce

Obdobně jako u výše zmíněných pokusů bylo do 6 zkumavek s 1 ml daného LB média inokulováno 5 µl noční kultury transformovaných bakteriálních buněk. Zkumavky byly třepány 2 h při 37 °C a 250 rpm. Poté bylo ke každému vzorku ve zkumavce přidáno 1M IPTG tak, aby jeho výsledná koncentrace ve zkumavce činila 0,5 mM. Inkubace vzorků probíhala po dobu 2 h při daných teplotách v rozmezí od 20 do 37 °C, přičemž příprava vzorků pro SDS elektroforézu a další následné operace probíhaly stejně jako v kapitole 4.2.1.

4.3 Purifikace

4.3.1 Velkoobjemová produkce DNA vazebné domény proteinu TEAD1

Produkční buňky *E. coli* byly transformovány plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD obdobně jako v kapitole 4.1.1 a následně byla připravena noční kultura opět stejně, jako v kapitole 4.2.

Do čtyř dvoulitrových Erlenmeyerových baněk s 500 ml LB média obsahujícího kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml), bylo inokulováno 5 ml roztoku buněk z noční kultury. Baňky pak byly třepány rychlostí 250 rpm při 37 °C. Během inkubace byla měřena hodnota optické

denzity buněčné suspenze, a to spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. Jakmile optická denzita dosáhla hodnoty 0,6, byla každá baňka indukována přidáním 50 μ l 1M IPTG tak, že konečná koncentrace induktoru pak činila 0,1 mM. Po indukci byly roztoky vráceny zpět na třepačku a ponechány inkubovat 6 h při 37 °C a 250 rpm. Nakonec byly bakteriální kultury centrifugovány 15 min na ultracentrifuze při 3000 \times g a 4 °C.

4.3.2 Izolace proteinů z produkční kultury bakterií

Pelety po centrifugaci byly resuspendovány v celkovém objemu 80 ml ekvilibračního pufru, přelity do čtyř 50ml falkon a lyzovány sonikací na ledě. Při sonikaci bylo nastaveno pulzování na 0,75 s amplitudou 0,8. Sonikace každé falkony probíhala 4 minuty a po každém časovém intervalu byla sonikační sonda předána do následující falkony. Tento cyklus byl opakován celkem 3krát. Po sonikaci byl bakteriální lyzát centrifugován 30 min opět na ultracentrifuze při 40000 \times g a 4 °C. Ihned poté byl supernatant přemístěn do jiné nádoby chlazené ledem a připraven k nanesení na kolonu. Z pelety po centrifugaci byl odebrán vzorek a resuspendován ve 100 μ l 1 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu (viz kapitola 4.1.3).

4.3.3 Afinitní chromatografie

Součástí plasmidu pET-28a(+)-TEAD1-DBD je také sekvence pro histidinovou kotvu. Proto je možné využít k purifikaci DNA vazebné domény proteinu TEAD1 afinitní chromatografii.

Kolona s nosičem Talon byla nejprve promyta 50 ml 0,2M EDTA, čímž došlo k vyvázání kobaltnatých iontů. Následně byla kolona promyta 50 ml destilované vody a poté 50 ml roztoku Co^{2+} , čímž došlo k jejímu opětovnému nabití. Zbylý nenavázaný Co^{2+} byl z kolony vymyt 50 ml destilované vody.

Takto nabitá kolona byla posléze promyta ekvilibračním pufrem (50 ml), následovala aplikace chlazeného buněčného lyzátu a poté promývání ekvilibračním pufrem. Během promývání byla detektorem měřena absorbance při 280 nm roztoku vycházejícího z kolony. Jakmile absorbance klesla zpět na nulu, byl zapnut zapisovač, jímž byla vizualizována eluční křivka. Proteiny zachycené na koloně byly promyty promývacím pufrem s 30mM obsahem imidazolu a promývání tímto pufrem probíhalo tak dlouho, dokud se absorbance opět neustálila. Poté byl promývací pufr vyměněn za eluční pufr s 0,5M imidazolem a opět probíhalo promývání kolony do ustálení absorbance. Průtok mobilní fáze kolonou byl po celou dobu konstantní (1 ml/min).

Od nanášení lyzátu na kolonu probíhalo sbírání jednotlivých frakcí, ze kterých byly posléze odebírány 10 μ l vzorky, ke kterým bylo přidáváno 10 μ l 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu (postup stejný jako v kapitole 4.1.3).

4.3.4 Odštěpení histidinové kotvy thrombinem

U frakcí z afinitní chromatografie, které obsahovaly protein TEAD1-DBD, byla spektrofotometricky měřena absorbance při 280 nm. Ke štěpení histidinové kotvy bylo k proteinu přidáno takové množství thrombinu, aby byla jeho aktivita 1 U/mg proteinu. Roztok byl následně 4krát naředěn HEPES pufrům. Štěpení probíhalo 18 h při 4 °C. Ze směsi bylo odebráno 10 µl roztoku a k němu přidáno 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu (viz kapitola 4.1.3).

4.3.5 Gelová permeační chromatografie

Posledním krokem purifikace, kdy byla DNA vazebná doména TEAD1 proteinu oddělena od zbývajících bakteriálních proteinů a odštěpené histidinové kotvy, byla gelová permeační chromatografie pomocí kolony ENrich SEC 70 10 x 300 mm.

Roztok proteinu TEAD1-DBD po štěpení thrombinem byl nejprve koncentrován v 15ml centrifugačním koncentrátoru s membránou o 3000 Da na celkový objem 900 µl. Koncentrování probíhalo na chlazené centrifuze při 3500× g a 4 °C dokud nebylo dosaženo požadovaného objemu.

Před nanášením vzorku na kolonu byl nejprve celý chromatografický systém i s kolonou promyt pufrům HEPES (50 ml). Následně byl pomocí stříkačky nanesen vzorek a při konstantním průtoku 0,5 ml/min jímány frakce nejprve po 5 ml a po překročení hodnoty absorbance 30 mAU frakce o objemu 1 ml. Z vybraných 1ml frakcí (frakce 2 – 8 viz Obr. 19, str. 44) byly následně odebrány 10µl vzorky a smíseny s 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu, která byla provedena stejně jako v kapitole 4.1.3.

4.3.6 Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu

Před analýzou a určením přesné hmotnosti proteinů ve vzorku pomocí hmotnostního spektrometru v uspořádání ESI-FT-ICR byly vybrané frakce s TEAD1-DBD nejprve odsoleny a poté okyseleny přidáním 0,5% kyseliny mravenčí. Přípravu vzorků před měřením i vlastní měření uskutečnila Mgr. Růžena Lišková.

4.4 Ověření schopnosti TEAD1-DBD vázat dvouřetězcovou DNA

4.4.1 Příprava dvouřetězcové DNA

Ze zásobních roztoků oligonukleotidů o koncentracích 1 mM byly připraveny roztoky dsDNA smícháním přímého oligonukleotidu se zpětným v poměru 1:1. Takto vzniklá směs byla zahřáta na 95 °C po dobu 5 min a následně ponechána postupně chladnout při pokojové teplotě.

4.4.2 Vytvoření komplexů (TEAD1-DBD)-DNA a příprava vzorků pro nativní elektroforézu

K ověření DNA vazebné schopnosti produkovaného proteinu TEAD1-DBD byly použity oligonukleotidy pocházející z regulačních oblastí lidských genů *CTGF* a *GLUT1*. Z roztoků ssDNA i dsDNA obou oligonukleotidů byly připraveny vzorky o celkovém objemu 10 μ l pro nativní elektroforézu. Jejich složení obsahuje tabulka 2.

Tab. 2 Složení vzorků ssDNA a dsDNA oligonukleotidů CTGF a GLUT1 pro nativní elektroforézu. Příprava přímé (f) a vratné (r) ssDNA pro oba oligonukleotidy je stejná.

Složka	Objem složek (μ l)	
	ssDNA (f i r)	dsDNA
1mM oligonukleotid	1,2	-
500 μ M dvoušroubovice	-	2,4
HEPES pufr	8,8	7,6
vzorkový pufr	2	2

Koncentrace roztoku TEAD1-DBD, získaného z frakce gelové permeační chromatografie obsahující tento protein, byla upravena ředěním pomocí HEPES pufru na konečnou koncentraci 100 μ M. Tento roztok proteinu byl následně použit pro míšení s dsDNA.

K roztokům proteinu o koncentraci 100 μ M byly přidány příslušné objemy připravených dsDNA tak, aby vznikly směsi s koncentrací proteinu TEAD1-DBD 10 μ M a koncentracemi 1; 3; 5; 10; 20 a 40 μ M příslušné DNA. Objemy jednotlivých komponent jsou znázorněny v tabulce 3. Z takto připravených směsí komplexů byly vytvořeny vzorky přidáním 2 μ l vzorkového pufru pro nativní elektroforézu.

