

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský program v biomedicině

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Ing. Petr Yilma

Jaderné receptory v regulaci genové exprese, vývoje a metabolismu *Caenorhabditis elegans*

Disertační práce

Školitel : MUDr. Zdeněk Kostrouch, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Dále prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická, nahraná do Studijního informačního systému (SIS 1. LF UK), jsou totožné.

V Praze, 12. října 2019

Petr Yilma

Podpis

Identifikační záznam:

YILMA Petr. *Jaderné receptory v regulaci genové exprese, vývoje a metabolismu Caenorhabditis elegans [Nuclear receptors in the regulation of gene expression, development and metabolism in Caenorhabditis elegans]*. Praha, 2019. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Zdeněk Kostrouch, CSc.

Poděkování

Za kontinuální podporu a stimulující vědecké prostředí děkuji členům Laboratoře Zdeňka Kostroucha ústavu Biocev, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a dalším vědcům ústavu Biocev 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a pracovníkům dalších laboratoří výzkumného centra Biocev.

Experimentální práce vedoucí k této disertaci byla finančně podporována Univerzitou Karlovou a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, především granty PRVOUK-P27/LF1/1, SVV 266505/2013, SVV 260023/2014, SVV 260149/2015 a SVV 260257, grantem MSMT 0021620806 koordinovaným panem profesorem Milanem Ellederem a grantem CZ.1.05/1.1.00/02.0109.

Obsah

Abstrakt	9
Abstract.....	10
Seznam zkratek.....	11
Hypotézy.....	13
Cíl práce.....	14
Výsledky a závěry výzkumné práce.....	15
1.Úvod.....	16
1.1. Regulace genové exprese.....	16
1.2. Jaderné receptory jako modelové příklady regulované genové exprese.....	17
1.3. Jaderné receptory <i>C. elegans</i>	18
1.4. Regulační osa NHR-23.....	19
1.5. Mediátorový komplex.....	20
1.6. Struktura mediátorového komplexu na molekulární úrovni.....	21
1.7. Mediátorová podjednotka MED28.....	24
1.8. Modelový organismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
1.9. Proteomické metody	26
2. Metody.....	27
2.1. Použité linie <i>C. elegans</i> a jejich kultivace.....	27

2.2. Charakterizace NHR-60 na proteinové úrovni.....	27
2.3. Princip analytických metod použitých v experimentální práci vedoucí k této disertaci.....	28
2.3.1. Separace proteinů z proteinových směsí získaných z velkoobjemových kultur <i>C.elegans</i> pomocí dvoudimenzionální chromatografie.....	28
2.4 . .Metody použité v analýze intracelulárního rozložení editovaného <i>mdt-28</i> exprimujícího GFP::MDT-28 a transgenních linií <i>C. elegans</i> nesoucích exrachrosomální konstrukty exprimující MDT::GFP.....	31
2.4.1.Editované a transgenní line.....	31
2.4.2. Laboratorní velkoobjemové kultury <i>C. elegans</i>	32
2.5. Metoda GFP-TRAP.....	33
3. Výsledky.....	35
3.1. Proteomická charakterizace jaderného receptoru NHR-60. NHR-60 je exprimován ve dvou proteinových formách jejichž vzájemný poměr je závislý na stresových podmínkách.....	35
3.2. Charakterizace separace proteinu NHR-60 v systému dvoudimenzionální chromatografie.....	38
3.3. Proteomická charakterizace interaktomu mediátorové podjednotky MDT-28.....	42
3.4. MDT-28 vykazuje asociaci s dalšími strukturními proteiny a enzymy.....	44
4. Diskuse.....	47
4.1. Analýza regulace genové exprese na proteomické úrovni.....	47

4.2. V regulační kaskádě jaderného receptoru NHR-23 je zapojena odpověď na stres.....	49
4.3. Proteomická studie zaměřená na interaktory MDT-28 potvrzuje zapojení MDT-28 v modulu Hlavy Mediátorového komplexu.....	51
4.4. Možná existence menší formy Mediátorového komplexu obsahujícího MDT-28, MDT-6, MDT-8, MDT-11, MDT-17, MDT-20, MDT-22, MDT-30 a podjednotku Modulu těla MDT- 14.....	55
4.5. Jaderné a cytoplazmatické proteiny vykazující interakce s MDT-28.....	57
4.6. Faktory omezující experimentální výpovědní hodnotu proteomických přístupů.....	59
4.7. Faktory ovlivňující výpovědní hodnotu identifikace interakcí MDT-28 s proteiny se strukturní, enzymatickou nebo neznámou funkcí.....	60
5. Reference.....	64
6. Přílohy.....	70

Tato disertační práce je postavena na následujících publikacích:

Yilma P, Kostrouchová M, Talacko P, Kostrouchová M, Kostrouch D, Novák P, Kostrouchová M: Proteomic interactome of *C. elegans* Mediator complex subunit 28 (MDT-28) reveals predominant association with a restricted set of core Mediator subunits and an affinity to additional structural and enzymatic proteins. *Folia Biologica*, 2019 (in Press).

Kostrouchová M, Kostrouchová V, Yilma P, Benda A, Mandys V, Kostrouchová M.: Valproic Acid Decreases the Nuclear Localization of MDT-28, the Nematode Orthologue of MED28. *Folia Biol (Praha)*. 2018;64(1):1-9.

Kostrouch D, Kostrouchová M, Yilma P, Chughtai AA, Novotný JP, Novák P, Kostrouchová V, Kostrouchová M, Kostrouch Z.: SKIP and BIR-1/Survivin have potential to integrate proteome status with gene expression. *J Proteomics*. 2014 Oct 14;110:93-106. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.023.