Tab. 3 Objemy jednotlivých složek směsí komplexů TEAD1-DBD s DNA (CTGF nebo GLUT1)

Složka	Objem složek (μl)					
	1μM DNA	3μM DNA	5μM DNA	10μM DNA	20μM DNA	40μM DNA
10μM DNA	1	3	5	-	-	-
100μM DNA	-	-	-	1	2	4
100μM protein	1	1	1	1	1	1
HEPES pufr	8	6	4	8	7	5

4.4.3 Nativní elektroforéza

Objemy jednotlivých složek gelu pro nativní elektroforézu jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4 Složení gelu pro nativní elektroforézu – objemy složek jsou uvedeny pro jeden gel o objemu 10 ml

Složka	Objem složek (ml)
H ₂ O	5
30% Akrylamidová směs	4
10× TBE	1
10% Peroxodisíran amonný (APS)	0,08
TEMED	0,008

Do jamek gelu bylo opatrně aplikováno 12 μl od každého vzorku komplexů (TEAD1-DBD s dsDNA *CTGF*) a 6 μl od jednotlivých ssDNA a dsDNA *CTGF* a samostatného proteinu. Obdobně byly aplikovány vzorky na druhý gel pro *GLUT1*.

Immediately po aplikaci vzorků byla spuštěna elektroforéza, která za neustálého chlazení průtokem vody aparaturou probíhala při konstantním napětí 100 V (50 V na jeden gel o rozměrech 8,5×7,5×0,15 cm) v prostředí 1× koncentrovaného TBE pufru. Elektroforéza byla ukončena, jakmile barva vzorkového pufru doputovala zhruba do 2/3 délky gelu.

4.4.4 Specifické barvení nukleových kyselin a proteinů

K barvení nukleových kyselin v gelech připravených v kapitole 4.4.3 bylo užito barvy s obchodním názvem GelRed. Požadovaná koncentrace barvy byla připravena naředěním 15 μl této barvy 50 ml destilované vody. Do takto vzniklé lázně byly umístěny oba dva gely a barveny po dobu 1 h. Neprodleně poté byly gely z lázně vyndány a foceny ve fotodokumentačním boxu pod UV světlem při 312 nm.

Pro indikaci proteinu v gelu bylo následně použito barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue po dobu 10 min s následným odbarvením pozadí (nespecificky obarvených míst gelu bez přítomnosti proteinu) v odbarvovacím roztoku. Takto připravený gel byl opět vyfocen ve fotodokumentačním boxu.

5 Výsledky

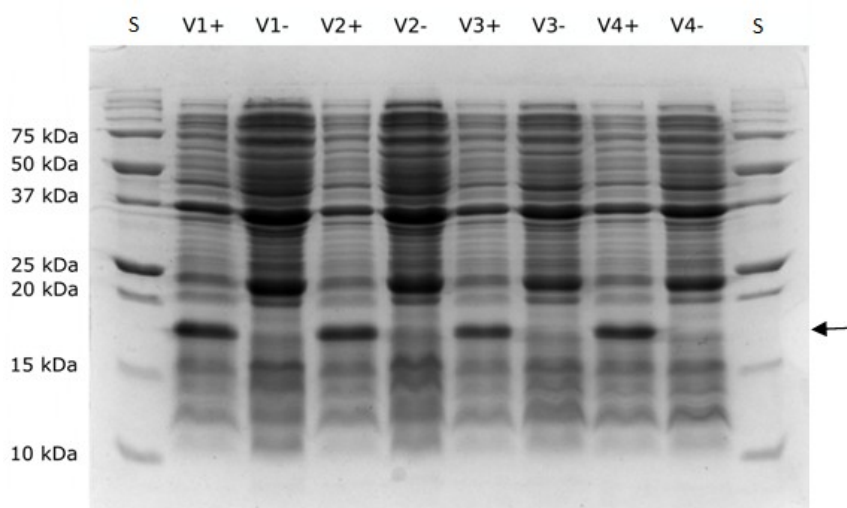
5.1 Test produkce proteinu TEAD1-DBD

Bakteriální buňky kmene *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL byly transformovány plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD, který obsahoval insert kódující prodlouženou DNA vazebnou doménu proteinu TEAD1 s polyhistidinovou kotvou před N-koncem vlastní TEAD1-DBD (viz Obr. 12). Mezi zmíněnou kotvou a vlastním produkovaným proteinem se nachází sekvence specificky rozpoznávaná a následně štěpená thrombinem. Produkci vloženého genu je možné indukovat přidáním IPTG.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSADKPID₂₈NDAEGWSPDIEQSFQEALAIYPPCGRRKIILSDEGK
MYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKSRD₁₀₄FHSKLDQTAQDKALQHMAAMSSAQI
VSATAIHNKLGIPRPTFPGAPGFWPG₁₅₉

Obr. 12 Primární sekvence kódovaná expresním plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD. Černě je vyznačen zbytek bakteriálního plasmidu, oranžově polyhistidinová kotva, růžově sekvence rozpoznávaná thrombinem a podtrženě štěpný produkt thrombinu. Sekvence prodloužené DNA vazebné domény (TEAD1-DBD) je zde obarvena modře, přičemž vlastní DNA vazebná doména TEAD1 proteinu je zvýrazněna tučně. Dolní číselné indexy označují pořadí aminokyseliny v sekvenci TEAD1.

Ze čtyř transformovaných bakteriálních kolonií byly připraveny noční kultury. Z nočních kultur byla pak každá kolonie inokulována do dvou zkumavek s LB médií a antibiotiky, přičemž vzorky, které byly indukovány k expresi proteinu přidavkem IPTG, byly označeny symbolem +, a ty vzorky, jež induktorem aktivovány nebyly, symbolem -. Lyzáty těchto kultur byly po expresi proteinu analyzovány elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.



Obr. 13 Test produkce proteinu TEAD-DBD: SDS-PAGE gel. Písmenem S je označen proteinový standard, zkratkou V1-V4 vzorky jednotlivých kolonií bakterií, přičemž symbol + označuje bakterie indukované IPTG a symbol - neindukované kultury. Relativní molekulová hmotnost konstruktů TEAD1-DBD s polyhistidinovou kotvou činí přibližně 17,6 kDa. Poloha proužku tohoto konstruktů je označena šipkou.

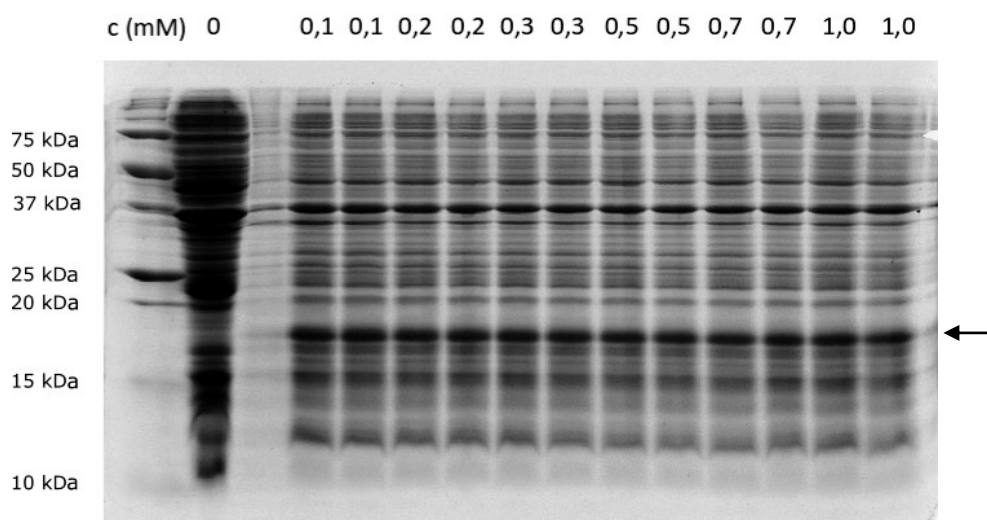
Z výsledků této elektroforetické analýzy vyplývá, že u indukovaných kultur dochází k výrazné produkci TEAD1-DBD s polyhistidinovou kotvou (viz šipka v Obr. 13). Předpokládaná relativní molekulová hmotnost konstruktu TEAD1-DBD s polyhistidinovou kotvou je přibližně 17,6 kDa. Proužek produkovaného proteinu tedy odpovídal předpokládané poloze na gelu (mezi proužky proteinového standardu o velikosti 15 a 20 kDa).

5.2 Výběr vhodných podmínek produkce

5.2.1 Koncentrace induktoru IPTG

Podobným způsobem, jako u testu produkce proteinového konstrukt, byla připravena noční kultura inokulováním 1 kolonie transformovaných bakteriálních buněk *E. coli* BL21-CodonPlus (DES)-RIPL, vypěstovaných na Petriho miskách s LB agarem a příslušnými antibiotiky, do 100 ml LB média s příslušnými antibiotiky.

V tomto případě byly testovány koncentrace induktoru IPTG 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7 a 1,0 mM. Vzorky byly na gel nanášeny v biologických duplikátech, a jejich analýza poté probíhala opět pomocí SDS-PAGE (viz Obr. 14). Cílem tohoto testování bylo nalezení vhodných minimálních koncentrací IPTG, při kterých bude docházet k dostatečné produkci požadovaného proteinu.