(Pohludka M, Simeckova K, Vohanka J, Yilma P, Novak P, Krause MW, Kostrouchova M, Kostrouch Z. Proteomic analysis uncovers a metabolic phenotype in *C. elegans* after *nhr-40* reduction of function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep 12;374(1):49-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.115. Epub 2008 Jul 9., publikace se váže k tématu, ale byla publikována před započatím postgraduálního studia a není proto přímo uváděna v této disertaci.)

Další publikace, které přímo nesouvisí s tématem disertace:

Mikoláš P, Kollárová J, Sebková K, Saudek V, Yilma P, Kostrouchová M, Krause MW, Kostrouch Z, Kostrouchová M. GEI-8, a homologue of vertebrate nuclear receptor corepressor NCoR/SMRT, regulates gonad development and neuronal functions in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2013;8(3):e58462. doi: 10.1371/journal.pone.0058462.

Raška O, Kostrouchová V, Behenský F, Yilma P, Saudek V, Kostrouch Z, Kostrouchová M. SMED-TLX-1 (NR2E1) is critical for tissue and body plan maintenance in *Schmidtea mediterranea* in fasting/feeding cycles. Raška O, Kostrouchová V, Behenský F, Yilma P, Saudek V, Kostrouch Z, Kostrouchová M. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(6):223-31.

ABSTRAKT

Genetické regulační mechanismy genové exprese podmiňují správný vývoj, funkci a odpověď na potřeby organismu ve vztahu k proměnlivým životním podmínkám. Jsou však relativně pomalé. Životní procesy vyžadující rychlou odpověď na změny prostředí a metabolismu jsou z velké části prováděny na úrovni proteinů, především jejich posttranslačních modifikací a protein-proteinových interakcí.

Cílem experimentální práce spojené s touto disertací bylo využití modelového systému *Caenorhabditis elegans* ke studiu regulace genové exprese transkripčními faktory ze skupiny jaderných receptorů. Modelový systém *C. elegans* nabízí velmi výkonné experimentální přístupy především v oblasti genetiky, genomiky a funkční fenotypické analýzy. V práci spojené s touto disertací jsem studoval regulaci genové exprese za experimentálních podmínek z hlediska funkční proteomiky a zaměřil jsem se na využití separačních metod a metod pokročilé proteomiky, především hmotnostní spektrometrie.

V první části práce jsem charakterizoval jaderný receptor NHR-60 na úrovni proteinu. Tento jaderný receptor je exprimován ve dvou proteinových formách o velikosti 50 kDa a 64 kDa, které jsou s různou intenzitou detekovány v materiálu z kultur *C. elegans* a to přes to, že na úrovni mRNA je *nhr-60* exprimován ve formě jediné mRNA odpovídající proteinu s molekulární hmotností 50 kDa. Cílem bylo poznat molekulární podstatu vyšší formy NHR-60 a její možné funkční důsledky.

Detekci NHR-60 pomocí specificky vytvořené protilátky jsem následně použil k charakterizaci možností a limitací komparativní dvoudimenzionální chromatografie s hlavním výzkumným cílem vytvoření metodického postupu spojení proteomiky s ustanovenými metodami *C. elegans* k analýze kompletních proteomů pocházejících z velkoobjemových kultur *C. elegans* za speciálních experimentálních podmínek. Práce prokázala použitelnost dvoudimenzionální chromatografie k frakcionaci solubilizovatelného proteomu a jeho další využití pro diferenciální porovnání proteomů vázaných na specifické experimentální podmínky.

V druhé části práce jsem se zaměřil na identifikaci proteinových interakcí Mediátorové podjednotky MDT-28. Práce prokázala, že MDT-28 vykazuje interakce s podjednotkami tvořícími modul Hlavy Mediátorového komplexu *C. elegans*. Výsledky potvrdily správnost klasifikace MDT-28 jako ortologního proteinu MED28 a vedla k odhalení dalších proteinů vykazujících afinitu k MDT-28.

Experimentální práce spojená s touto disertací potvrzuje velmi zásadní přínos proteomických metod pro studium mechanismů regulace genové exprese.

ABSTRACT

Genetic mechanisms of regulation of gene expression form the basis for proper development, function of organisms and their responses to variable life conditions. However, they are relatively slow. Life processes that require a fast response to the changing environmental and metabolic conditions are mostly executed on the level of proteins especially their posttranslational modifications and protein-protein interactions.

The goal of the experimental work that led to the presented thesis consisted in exploitation of the model organism *Caenorhabditis elegans* for analysis of regulation of gene expression by transcription factors from the protein family of nuclear receptors. The model system *C. elegans* enables very efficient experimental procedures in the field of genetics, genomics and functional analysis of phenotypes. In the experimental work connected with this thesis, I studied the regulation of gene expression under specific experimental conditions from the perspective of advanced functional proteomics and I focused on the employment of separation methods and methods of advanced proteomics, especially by mass spectrometry.

In the first part of the work, I characterized the nuclear receptor NHR-60 on the protein level. This nuclear receptor is expressed as two protein forms with a mass of 50 kDa and 64 kDa that are detectable in variable intensities in materials originating from individual cultures of *C. elegans*, despite that *nhr-60* is expressed as a single form of mRNA corresponding to the protein with the molecular mass of 50 kDa. The goal was to characterize NHR-60 (64 kDa) at the molecular level and its possible functions.