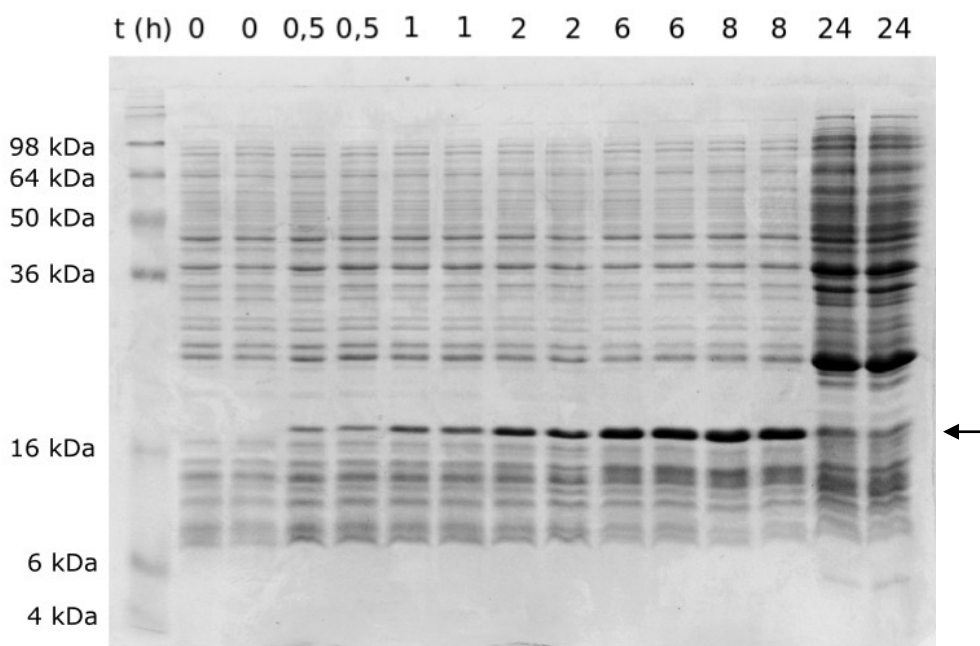


Obr. 14 Optimalizace koncentrace induktoru IPTG: SDS-PAGE gel. V první dráze zleva se nachází proteinový standard. Následující dráhy poté obsahují vzorky se vzestupně rostoucí koncentrací IPTG. Poloha proužku produkovaného proteinového konstrukt je označena šipkou.

Z výsledků vzorků vybraných testovaných koncentrací daného induktoru je vidět, že k produkci TEAD1-DBD je vhodná koncentrace 0,1 mM IPTG.

5.2.2 Doba produkce

Obdobně jako u předešlého postupu (viz kap. 5.2.1), byly v tomto případě testovány doby produkce proteinu TEAD1-DBD. Vyhodnocení produktů produkce proběhlo opět pomocí SDS-PAGE (viz Obr. 15). Na gel byly nanášeny biologické duplikáty vzorků, u kterých probíhala produkce proteinů po dobu 0; 0,5; 1; 2; 6; 8 a 24 h. Cílem tohoto postupu, stejně jako u ostatních, bylo nalézt takové produkční podmínky, při kterých se produkuje nejvíce připravovaného proteinu.

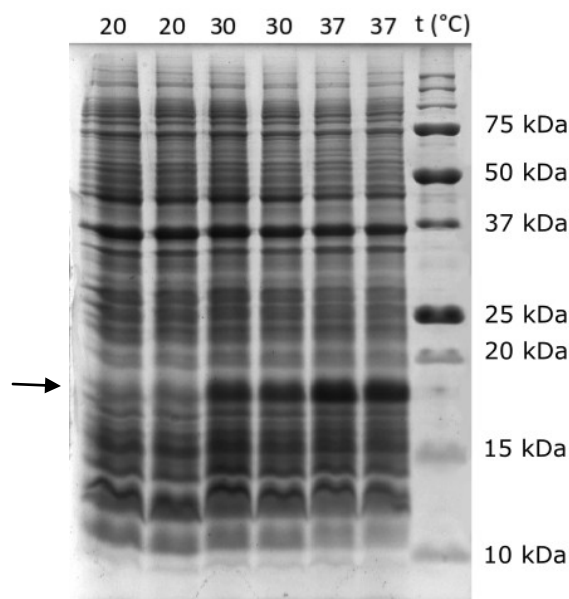


Obr. 15 Optimalizace doby produkce: SDS-PAGE gel. V první dráze zleva se nachází proteinový standard. Následující dráhy poté obsahují vzorky se vzestupně rostoucím časem produkce proteinu. Poloha proužku produkovaného proteinového konstruktů je označena šipkou.

Jak je na první pohled patrné v čase 0, tedy ihned po indukci IPTG, v bakteriálních buňkách k produkci TEAD1-DBD konstruktů nedochází. S rostoucí dobou produkce koncentrace tohoto proteinu postupně narůstá. Nejvýraznější pruh pro protein se nachází v dráhách s časy produkce 6 a 8 h. V dráhách pro 24h produkci je patrné, že se koncentrace proteinu rapidně snížila. Pro další práci s proteinem byla tedy zvolena jako vhodná doba produkce 6 až 8 h.

5.2.3 Teplota produkce

Poslední testovaným parametrem produkce byla její teplota. Testování probíhalo opět stejně jako u předešlých optimalizací s tím rozdílem, že testovanou veličinou byla teplota produkce. Pro produkce byly použity teploty 20, 30 a 37 °C. Výsledky produkce byly analyzovány taktéž pomocí SDS-PAGE (viz Obr. 16) a vzorky byly na gel aplikovány opět v biologických duplikátech.



Obr. 16 Optimalizace teploty produkce: SDS-PAGE gel. Směrem zleva doprava vzestupně narůstá teplota, při které byly vzorky inkubovány. V první dráze zprava se nachází proteinový standard. Poloha proužku produkovaného proteinu je označena šipkou.

Z fotografie gelu je vidět, že nejlepší produkce proteinu probíhala z námi testovaných teplot při teplotě 37 °C, a proto byla právě tato teplota použita v následujících velkoobjemových produkcích.

5.3 Purifikace

Produkce proteinového konstruktu TEAD1-DBD probíhala ve 2 l LB média za optimalizovaných podmínek, tedy při 0,1mM koncentraci induktoru IPTG, teplotě 37 °C po dobu 6 h. Poté byly buňky rozbity sonikací a vzniklý lyzát použit k dalšímu přečištění.

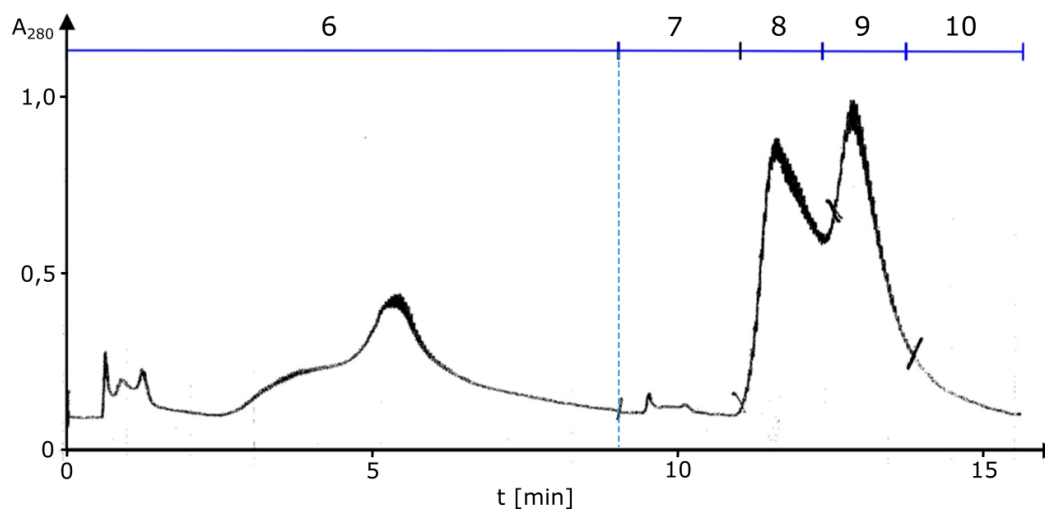
5.3.1 Afinitní chromatografie a odštěpení polyhistidinové kotvy

Na nosič Talon chromatografické kolony se přes Co^{2+} ionty selektivně váží proteiny s polyhistidinovou kotvou. Tyto proteiny je možné později uvolnit pomocí imidazolu, který je vytěsňuje. Této skutečnosti bylo využito při purifikaci proteinového konstruktu TEAD1-DBD.

Proteinový lyzát, vzniklý sonikací produktů produkce, byl získán jako supernatant po ultracentrifugaci. Tento lyzát byl za stálého chlazení ledem aplikován na kolonu a z jeho zbytku byl opět utvořen vzorek pro SDS-PAGE analýzu. Z pelety po ultracentrifugaci byl vytvořen přidáním 100 μl 1 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu vzorek, který byl elektroforeticky analyzován.