The detection of NHR-60 using the specific antibody was then used for characterization of the power and limitations of two-dimensional chromatography. The main research goal was the development of methodology for comparative two-dimensional chromatography for the analysis of proteomes from high volume *C. elegans* cultures affected by specific experimental conditions.

In the second part of the work, I focused on the identification of protein interactions of the Mediator subunit MDT-28. The results confirmed that MDT-28 shows interactions with subunits comprising the Head module of the Mediator complex of *C. elegans*. The experimental work confirmed the classification of MDT-28 as the orthologue of MED28 and revealed additional proteins that display an affinity to MDT-28.

The experimental work connected with this thesis is in line with the very fundamental contribution of proteomic methods for studies of mechanisms of gene expression.

Seznam zkratk

- CDK8 - Cyklin-dependentní kináza
- DNA - Deoxyribonukleová kyselina
- dsRNA – dvouvláknová ribonukleová kyselina
- GFP - Zelený fluorescenční protein
- HSP - Teplem regulovaný protein
- HNF4 - Hepatocytární jaderný faktor 1-alfa
- HPLC - Vysokotlaká kapalinová chromatografie
- nLC - Nano kapalinová chromatografie
- LC - Kapalinová chromatografie
- MED - Mediátor
- MDT - Mediátor C.elegans
- mRNA - Messenger RNA
- MS - Hmotnostní spektrometrie
- NcOR -Jaderný receptor korepresor
- NHR – Jaderný hormonální receptor
- NR – Jaderný receptor
- PCR - Polymerázová řetězová reakce
- PF2D - Dvoudimenzionální chromatografie
- RNA - Ribonukleová kyselina

SDS - Dodecylsírán sodný

TF – Transkripční faktor

UTR - Nepřekládaná oblast

VDR - Vitamín D receptor

Hypotézy

Živočichové (Metazoa), mnohobuněčné heterotrofní organismy, se vyznačují, oproti jiným buněčným formám života rychlými reakcemi na změnu životní situace. Přitom životní formy jsou zásadním způsobem závislé na expresi svých genů, jejich geneticky kódované informace. Pochopení mechanismů, které integrují momentální životní situace (stav metabolismu, vývoje a funkce organismu a stav prostředí) s genovou expresí by mohlo zásadně přispět k rozvoji obecného biologického poznání regulace genové exprese.

Modelový organismus *Caenorhabditis elegans* umožňuje velmi efektivní biologický, především genetický a genomický výzkum ve velmi zkráceném časovém pohledu. Čtyři larvální stadia s velkým počtem přesně regulovaných vývojových kroků proběhne během 72 až 96 hodin. Všechny tyto vývojové kroky musí proběhnout v přesné regulaci s integrací s vývojovými procesy a zevními podmínkami.

Naší hlavní hypotézou je, že existuje spojení mezi regulacemi hlavních regulačních kaskád a stavem organismu, jeho metabolismem a stavem zevních podmínek. Toto spojení je v našem hypotetickém pohledu zajištěno na úrovni exekučních proteinů a mělo by být zviditelněno pomocí proteomických metod zaměřených na analýzu jaderných receptorů a s nimi fyzicky reagujících proteinů.

Z těchto proteinů byly vybrány jaderné receptory NHR-23, NHR-60 (Kostrouchova et al. 1998; Kostrouchova et al. 2001; Simeckova et al. 2007) a z Mediátorového komplexu, který zprostředkovává spojení mezi jadernými receptory a základní transkripční mašinerií jeho podjednotka MED28 (v genetickém názvosloví *C. elegans* MDT-28). Tato podjednotka byla vybrána z toho důvodu, že se jedná o podjednotku evolučně novou, přítomnou jen u

mnohobuněčných organismů, která navíc nebyla u hlístic známa. Přesněji řečeno, protein ortologní k perilipinu obratlovců byl nesprávně označen jako ortolog MED28 (Chughtai et al. 2015; Kostrouchova et al. 2017).

První hypotézou spojenou s touto disertací byl předpoklad, že vyšší forma NHR-60 rozpoznávaná specifickou protilátkou je protein vznikající posttranslační modifikací a že tedy proteomické metody mohou tuto modifikaci blíže charakterizovat a mohou také odhalit proteiny interagující s NHR-60.

Druhou hypotézou spojenou s touto disertací byl předpoklad, že necílená proteomická analýza proteinů interagujících s nově identifikovaným MDT-28 potvrdí asociace této podjednotky s dalšími podjednotkami Mediátorového komplexu a navíc odhalí proteiny, které by mohly vstupovat do funkce MDT-28 a přispívat k regulaci genové exprese závislé na MDT-28.

Cíle výzkumné práce

Prvním výzkumným cílem práce bylo proteomicky a funkčně charakterizovat NHR-60, protein, který je kódovaný jedinou formou mRNA, ale má v analýze pomocí Western blotu a cíleně vytvořené protilátky dvě proteinové formy o velikosti 50 kDa a 64 kDa.

Druhým výzkumným cílem práce bylo proteomicky charakterizovat protein MDT-28 identifikovaný jako skutečný MED28 hlístic a určit proteiny, se kterými MDT-28 preferenčně interaguje.

Výsledky a závěry výzkumné práce

1. Výsledky první části práce ukázaly, že protein NHR-60 je velmi pravděpodobně posttranslačně modifikován při zapojení stresových podmínek. Ve spojení s další analýzou exprese pravděpodobných jaderných receptorů ve směru regulační kaskády výsledky předkládané práce naznačují, že posttranslační modifikace NHR-60 je pravděpodobně spojena s jeho inaktivací nebo přeměnou na proteinové úrovni s následným rozpadem nebo přeměnou v jinak funkční protein (například repressor).

Na základě těchto nálezů je možné navrhnout koncept, ve kterém jeden z proteinů ze skupiny zmnožených jaderných receptorů *C. elegans* integruje regulaci genů ve směru regulační kaskády v závislosti na posttranslační modifikaci regulované stresovými podmínkami. Pravděpodobně se jedná o novou úroveň regulace, která by mohla být součástí evolučního tlaku, který vedl ke zmnožení jaderných receptorů *C. elegans*.

2. Analýza frakcionace NHR-60 metodou dvoudimenzionální chromatografie dále prokázala potenciál reprodukcibilně frakcionovat komplexní proteom souborných kultur *C. elegans* a umožnila použití komparativní dvoudimenzionální chromatografie pro analýzu proteomů za speciálních experimentálních podmínek.

3. Výsledky třetí části práce potvrdily preferenční interakce MDT-28 (F28F8.5) s mediátorovými podjednotkami tvořícími modul hlavy Mediátorového komplexu. Tyto výsledky dále validují dřívější publikace z naší laboratoře, které identifikovali F28F8.5 jako skutečný ortolog MED28 a svědčí pro zapojení orthologů MED28 v modulu hlavy Mediátorového komplexu.

1. ÚVOD

1.1. Regulace genové exprese

Buněčné organismy jsou z převažující části tvořeny proteiny, které tvoří jejich strukturu a zajišťují jejich funkce jako živých organismů. Další velkou molekulární frakcí živých organismů je jejich genetický materiál, který je tvořen a podmiňován nukleovými kyselinami, především DNA. Současný svět buněčných organismů je zásadním způsobem závislý na regulované expresi geneticky kódované informace ve strukturální a jinak funkční proteiny. Exprese genetické informace, přepis informace z genetického kódu uloženém v DNA do mRNA, která je dále překládána do proteinů. Přepis DNA je zajišťován transkripčnímašinerií a je zásadním způsobem regulován (Piras et al. 2012). Obecně je přijato dělení na transkripci probíhající stále, přesněji řečeno méně zřetelně regulované a transkripci regulovanou transkripčními faktory (Hawkins et al. 2018). Ty jsou definovány jako proteiny, které váží regulační sekvence v genetickém materiálu, především v promotorech genů (hlavních regulačních částí genů) a ovlivňují úroveň jejich přepisu do mRNA DNA dependentní RNA polymerázou II pozitivně nebo negativně.

Transkripční faktory však neprovádějí tuto regulaci sami, ale naopak ve spolupráci s dalšími proteiny, které se na ně fyzicky váží a přenášejí jejich regulační potenciál k základní transkripčnímašinerii. Tyto proteiny zásadně ovlivňují transkripci, ale nemající schopnost vázat regulační sekvence v DNA a jsou klasifikovány jako transkripční kofaktory a podle toho, jestli transkripci aktivují nebo naopak inhibují jsou nazývány transkripčními koaktivátory nebo korepresory. Často však mají funkce obě a tato vlastnost je dále regulována (Bhattacharjee et al. 2013).

1.2. Jaderné receptory jako modelové příklady regulované genové exprese

Živočichové, mnohobuněčné heterotrofní organismy také klasifikované jako Metazoa, se od ostatních mnohobuněčných organismů, tedy především rostlin odlišují tím, že mají některé pro ně specifické skupiny transkripčních faktorů (Wang and Nishida 2015). Mezi tyto TF specifické pro živočichy patří jaderné receptory, modulární proteiny, které váží specifické sekvence v genetickém materiálu a přenáší regulační potenciál směrem k transkripční mašinerii. Jejich modelový význam je umocněn tím, že další část jejich molekuly v mnohých případech má schopnost vázat specifické nízko molekulární většinou hydrofobní molekuly a v důsledku této vazby nebo její absence regulovat cílové geny pozitivně nebo negativně. Skutečnost, že některé jaderné receptory váží kofaktory s transkripční aktivující schopností a při absence této vazby kofaktory s represivní schopností genové exprese přispěla k identifikaci koaktivátorů typu CBP/p300 a korepresorů typu NCoR1 a NCoR2. Poznání těchto mechanismů vyplynulo z několik dekád intenzivního molekulárně biologického výzkumu (přehledně prezentováno v (Evans and Mangelsdorf 2014)).

Jaderné receptory se dělí podle současně přijaté klasifikace na 9 podskupin (Nuclear Receptors Nomenclature 1999). Toto dělení sice vychází ze sekvenční analýzy jaderných receptorů, ale pravděpodobně velmi dobře vystihuje jejich evoluci Laudet a mechanismy, které byly vyvinuty k rozšíření regulačních funkcí nutných pro zajištění vývoje diverzifikovaných živočišných forem (Kostrouchová and Kostrouch 2015).