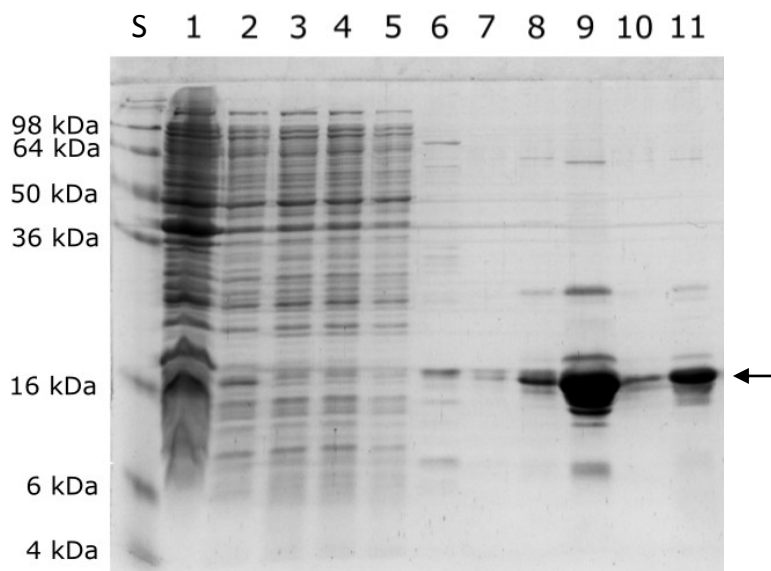
Pomocí zapisovače byl vytvořen záznam průběhu eluce proteinů jednotlivými roztoky (viz Obr. 17): kolona byla nejprve promývána promývacím pufrem s 30mM imidazolem a poté

elučním pufrům s 0,5M imidazolem – výměna pufrů je v obrázku 17 znázorněna modrou přerušovanou čarou. V průběhu celé chromatografie byly sbírány frakce, ze kterých byly vytvořeny vzorky pro SDS-PAGE analýzu proteinů (viz Obr. 18).



Obr. 17 Záznam průběhu eluce proteinů z kolony s nosičem Talon, kde osa x udává časový průběh eluce proteinů v minutách a osa y absorbanci procházejícího roztoku. Číslicemi jsou znázorněny jednotlivé frakce, jejichž vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz Obr. 18) a modrou přerušovanou čarou výměna promývacího pufru za eluční pufr.

K frakci 9, jejíž odezva na detektoru byla nejvyšší, byla přidána proteasa thrombin, která následně odštěpila polyhistidinovou kotvu, čímž vznikl protein TEAD1-DBD. Z tohoto roztoku byl opět odebrán vzorek k SDS-PAGE analýze.



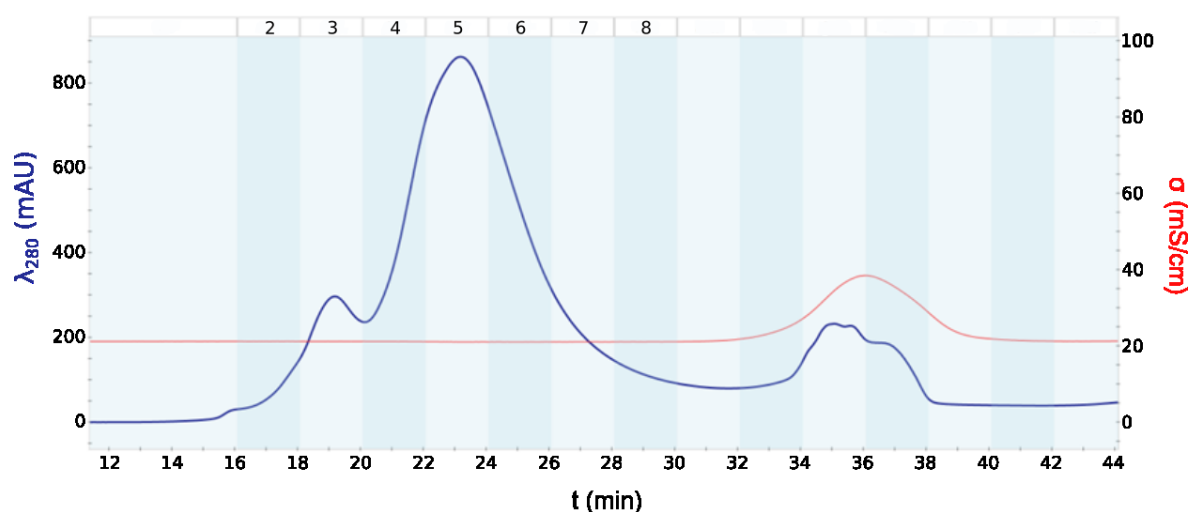
Obr. 18 Průběh afinitní chromatografie: SDS-PAGE gel. S - proteinový standard; 1 - peleta po centrifugaci; 2 - zbytek lyzátu z nanášení na kolonu; 3 a 4 - prošlé frakce, které se nezachytily na koloně; 5 - eluce ekvilibračním pufrům; 6 - eluce promývacím pufrům; 7 - začátek eluce elučním pufrům; 8 - první pík při eluci elučním pufrům; 9 a 10 - eluce proteinu TEAD1-DBD s polyhistidinovou kotvou elučním pufrům; 11 - TEAD1-DBD po odštěpení polyhistidinové kotvy thrombinem. Poloha produkovaného proteinu je označena šipkou.

Na obrázku 18 je vidět, že ve frakcích 3, 4 a 5 se vyskytují proteiny, které byly odděleny od připraveného proteinu, protože se nezachytily na koloně. Frakce 6 obsahovala proteiny, které se sice na koloně zachytily, avšak protože se vážaly s nižší afinitou, byly uvolněny již nízkou koncentrací imidazolu. Díky elučnímu pufru s koncentrací imidazolu 0,5 M docházelo k uvolnění proteinového konstruktu s TEAD1-DBD u vzorků 7 až 10. Nejvyšší koncentraci produkovaného proteinu však obsahovala frakce 9, ke které byl následně přidán thrombin, aby odštěpil polyhistidinovou kotvu od TEAD1-DBD proteinu (primární sekvence viz Obr. 12, str. 39). Frakce 9 byla tedy i po štěpení thrombinem, jak je vidět u vzorku 11, stále znečištěna odštěpenou kotvou, thrombinem a jinými proteiny, a proto bylo přistoupeno k dalšímu purifikačnímu kroku – gelové permeační chromatografii.

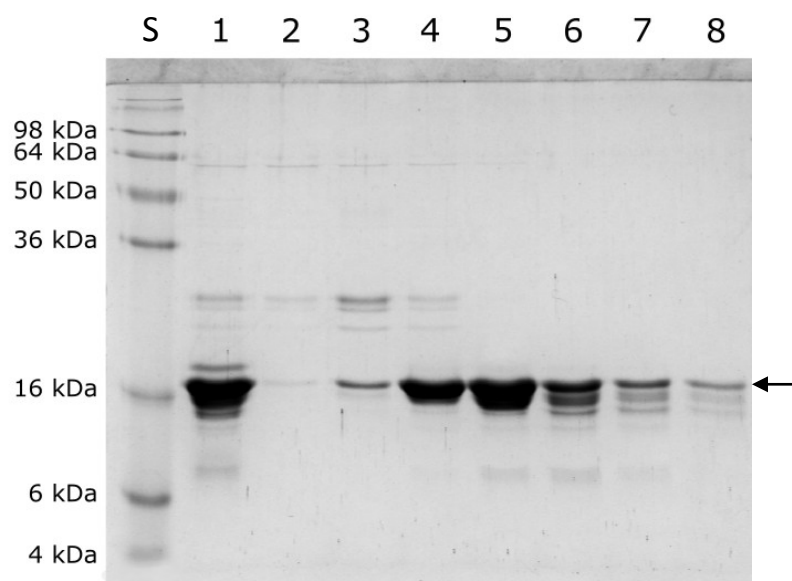
5.3.2 Gelová permeační chromatografie

V posledním purifikačním kroku došlo k oddělení připravovaného TEAD1-DBD od odštěpené polyhistidinové kotvy, thrombinu a zbylých proteinů, které se vyskytovaly ve frakci 9 i po štěpení zmíněnou proteasou, pomocí gelové permeační chromatografie. Pomocí této metody se rozdělují proteiny na základě své velikosti, přičemž největší proteiny se na rozdíl od menších nezadržují v pórech gelu, a proto vycházejí z kolony mezi prvními.

Po štěpení thrombinem byl vzorek neustále chlazen a poté koncentrován. Pomocí stříkačky byla provedena aplikace koncentráту na kolonu a poté online sledován průběh chromatografie (jeho záznam viz Obr. 19). Z tohoto koncentráту byl také vytvořen vzorek pro SDS-PAGE analýzu. Během chromatografie byly zároveň odebírány frakce. Vzorky z nich, analyzované opět pomocí SDS-PAGE, jsou zobrazeny na obrázku 20.



Obr. 19 Záznam průběhu gelové permeační chromatografie. Tmavě modrá křivka značí hodnoty absorbance při vlnové délce 280 nm, červená křivka značí konduktivitu. Čísla 2 až 8 znázorňují jednotlivé 1ml frakce, které byly v průběhu chromatografie sbírány.



Obr. 20 Průběh gelové permeační chromatografie: SDS-PAGE gel. S - proteinový standard; 1 - koncentrát z nanášky na kolonu; 2 až 8 - sebrané frakce okolo maxima eluce proteinu.