Z pohledu experimentálních dat práce podmiňující tuto disertaci je důležité dělení jaderných receptorů na 4 základní typy, z nichž Typ I je charakterizován mimo jiné tím, že je ve stavu bez ligandu lokalizován v cytoplazmě, kde je asociován s cytoplazmatickými proteiny,

především HSP70 a HSP90 (Mangelsdorf et al. 1995; Novac and Heinzel 2004). Po navázání ligandu jsou tyto receptory (především estrogenní receptory, androgenní receptor, progesteronový receptor, mineralokortikoidní receptor a glukokortikoidní receptor) z této vazby uvolněny a jsou transportovány do jádra, kde dále plní svou transkripční funkci. Hlavním proteinem interagujícím s těmito receptory je HSP90 (Heat shock protein 90). Heat shock protein tvoří skupinu evolučně zachovalých proteinů zahrnující 6 proteinových rodin (Hsp110 (HspH), Hsp90 (HspC), Hsp70 (HspA), Hsp40 (DNAJ), malé Hsps (HspB) a malé molekulární chaperony (chaperons) HspD/E a CCT. Některé z těchto proteinů jsou exprimovány konstitutivně, jiné jsou indukovány stresovými podmínkami. Některé z těchto proteinů jsou exprimovány velmi významně. Hsp90 a HSP70 mohou tvořit až 2% celkového proteinu za normálních podmínek a až 4% za stresových podmínek (Dhamad et al. 2016). HSP90 a HSP70 zabraňují transkripční funkci těchto jaderných receptorů, ale zároveň je ochraňují po omezenou dobu proti degradaci, kterou však také ve spojení s dalšími buněčnými impulzy za určitou dobu naopak stimulují (Dhamad et al. 2016) a vedou tak k degradaci jaderných receptorů této skupiny při nízké hladině jejich ligandů.

1.3. Jaderné receptory *C. elegans*

Genom *Caenorhabditis elegans* zahrnuje 284 genů kódujících jaderné receptory. To je počet, který se vymyká z rámce ostatních druhů se známým genomem a to i v rámci kmene hlístic, které mají zvýšený počet genů jaderných receptorů. Zmnožené receptory jsou poměrně časté, ale většinou se to týká různých podskupin (anglicky subfamilies) receptorů. V druhu *C. elegans* jde o

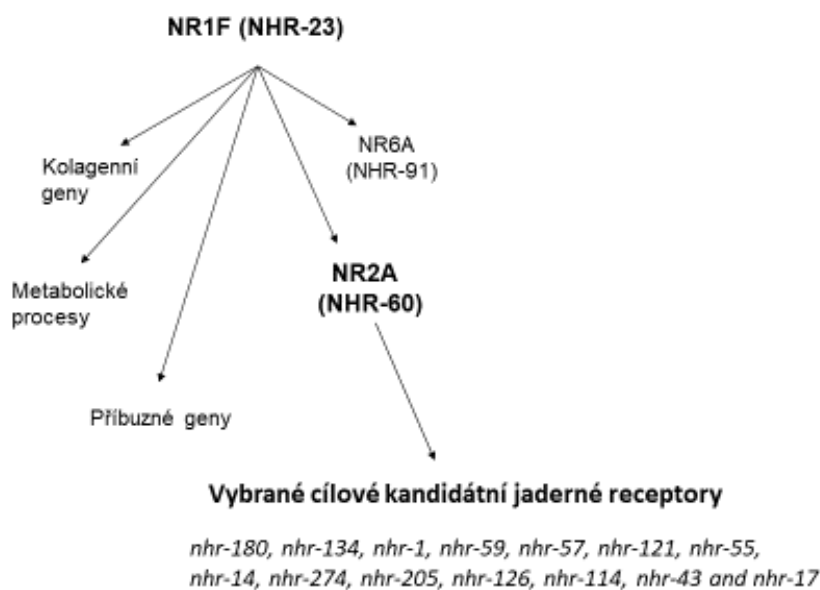
multiplikaci genů pravděpodobně primárně odvozených od HNF4. HNF4 je jeden z evolučně zachovalých jaderných receptorů podskupiny NR2 a je pravděpodobně nejbližším homologním genem původního jaderného receptoru, který existoval v časové blízkosti začátku evoluce živočichů. V genomu *C. elegans* je těchto receptorů příbuzných HNF4 asi 260 (Kostrouchova and Kostrouch 2015). Jeden z nich, NHR-60, vykazuje v identifikaci protilátkou velmi zvláštní lokalizaci v okolí jaderné obálky. Protilátkou rozpoznávaný protein na úrovni Western blotu má nejméně dvě různé velikosti, odpovídající asi 50 kDa a 64 kDa. NHR-60 je v regulační ose jaderného receptoru NHR-23 pod tímto receptorem, který je příbuzný retinoidním receptorům (Simeckova et al. 2007). Podstata dvojí proteinové formy NHR-60 ani jeho pravděpodobné interagující proteiny známy nejsou.

NHR-23 je velmi významný jaderný receptor hlístic, který se kritickým způsobem uplatňuje v regulaci přechodů larválních stádií a svou výraznou funkcí je obdobný thyroïdním receptorům obratlovců. Na rozdíl od nich však nemá známý ligand (Kostrouchova and Kostrouch 2015).

1.4. Regulační osa NHR-23

Regulační osa NHR-23 zahrnuje kolagenní geny, metabolické geny, vývoj regulující geny příbuzné proteinům Hedgehog a jaderné receptory NHR-91 a NHR-60. NHR-60 je exprimován ve stejných buňkách jako NHR-23 a může být regulátorem dalších jaderných receptorů (viz. schéma níže Obr.1.) v regulační kaskádě toho jaderného receptoru (Kostrouch et al. 1995; Kostrouchova et al. 1998; Kouns et al. 2011).

Existence dvou proteinových forem NHR-60, které by mohly mít důležitý význam pro jeho další funkce, však není blíže vysvětlena.



Obr.1 Regulační osa jaderného receptoru NHR-23 (modifikováno z publikace (Kostrouchova and Kostrouch 2015)).