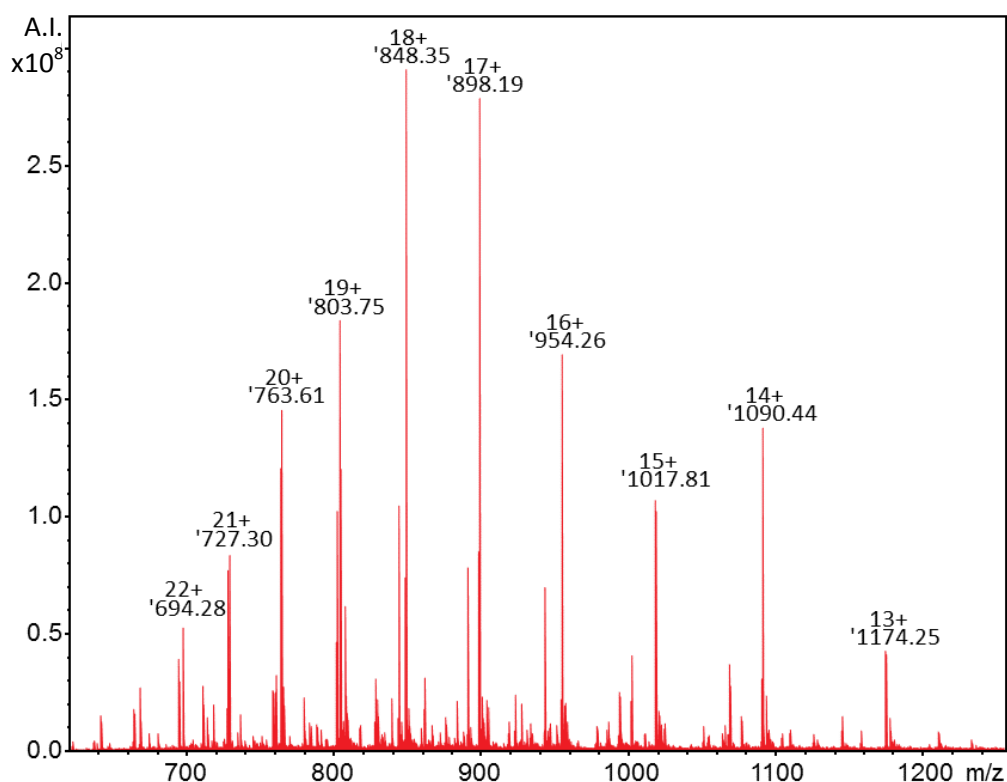
Na obrázku 19 je kromě tmavě modré křivky, reprezentující absorpenci při vlnové délce 280 nm, znázorněna také červená křivka, která zobrazuje konduktivitu roztoku vytékajícího z kolony. Ta narůstá ke konci chromatografické separace, kdy z kolony vycházejí soli. Chromatografická separace probíhala za konstantního průtoku 0,5 ml/min.

V záznamu průběhu eluce v obrázku 19 a z analýzy gelu SDS-PAGE na obrázku 20 je vidět, že frakce 5 obsahuje nejvíce produkovaného proteinu TEAD1-DBD a zároveň nejmenší množství ostatních nečistot (proteinů). Proto byla tato frakce použita pro další operace s proteinem.

TEAD1-DBD se v gelu na obrázku 20 vyskytuje u proteinového standardu nad hodnotou 16 kDa. Vzhledem k tomu, že teoretická relativní molekulová hmotnost tohoto proteinu činí 15 253,00 Da, neodpovídá pozice proužku proteinu v gelu předpokládané hodnotě relativní molekulové hmotnosti. Proto byla pomocí hmotnostní spektrometrie o vysokém rozlišení určena přesná hmotnost identifikovaného proteinu.

5.3.3 Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu

Vzorek frakce 5 získané při gelové permeační chromatografii byl odsolen, okyselen a poté podroben analýze pomocí hmotnostního spektrometru v uspořádání ESI-FT-ICR. Výsledek analýzy je zobrazen v hmotnostním spektru v obrázku 21.



Obr. 21 Hmotnostní spektrum proteinů z frakce 5 z gelové permeační chromatografie. Majoritní nábojové stavy proteinu TEAD1-DBD jsou označeny příslušnou hodnotou m/z. Na ose y je vynesena absolutní intenzita signálu.

Poměry m/z vyznačených signálů spolu se svými nábojovými stavy se shodují s teoretickou monoizotopickou hmotností produkovaného proteinu TEAD1-DBD bez posledních čtyř aminokyselin (viz Obr. 22). Teoretická hmotnost proteinu TEAD1-DBD bez čtyř aminokyselin činí 15 253,00 Da, zatímco hodnota naměřená pomocí hmotnostní spektrometrie 15 253,11 Da. Přítomnost připravovaného proteinu ve frakci 5 byla tedy tímto potvrzena.

GSHMSADKPID₂₈**NDAEGVWSPDIEQSFQEALAIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYIKL**
RTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKSRD₁₀₄FHSKLKDQTA^KDKALQHMAAMSSAQIVSATAIHNK
 LGLPGIPRPTFPGAPGFWPG

Obr. 22: Primární sekvence produkovaného TEAD1-DBD proteinu. Nepodtrženě je označen protein, který byl pomocí hmotnostní spektrometrie nalezen ve frakci 5 sebrané při gelové permeační chromatografii. Tučně je zvýrazněna sekvence TEA domény; podtrženě jsou označeny aminokyseliny, které protein postrádá.

Další píky v hmotnostním spektru v obrázku 21 patří kratším částem TEAD1-DBD. Porovnáním proužků patřících produkovanému proteinu v gelu z frakcí získaných v průběhu gelové permeační chromatografie (viz Obr. 20, str. 45) a píků hmotnostního spektra (viz Obr. 21) plyne, že TEAD1-DBD nestabilní a rozpadá se. Štěpení proteinu však postupuje od nestrukturovaného konce; dokud tedy nedosáhne do strukturované části, nemělo by ovlivnit výsledky budoucích pokusů.

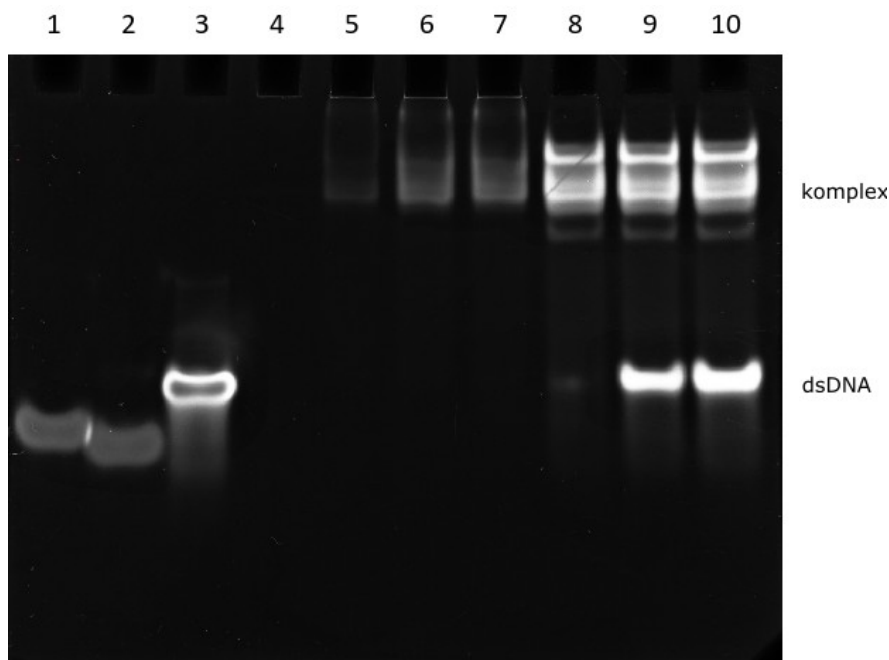
5.4 Ověření schopnosti TEAD1-DBD vázat dvoušroubovici DNA

Vzhledem k tomu, že produkovaným proteinem byla prodloužená DNA vazebná doména transkripčního faktoru TEAD1, byla její schopnost vázat dvoušroubovici ověřena pomocí nativní elektroforézy a vizualizována. Při elektroforetické separaci putuje protein gelem pouze tehdy, je-li navázán na záporně nabitou DNA. Komplex DNA s proteinem se pak pohybuje pomaleji než samostatná DNA, protože má větší molekulovou hmotnost.

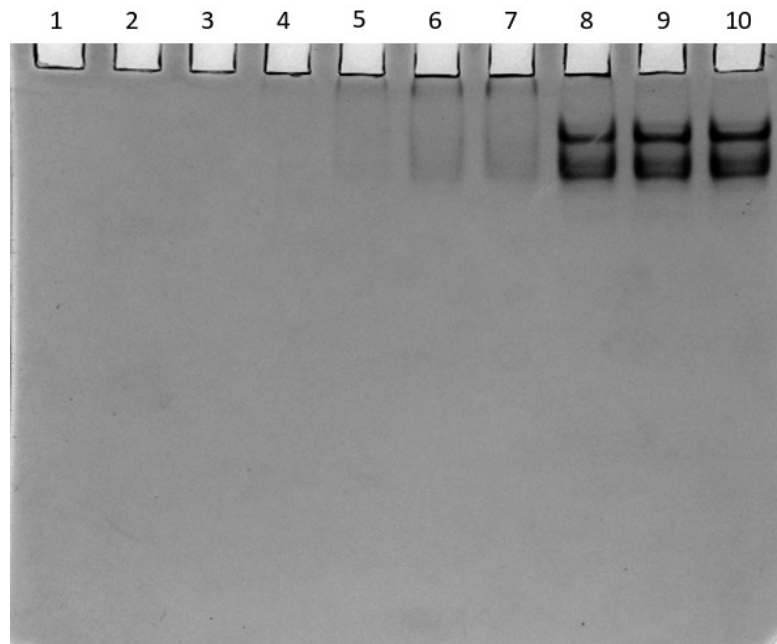
Pro analýzu vzorků pomocí nativní elektroforetické separace byly připraveny dva gely – jeden pro oligonukleotid, jehož M-CAT motiv pocházel z promotoru *CTGF* (dále jen *CTGF*) a druhý pro oligonukleotid, jehož M-CAT motiv pocházel z prvního exonu genu *GLUT1* (dále jen *GLUT1*).