1.5. Mediátorový komplex

Studie prováděné na kvasinkách a na transkripčních faktorech živočišných buněk vedly k identifikaci většího počtu (přibližně 100) dalších proteinů účastných v regulaci genové exprese. Některé z nich, asi 20 u kvasinek a 30 v živočišných buňkách se ukázaly být molekulárními ortology skládajícími funkčně obdobný, nebo shodný komplex, který zprostředkovává přenos informace z transkripčních faktorů k transkripční mašinerii. Skutečný počet interagujících protein se

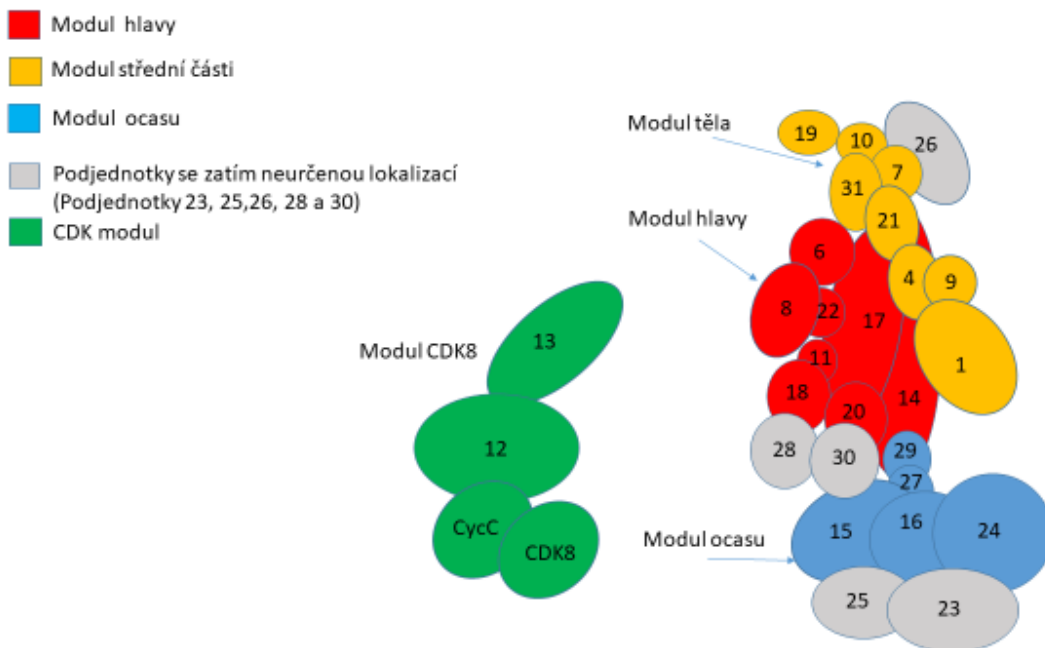
tak snížil na 25 až 35 proteinů skládající jeden evolučně zachovalý komplex (Bourbon et al. 2004; Bourbon 2008).

Tento regulační komplex nazývaný Mediátorový komplex, nebo jen Mediátor, je v současné době cílem intenzivních studií zaměřených na molekulární charakterizaci regulace genové exprese. Je to především z toho důvodu, že je pravděpodobným molekulárním uzlem, do kterého se soustřeďují dostředné mechanismy regulace genové exprese pocházející z buněčných regulačních kaskád.

V širším pohledu se regulační kaskády mohou promítat na úroveň různých proteinů účastných v genové expresi a integrovat tak signály z transdukčních kaskád s regulací genové exprese zajišťovanou transkripčními faktory a s nimi interagujícími protein (přehledně pro modelový organismus *Caenorhabditis elegans* prezentováno v (Grants et al. 2015)). Mediátorový komplex však představuje velmi versatilní strukturu, která je schopna integrovat velkou šíři těchto signálů včetně dalších signálů ze strukturálního stavu diferencovaných buněk.

1.6. Struktura mediátorového komplexu na molekulární úrovni

Současná představa mediátorového komplexu je schematicky prezentována v následujícím schématu.



Obr. 2 Schématické znázornění Mediátoru živočichů. Mediátor je tvořen čtyřmi základními moduly, moduly hlavy, těla, ocasu a CDK modulu. U čtyř podjednotek (podjednotek 23, 25, 26, 28 a 30) není sterické zapojení ještě dostatečně prokázáno. Zpracováno podle (Soutourina 2018). Klasifikace jednotlivých podjednotek Mediátorového komplexu však zatím není přesně ustanovena. V některých dalších souhrnných publikacích je velká podjednotka MED14 řazena do Modulu těla a je považována za molekulární kostru celého Mediátorového komplexu (Yin and Wang 2014).