Výsledné gely, v nichž jsou nukleové kyseliny vizualizovány pomocí barvy GelRed, se nachází na obrázku 23 (pro *CTGF*) a 25 (pro *GLUT1*). Porovnáním gelů na obou obrázcích je patrné, že se komplex proteinu s DNA tvořil již při nízkých koncentracích DNA. Dále se potvrdilo, že je protein nestabilní a rozpadá se, protože vznikaly různě dlouhé komplexy (viz Obr. 23 dráhy 8, 9 a 10; částečně viditelné i v Obr. 25 dráhy 9 a 10). Dále je zřejmé, že *CTGF* váže DNA pevněji než *GLUT1* – u *GLUT1* je na rozdíl od *CTGF* i při vysokých nadbytcích proteinu vidět volná DNA.

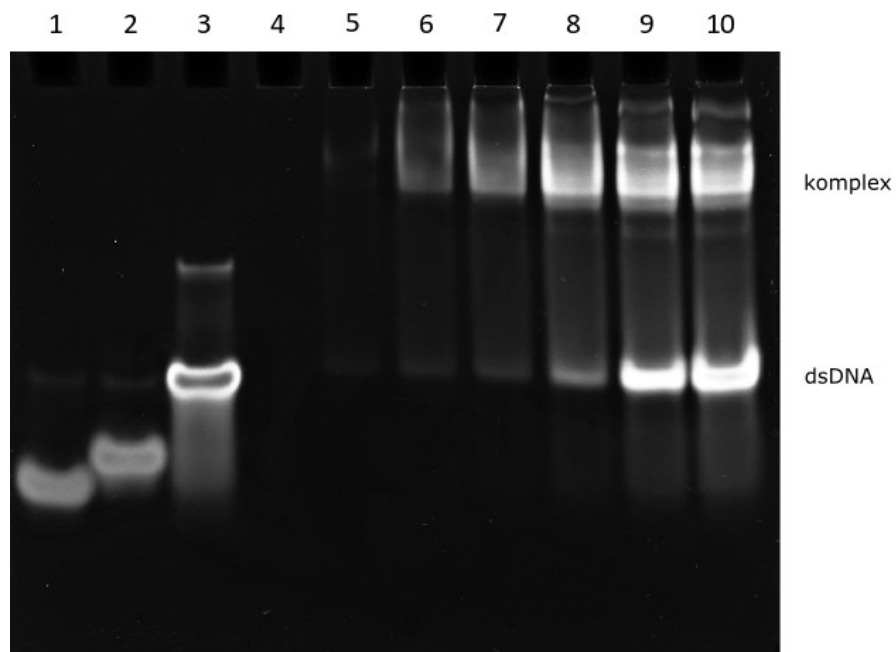
Pomocí světlolabilní barvy GelRed byly obarveny v gelech na obrázcích 23 a 25 struktury, které obsahovaly nukleové kyseliny. Pro vizualizaci struktur obsahujících protein bylo použito barvení pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue (viz Obr. 24 a 26). Na těchto obrázcích byl obarven pouze protein, který se nacházel v komplexu s DNA.



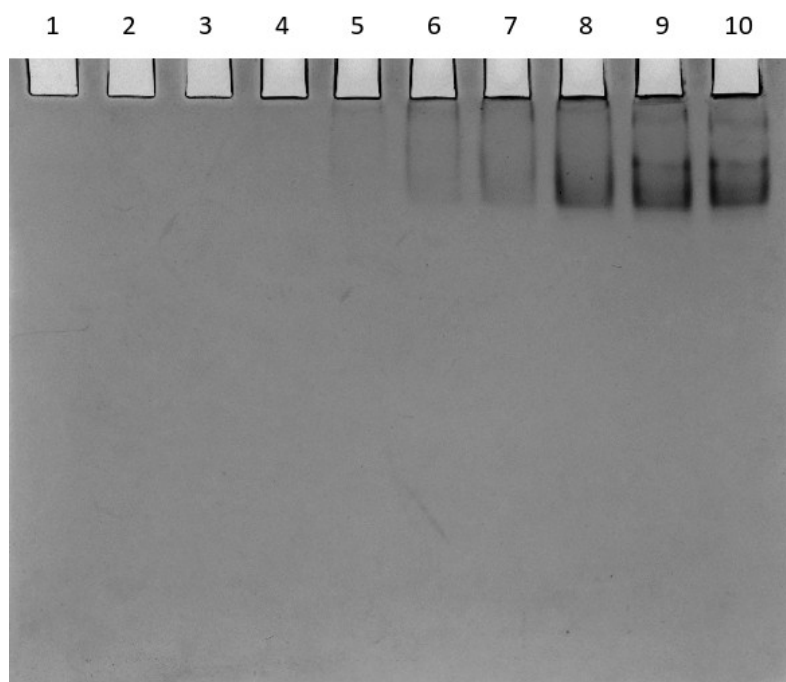
Obr. 23 Gel nativní elektroforézy s *CTGF*: barvený pomocí GelRed. 1 - *ssDNA* (r); 2 - *ssDNA* (l); 3 - *dsDNA*; 4 - protein kontrola; 5 - 1 μM DNA + 10 μM protein; 6 - 3 μM DNA + 10 μM protein; 7 - 5 μM DNA + 10 μM protein; 8 - 10 μM DNA + 10 μM protein; 9 - 20 μM DNA + 10 μM protein; 10 - 40 μM DNA + 10 μM protein.



Obr. 24 Gel nativní elektroforézy se vzorky s CTGF: barvený pomocí Coomassie Brilliant Blue. 1 - ssDNA (r); 2 - ssDNA (f); 3 - dsDNA; 4 - protein kontrola; 5 - 1 μ M DNA + 10 μ M protein; 6 - 3 μ M DNA + 10 μ M protein; 7 - 5 μ M DNA + 10 μ M protein; 8 - 10 μ M DNA + 10 μ M protein; 9 - 20 μ M DNA + 10 μ M protein; 10 - 40 μ M DNA + 10 μ M protein.



Obr. 25 Gel nativní elektroforézy s GLUT1: barvený pomocí GelRed. 1 - ssDNA (r); 2 - ssDNA (f); 3 - dsDNA; 4 - protein kontrola; 5 - 1 μ M DNA + 10 μ M protein; 6 - 3 μ M DNA + 10 μ M protein; 7 - 5 μ M DNA + 10 μ M protein; 8 - 10 μ M DNA + 10 μ M protein; 9 - 20 μ M DNA + 10 μ M protein; 10 - 40 μ M DNA + 10 μ M protein.



Obr. 26 Gel nativní elektroforézy se vzorky s GLUT1: barvený pomocí Coomassie Brilliant Blue. 1 - ssDNA (r); 2 - ssDNA (f); 3 - dsDNA; 4 - protein kontrola; 5 - 1 μ M DNA + 10 μ M protein; 6 - 3 μ M DNA + 10 μ M protein; 7 - 5 μ M DNA + 10 μ M protein; 8 - 10 μ M DNA + 10 μ M protein; 9 - 20 μ M DNA + 10 μ M protein; 10 - 40 μ M DNA + 10 μ M protein.

6 Diskuze

Výzkum transkripčních faktorů je už řadu let důležitou oblastí zájmu biochemie a strukturní biologie co se genové regulace týče. Jednou z významných rodin těchto faktorů je TEAD rodina transkripčních faktorů, jejíž zástupci se ve spolupráci s řadou koaktivátorů podílí na regulaci exprese genů zodpovědných za růst a diferenciaci buněk či bránění apoptose¹¹. S tím souvisí i vliv TEAD proteinů na tvorbu a rozvoj nádorových onemocnění, ke kterým dochází při deregulaci funkce těchto proteinů¹³.

Řada studií se v dnešní době zabývá regulací funkce TEAD transkripčních faktorů na úrovni jejich vazby s koaktivátory⁶⁸⁻⁷². Regulace TEAD proteinů je ovšem možná také přes ovlivnění jejich vazby k DNA. Cílem této bakalářské práce je produkce TEA DNA vazebné domény proteinu TEAD1, konkrétně její verze prodloužené o variabilní oblast za TEA doménou (TEAD1-DBD, viz Obr. 12 str. 39), kterou se liší od ostatních TEAD proteinů. Díky tomu bude možné v budoucnu odhalit nejen strukturní podstatu vazby TEAD1 proteinu na specifickou DNA sekvenci, ale i zkoumat rozdíly mezi jednotlivými TEAD proteiny ve způsobu jejich vazby s DNA.

Pro produkci TEAD1-DBD byl zvolen bakteriální expresní kmen buněk *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, které byly použity autory článku při přípravě TEA domény pro její strukturní analýzu pomocí NMR²⁴. Tento buněčný kmen byl také testován u nás v laboratoři spolu s buňkami BL21-Gold (DE3), u kterých však byly výtěžky neprodloužené DNA vazebné domény proteinu TEAD1 podstatně nižší a špatně detekovatelné⁷⁵.