Mediátor má pravděpodobně modulární strukturu rozdělenou na čtyři základní moduly, modul hlavy, těla, ocasu a CDK8 modul. CDK8 modul může být od ostatních podjednotek oddělen a vzniká pak menší Mediátorový komplex, který je ve většině dokumentovaných případů transkripčně aktivní. CDK8 modul je tak ve většině případů, ale ne vždy, modulem inhibujícím transkripční funkci celého Mediátoru a hlavním modulem integrujícím negativní

signály transdukčních kaskád (Jiang et al. 1998; Asturias et al. 1999; Dotson et al. 2000; Bourbon 2008; Tsai et al. 2014; Allen and Taatjes 2015; Harper and Taatjes 2017; Soutourina 2018). Mediátorový komplex kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* zahrnuje menší počet podjednotek než Mediátorový komplex mnohobuněčných organismů (Soutourina 2018). Čtyři podjednotky, a to konkrétně MED23, MED25, MED26, MED28, jsou pravděpodobně evolučně nové a spojené s evolucí diferencovaných buněk a tkání. Strukturní studie navrhly existenci základního Mediátorového komplexu zahrnujícího pouze některé podjednotky modulů hlavy a těla (Asturias et al. 1999; Dotson et al. 2000; Mathur et al. 2011; Robinson et al. 2012; Robinson et al. 2015; Robinson et al. 2016; Verger et al. 2019). Strukturní studie navíc ukázala, že Mediátorové komplexy asociované s jednotlivými transkripčními faktory zahrnujícími SREBP, VP16, TR, VDR a p53 mají odlišnou sterickou konformaci (Poss et al. 2013).

V současné době není rozhodnuto, jestli existují formy Mediátorového komplexu s určitými podjednotkami vázanými na specifické transkripční regulující funkce (Allen and Taatjes 2015). Nicméně u kvasinek byly popsány linie s chybějícími podjednotkami, které byly životaschopné v laboratorních podmínkách. Naproti tomu podjednotky Med17 and Med21 byly nutné pro široké spektrum genové transkripce (Thompson and Young 1995; Holstege et al. 1998). Chybění jednotlivých podjednotek Med1, Med2, Med3, Med5, Med9, Med15, Med16, Med18, Med19, Med20, Med31, nebo podjednotky skládající CDK modul (v nomenclature *Saccharomyces cerevisiae* podjednotky Med12 (srb8), Med13 (srb9), srb10 (CDK8)a srb11) nezabránilo mutovaným liniím přežít za laboratorních podmínek (Dettmann et al. 2010).

V jiných studiích provedených na kultivovaných kvasinkách (Robinson et al. 2016) nebo HeLa buňkách (Paoletti et al. 2006; Tsai et al. 2014) byly precipitovány Mediátorové komplexy se stabilním poměrem podjednotek svědčícím pro existenci Mediátorového komplexu s

konstantním počtem podjednotek (Paoletti et al. 2006). Nicméně studie zaměřené na charakterizaci Mediátorových komplexů v nádorech svědčí pro existenci Mediátorových komplexů s menším nebo větším zastoupením určitých podjednotek (Bragelmann et al. 2016; Syring et al. 2016).

1.7. Mediátorová podjednotka MED28

Mediátorová podjednotka MED28 má zvláštní význam z hlediska projektu zaměřeného na možné funkční spojení mezi strukturním stavem buňky a regulací genové exprese pro jeho prokázanou dvojitou lokalizaci s dvojitým odlišným funkčním významem. První funkce je jaderná jako mediátorová podjednotka (Sato et al. 2004; Beyer et al. 2007) a druhá funkce je cytoplazmatická na úrovni cytoskeletonu, která je spojená s regulací buněčných funkcí proteiny Grb2 a NF2 (Gonzalez-Agosti et al. 1996; Wiederhold et al. 2004; Lee et al. 2006; Lu et al. 2006; Huang et al. 2012). To dává předpoklad, že asociace s proteiny, které zprostředkovávají cytoplazmatické funkce a jejich dalšími interaktory, by mohla být také zapojena do regulačních funkcí jaderných, za předpokladu, že primárně cytoplazmatické proteiny se na základě jejich funkčního nadbytku přesunou z cytoplazmy do jádra. V takovém případě by se uplatnily asociační konstanty vazby jednotlivých proteinů v alternativních komplexech a jejich lokální koncentrace.

Předcházející studie naší laboratoře detekovala a funkčně charakterizovala ortholog MED28 v modelovém organismu *C. elegans*, MDT-28 (Kostrouchova et al. 2017). To otevřelo možnost dalších studií zaměřených na regulační potenciál MDT-28 v modelovém systému, který umožňuje molekulárně biologické a vývojové analýzy na úrovni celého organismu, po celou dobu jeho vývoje a života.

1.8. Modelový organismus *Caenorhabditis elegans*

Biologický modelový systém *C. elegans* je velmi výkonný nástroj vývojové a molekulární biologie. Byl prvním mnohobuněčným organismem, jehož genom byl kompletně sekvenován a uvolněn do genetických databází. Následně se stal jedním z vedoucích projektů v komplexní biologii. Tento systém využívá digitalizaci a velmi pokročilou informatiku k ukládání veškerých digitalizovatelných dat a vyrostl do souboru propojených databází zahrnujícího genové databáze, odvozené databáze předpověditelných genů, databází paralelně sekvenovaných dat exprimomu, exprimovaných isoform mRNA, vazných míst velkého množství známých transkripčních faktorů, mutací, polymorfismů, navozených ztrát funkcí předpovězených genů, databází expresních vzorců proteinů sledovaných pomocí transgenních technik a velkého množství dalších experimentálních dat (dostupné v databasi WormBase <https://www.wormbase.org> včetně citovatelných literárních pramenů <http://www.wormbook.org/>).

Modelový systém *C. elegans* byl velmi úspěšně použit ke studiu vývojových regulačních cest, pochopení řízené buněčné smrti a detailní analýzy lokalizace a funkce jednotlivých proteinů pomocí transgenních technik s využitím fluorescenčních proteinů. Tento systém je nyní velmi úspěšně využíván pro studium řízené genové exprese a jejího spojení s regulací vývoje a metabolismu (Reinke et al. 2013).

1.9. Proteomické metody

Hmotnostní spektrometrie je výkonná metoda analytické chemie. V modifikacích schopných analyzovat a sekvenovat protein je nezastupitelná v molekulární biologii a umožňuje výběrem nezatíženou analýzu proteinových frakcí a směsí. Široké využití proteomických metod umožňuje doplňovat soubory biologických dat o paralelní pokrytí na úrovni proteinů (dostupné v databázi ExPaSy <https://www.expasy.org/>). Jako příklad mapování proteinů izolovaných ze subcellulárních organel ve spojení s analytickým určením protein pomocí hmotnostní spektrometrie lze uvést analýzu jadérkových proteinů (<https://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage/protein/ac=P68371>; (Scherl et al. 2002)).

2. Metody

2.1. Použité linie *C. elegans* a jejich kultivace

Pro analýzu exprese NHR-60 byly využity organismy *C. elegans* označované jako divoký typ (Wild type, N2) získané z Caenorhabditis Genetic Center, University of Minnesota (Madison, MN, USA), které byly kultivovány podle ustanovených laboratorních podmínek (Brenner 1974) jako smíšené kultury nebo kultury synchronizované standardním laboratorním postupem (Zhang and Kuhn 2013). K analýze NHR-60 imunoprecipitovaného nezávislou protilátkou byla vytvořena transgenní line *C. elegans* nesoucí extrachromosomální konstrukt (arrays) tvořený promotérem řízeným teplotním šokem (na základě vektoru pPD49.78), celou genovou sekvencí *nhr-60* včetně intronů před kterou byla vložena sekvence kódující pro N-terminálně připojený peptid FLAG a zakončenou 3' nepřekládanou oblastí převzatou z genu *unc-54*. Konstrukt dále obsahoval selekční marker *rol-6* způsobující rol fenotyp. K indukci syntézy transgenů byl využit teplotní šok 30 minut při teplotě 34° C.

2.2. Charakterizace NHR-60 na proteinové úrovni

Z kultur *C. elegans* pěstovaných v Petriho miskách na médiu obsahujícím 2% Agar s NGM (Nematode growth medium) médiem a pokrytých vrstvou *E. coli* (linie OP50) byly hlístice smyty do 1.5 ml aliquotů deionizovanou vodou, centrifugovány po dobu 2 min. při xx xg (3000 rpm Hettich, průměr rotoru 12.5 cm), supernatant odsát a získaný materiál byl resuspendován ve 2x SDS Laemmli pufru (Laemmli 1970), přiveden do 98° C, inkubován po dobu 5 min. Koncentrace proteinu byla změřena pomocí BCA metody (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) s korekční metody odečtením hodnot získaných samotným SDS pufrem. Proteiny byly separovány pomocí elektroforézy (Mini-Protean I, Hercules, Bio-Rad, CA, USA), blotovány na nitrocelulózovou

membránu a vyšetřeny pomocí protilátek vytvořených proti NHR-60 (Simeckova et al. 2007) nebo monoklonálními protilátkami vytvořenými proti peptidu FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Jako sekundární protilátky byly použity protilátky označené peroxidázou (Gio-Rad, Hercules, CA, USA). Ty byly vizualizovány pomocí chemiluminiscence podobně jako v publikované práci (Simeckova et al. 2007)

Analýza NHR-60 při stresových podmínkách

Jako stresové podmínky byly použity jednak kultivace při sníženém množství potravy a velké hustotě hlístic v jednotlivých kulturách. Druhým typem navozeného stresu byl teplotní šok, stejný jako při použití pro indukci transkripce z promotorů ovládaných teplotním šokem.

2.3. Princip analytických metod použitých v experimentální práci vedoucí k této disertaci

2.3.1. Separace proteinů z proteinových směsí získaných z velkoobjemových kultur *C.elegans* pomocí dvoudimenzionální chromatografie

K identifikaci proteinů z proteinových směsí jsou používány především přístupy zahrnující dvoudimenzionální elektroforézu většinou s prvním rozměrem spočívajícím v elektrofokusaci a druhým rozměrem spočívajícím v denaturující SDS gelové elektroforéze s použitím různých přecházejících metod zaměřených na snížení množství protein v původní směsi. Tyto metody byly vypracovány do velkých detailů a umožnily identifikaci velkého množství proteinů ve specifických frakcích. Tyto přístupy však mají také svá experimentální omezení odvozené od

relativně malého množství proteinu, které je možné v individuálních experimentech analyzovat, v neschopnosti identifikovat proteiny, které nedávají chromatografické skvrny ve druhých rozměrech a především v nutnosti použití iniciální separační metody ke snížení množství proteinových druhů i celkového proteinu.

Metoda dvoudimenzionální chromatografie použitá v práci vedoucí k této disertaci představuje alternativní přístup, který tato omezení nemá. Je založena na převedení relativně velkého množství proteinů výchozího materiálu do solubilní proteinové směsi pomocí vysokomolekulárního roztoku močoviny.

Kvantifikované experimenty, které provedl předkladatel této disertace ukázaly, že tento přístup převede přibližně 90% výchozího materiálu obsahujícího kompletní organismy *C. elegans* do primární solubilní frakce.

Tato frakce je však v námi použité metodě také částečně ochuzena o molekulární složky s molekulární hmotností menší než přibližně 9 kDa, v případě proteinů menších než protein s přibližně 80 aminokyselinami. Tento krok je nutný k odstranění vysokého obsahu solí ve vzorcích. Mohl by však být nahrazen jinou metodou v případě nutnosti analyzovat malé proteiny.

Celý systém je založen