Při testu produkce byla potvrzena exprese TEAD1-DBD proteinu u cíleně indukovaných buněk. U buněčných kultur s přidavkem induktoru IPTG však lze také pozorovat výrazný pokles produkce ostatních bakteriálních proteinů na úkor námi produkovaného TEAD1-DBD. Snížení produkce ostatních proteinů bylo pravděpodobně způsobeno snížením růstu buněk v důsledku indukce IPTG. Požadovaný protein se nejspíš produkoval na úkor růstu a rozmnožování buněk.

Po testu indukované exprese následovalo hledání vhodných produkčních podmínek pro TEAD1-DBD. Jako vhodná koncentrace IPTG byla zvolena hodnota 0,1 mM. Proužky v gelu na obrázku 14 (str. 40) byly pro různé koncentrace zhruba všechny stejně široké, i tak však bylo možné si všimnout narůstající intenzity proužku směrem k nižším koncentracím IPTG. Jako nejlepší byla zvolena nejnižší testovaná koncentrace induktoru. Vhodný produkční čas se pohyboval mezi 6 a 8 h, kdy k následné produkci proteinu ve velkém objemu byl zvolen čas 6 h, aby nedocházelo k degradaci proteinu. Optimální produkční teplotou byla z testovaných zvolena hodnota 37 °C.

Při purifikačním kroku pomocí afinitní chromatografie se z kolony při eluci pomocí pufrů s různou koncentrací imidazolu nejprve uvolňovaly zachycené bakteriální proteiny a poté i samotný TEAD1-DBD. Ve frakci 9 na obrázku 18 (str. 43) je patrný velmi široký pruh, který pozici

odpovídá velikosti proteinu TEAD1-DBD s histidinovou kotvou. Tento pruh se nacházel těsně nad pruhem proteinového standardu o velikosti 16 kDa. V této dráze SDS-PAGE gelu je však také vidět, že byl vzorek stále znečištěn několika jinými proteiny, které pravděpodobně ve své primární sekvenci obsahují úsek s několika histidiny za sebou. Proto byla nutná další purifikace vzorku. Proužky pod silným pruhem v dráze 9 (frakce z afinitní chromatografie) a 11 (produkt štěpení thrombinem) mohou značit, že je protein TEAD1-DBD nestabilní a rozpadá se, což bylo později prokázáno pomocí hmotnostní spektrometrie.

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, při které došlo k oddělení TEAD1-DBD, tentokrát už bez histidinové kotvy, od zbývajících proteinů. Množství získaného proteinu odpovídalo 3,2 mg/l. Proužky ve vzorcích z chromatografie (viz Obr. 20, str. 45) se však neshodovaly s předpokládanou hodnotou relativní molekulové hmotnosti, která činí 15 253,00 Da. Tato skutečnost mohla být způsobena izoelektrickým bodem produkovaného proteinu. TEAD protein obsahuje velké množství kladně nabitých aminokyselin, které působí proti zápornému náboji SDS, čímž protein zpomalují. Proto byl produkovaný protein identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie o vysokém rozlišení. V gelu na obrázku 20 (str. 45) bylo opět z výskytu více proužků patrné, že je produkovaný protein nestabilní a rozpadá se.

Výsledky hmotnostní spektrometrie potvrdily, že identifikovanou látkou je v podstatné míře produkovaný protein TEAD1-DBD (viz Obr. 21, str. 46), který však postrádal poslední čtyři aminokyseliny na svém C-konci. Analýza dále potvrdila přítomnost dalších kratších proteinů, které však byly dalšími rozpadovými produkty TEAD1-DBD od C-konce.

Protože se protein rozpadá od nestruturované oblasti, která nemá podstatný vliv pro vazbu DNA, nemá absence zmíněných čtyř aminokyselin negativní dopad na budoucí práci. Protein je však vhodné po produkci buď rychle zpracovat, anebo najít lepší skladovací podmínky (např. okamžité zamražení, jiný pufr).

Po purifikaci transkripčního faktoru TEAD1-DBD byla testována jeho schopnost vázat DNA. K tomuto testování byly použity dva různé oligonukleotidy: M-CAT motiv pocházející z promotoru genu *CTGF* a M-CAT motiv pocházející z prvního exonu *GLUT1*. Z přímé a zpětné ssDNA obou oligonukleotidů byly vytvořeny dvoušroubovice, jež se poté přidávaly v různých koncentracích k proteinu. Z výsledků vzorků z nativní elektroforézy (Obr. 23 na straně 47 a Obr. 25 na straně 48) je vidět, že u komplexu proteinu s dsDNA *CTGF* vznikají lépe ohraničené proužky než u obdobných komplexů proteinu s *GLUT1*. Tato skutečnost je pravděpodobně dána faktem, že *GLUT1* má k TEAD1-DBD nižší afinitu než *CTGF* (Obr. 27) – čemuž odpovídá i fakt, že při poměru 1:1 se u *CTGF* nevyskytuje volná DNA zatím co u *GLUT1* ano (viz Obr. 23 na straně 47 a Obr. 25 na straně 48).

Horší tvorba komplexů u *GLUT1* může být způsobena opačnou orientací vazebného motivu vůči DNA vláknu oproti *CTGF*. Zatímco u oligonukleotidu *CTGF* se vazebný motiv vyskytuje na

přímém vlákně v orientaci od 5' konce ke 3' konci, u oligonukleotidu *GLUT1* je tentýž vazebný motiv v orientaci opačné, tedy na přímém vlákně od 3' konce k 5' konci. Důsledkem této skutečnosti je výskyt volné dsDNA v drahách 5 až 8 obrázku 25 na straně 48. Na nižší afinitu TEAD1-DBD ke *GLUT1* může mít vliv i nepatrná změna DNA vazebné sekvence či jejího blízkého okolí⁷³. Zatímco báze v okolí vazebného místa na dvouřetězcové DNA se u *CTGF* shodují s nejobvyklejší DNA vazebnou sekvencí proteinu TEAD1³⁰ (okrově značené báze u oligonukleotidů, viz Obr. 27), u *GLUT1* se hned v těsné blízkosti vazebného motivu jedna báze odlišuje (modře značený guanin na Obr. 27).

TEAD1



CTGF

F: 5'-AGT CAC ATT CCT CCG-3'
R: 3'-TCA GTG TAA GGA GGC-5'

GLUT1 EX

F: 5'-TTG CCT TAC AGC CGG-3'
R: 3'-AAC GGA ATG TCG GCC-5'

Obr. 27 Porovnání vazebných sekvencí oligonukleotidů CTGF a GLUT1 s vazebnou sekvencí DNA vazebné domény proteinu TEAD1. V horní části obrázku je zobrazeno relativní zastoupení jednotlivých bází v DNA vazebné sekvenci TEAD1 proteinu³⁰. Dolní část obrázku poté obsahuje sekvence jednotlivých oligonukleotidů přímého (F) a zpětného (R) vlákna. Porovnáním DNA vazebné sekvence proteinu TEAD1 s oligonukleotidy je barevně zobrazeno. U ssDNA oligonukleotidů je u přímého vlákna červeně označena ta část bází, na kterou se transkripční faktor přímo váže; okrově jsou poté označeny ty báze v okolí místa vazby, které se shodují s nejčetněji se vyskytujícími bázemi u TEAD1 vazebné sekvence; modře jsou pak zvýrazněny báze, které se od vazebné sekvence TEAD1 liší. Černě barvu mají báze, u kterých nejsou data známa.

Jak je z obrázku 23 na straně 47 na první pohled patrné, kvůli nestabilitě produkovaného proteinu vzniká více typů komplexů: několik jasně odlišitelných proužků v oblasti nazvané „komplex“. Tuto skutečnost lze sledovat také u *GLUT1* (viz Obr. 25, str. 48); zde však, pravděpodobně vlivem nižší afinity proteinu k DNA a tedy i nižší stability komplexu, nejsou jednotlivé proužky vzniklých komplexů téměř rozpoznatelné. Vazba transkripčních faktorů s DNA obecně není pevná, protože se nejedná o chemickou vazbu ale pouze o interakce. Proto se v gelech nenachází naprosto striktně oddělené proužky jako u SDS-PAGE elektroforézy proteinů, neboť se vniklé komplexy mohou snadno rozpadat a znovu spojit.

Díky barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue bylo možné po proběhnutí nativní elektroforézy vizualizovat v gelu proteiny. Na obrázcích 24 (str. 48) a 26 (str. 49) je v drahách 5 vidět, že analogicky jako u gelu barveného pomocí GelRed, oblast „komplex“ opravdu obsahuje protein s navázanou DNA.

7 Závěr

Pro produkci ve velkém objemu média byly nalezeny vhodné podmínky produkce prodloužené DNA vazebné domény proteinu TEAD1. Protein TEAD1-DBD byl produkován 6 h při 37 °C v bakteriálním kmenu buněk *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Produkce proteinu byla indukována přidáním IPTG o koncentraci 0,1 mM v celkovém objemu produkčního média. Získaný protein byl po produkci v několika krocích purifikován a úspěšnost jeho izolace byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie. I když docházelo k degradaci proteinu od C-konce, neměla tato skutečnost vliv na vazbu k DNA, jak bylo prokázáno. Protein byl získán v dostatečném množství a čistotě pro ověření jeho schopnosti specificky vytvářet komplex s DNA obsahující M-CAT motiv.

Použitá literatura

1. Xiao, J. H. *et al.* 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, 3005–3013 (1987).
2. Xiao, J. H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J. M. & Chambon, P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 65, 551–68 (1991).
3. Andrianopoulos, A. & Timberlake, W. E. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* 3, 747–8 (1991).
4. Liu, F., Wang, X., Hu, G., Wang, Y. & Zhou, J. The transcription factor TEAD1 represses smooth muscle-specific gene expression by abolishing myocardin function. *J. Biol. Chem.* 289, 3308–16 (2014).
5. Jacquemin, P., Hwang, J. J., Martial, J. A., Dollé, P. & Davidson, I. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 271, 21775–85 (1996).
6. Landin-Malt, A., Benhaddou, A., Zider, A. & Flagiello, D. An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors. *Gene* 591, 292–303 (2016).
7. Kaneko, K. J. & DePamphilis, M. L. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev. Genet.* 22, 43–55 (1998).
8. Yoshida, T. MCAT Elements and the TEF-1 Family of Transcription Factors in Muscle Development and Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 8–17 (2008).
9. Wang, Q. & Latham, K. E. Translation of maternal messenger ribonucleic acids encoding transcription factors during genome activation in early mouse embryos. *Biol. Reprod.* 62, 969–78 (2000).
10. Kaneko, K. J., Cullinan, E. B., Latham, K. E. & DePamphilis, M. L. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development* 124, 1963–73 (1997).
11. Zhou, Y. *et al.* The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 138 (2016).
12. Milewski, R. C. *et al.* Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* 131, 829–37 (2004).
13. Pobbati, A. V & Hong, W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol. Ther.* 14, 390–8 (2013).
14. Chen, Z., Friedrich, G. A. & Soriano, P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev.* 8, 2293–301 (1994).
15. Sawada, A. *et al.* Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3177–89 (2008).
16. Jacquemin, P. *et al.* Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev. Dyn.* 212, 423–36 (1998).
17. Holden, J. K. & Cunningham, C. N. Targeting the Hippo Pathway and Cancer through the TEAD Family of Transcription Factors. *Cancers (Basel)*. 10, 81 (2018).
18. Yagi, R. *et al.* Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134, 3827–36 (2007).

19. Mahoney, W. M., Hong, J.-H., Yaffe, M. B., Farrance, I. K. G. & Farrance, I. K. G. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem. J.* 388, 217–25 (2005).
20. Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y. & DePamphilis, M. L. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* 15, 1229–41 (2001).
21. Li, Z. *et al.* Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev.* 24, 235–40 (2010).
22. Tian, W., Yu, J., Tomchick, D. R., Pan, D. & Luo, X. Structural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7293–8 (2010).
23. Chen, L., Loh, P. G. & Song, H. Structural and functional insights into the TEAD-YAP complex in the Hippo signaling pathway. *Protein Cell* 1, 1073–83 (2010).
24. Anbanandam, A. *et al.* 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, 17225–30 (2006).
25. Lee, D.-S., Vonrhein, C., Albarado, D., Raman, C. S. & Veeraraghavan, S. A potential structural switch for regulating DNA-binding by TEAD transcription factors. *J Mol Biol* 428, 2557–2568 (2016).
26. Shi, Z. *et al.* DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4. *Oncogene* 36, 4362–4369 (2017).
27. Farrance, I. K., Mar, J. H. & Ordahl, C. P. M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1. *J. Biol. Chem.* 267, 17234–40 (1992).
28. Mar, J. H. & Ordahl, C. P. M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4271–83 (1990).
29. Carlini, L. E., Getz, M. J., Strauch, A. R. & Kelm, R. J. Cryptic MCAT enhancer regulation in fibroblasts and smooth muscle cells. Suppression of TEF-1 mediated activation by the single-stranded DNA-binding proteins, Pur alpha, Pur beta, and MSY1. *J. Biol. Chem.* 277, 8682–92 (2002).
30. Khan, A. *et al.* JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* 46, D260–D266 (2018).
31. Noland, C. L. *et al.* Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure* 24, 179–186 (2016).
32. Chan, P. *et al.* Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nat. Chem. Biol.* 12, 282–9 (2016).
33. Gibault, F., Sturbaut, M., Bailly, F., Melnyk, P. & Cotellet, P. Targeting Transcriptional Enhanced Associate Domains (TEADs). *J. Med. Chem.* 61, 5057–5072 (2018).
34. Zhu, C., Li, L. & Zhao, B. The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 47, 16–28 (2015).
35. Crawford, J. J., Bronner, S. M. & Zbieg, J. R. Hippo pathway inhibition by blocking the YAP/TAZ–TEAD interface: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 28, 867–873 (2018).
36. Chen, H. I. & Sudol, M. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7819–23 (1995).
37. Oka, T. & Sudol, M. Nuclear localization and pro-apoptotic signaling of YAP2 require intact PDZ-binding motif. *Genes to Cells* 14, 607–615 (2009).

38. Komuro, A., Nagai, M., Navin, N. E. & Sudol, M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 33334–41 (2003).
39. Oka, T. *et al.* Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* 432, 461–72 (2010).
40. Kanai, F. *et al.* TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* 19, 6778–91 (2000).
41. Kaan, H. Y. K. *et al.* Crystal structure of TAZ-TEAD complex reveals a distinct interaction mode from that of YAP-TEAD complex. *Sci. Rep.* 7, 2035 (2017).
42. Vaudin, P., Delanoue, R., Davidson, I., Silber, J. & Zider, A. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development* 126, 4807–16 (1999).
43. Zhang, W. *et al.* VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res.* 24, 331–43 (2014).
44. Zhao, B. *et al.* TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 22, 1962–71 (2008).
45. Creemers, E. E., Sutherland, L. B., McAnally, J., Richardson, J. A. & Olson, E. N. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development* 133, 4245–56 (2006).
46. Watt, K. I. *et al.* The Hippo pathway effector YAP is a critical regulator of skeletal muscle fibre size. *Nat. Commun.* 6, 6048 (2015).
47. Schütte, U. *et al.* Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. *Transl. Oncol.* 7, 309–21 (2014).
48. Xia, Y., Zhang, Y.-L., Yu, C., Chang, T. & Fan, H.-Y. YAP/TEAD Co-Activator Regulated Pluripotency and Chemoresistance in Ovarian Cancer Initiated Cells. *PLoS One* 9, e109575 (2014).
49. Chu, C.-Y., Chang, C.-C., Prakash, E. & Kuo, M.-L. Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression. *J. Biomed. Sci.* 15, 675–685 (2008).
50. Lai, D., Ho, K. C., Hao, Y. & Yang, X. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res.* 71, 2728–38 (2011).
51. Xu, M. Z. *et al.* AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 30, 1229–40 (2011).
52. Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. & Todaro, G. J. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6528–32 (1988).
53. Zhang, J. *et al.* YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.* 11, 1444–50 (2009).
54. Liu, Y. *et al.* Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial–mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene* 35, 2789–2800 (2016).
55. Landin Malt, A. *et al.* Alteration of TEAD1 expression levels confers apoptotic resistance through the transcriptional up-regulation of Livin. *PLoS One* 7, e45498 (2012).
56. Kim, M., Kim, T., Johnson, R. L. & Lim, D.-S. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell Rep.* 11, 270–82 (2015).

57. Zhao, P. *et al.* Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 429–38 (2006).
58. Udan, R. S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C. & Halder, G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* 5, 914–920 (2003).
59. Moon, S., Yeon Park, S. & Woo Park, H. Regulation of the Hippo pathway in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2303–2319 (2018).
60. Yu, F.-X., Zhao, B. & Guan, K.-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163, 811–28 (2015).
61. Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y. & Guan, K.-L. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* 24, 72–85 (2010).
62. Moroishi, T., Hansen, C. G. & Guan, K.-L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 73–79 (2015).
63. Zhao, B. *et al.* Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 25, 51–63 (2011).
64. Zhang, N. *et al.* The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev. Cell* 19, 27–38 (2010).
65. Ota, M. & Sasaki, H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* 135, 4059–69 (2008).
66. Yu, F.-X. *et al.* Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev.* 27, 1223–32 (2013).
67. DeRan, M. *et al.* Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomotin-like 1 protein. *Cell Rep.* 9, 495–503 (2014).
68. Liu-Chittenden, Y. *et al.* Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* 26, 1300–5 (2012).
69. Wang, C. *et al.* Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* 6, 27–37 (2016).
70. Jiao, S. *et al.* A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell* 25, 166–80 (2014).
71. Zhang, Z. *et al.* Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP-TEAD Protein-Protein Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.* 5, 993–8 (2014).
72. Pobbati, A. V *et al.* Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy HHS Public Access. *Structure* 23, 2076–2086 (2015).
73. Sharon, E. *et al.* Inferring gene regulatory logic from high-throughput measurements of thousands of systematically designed promoters. *Nat. Biotechnol.* 30, 521–30 (2012).
74. Lorenzin, F. *et al.* Different promoter affinities account for specificity in MYC-dependent gene regulation. *Elife* 5, (2016).
75. Lišková, R. Recombinant preparation of TEAD transcription factor: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra analytické chemie, 76 (2016).

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka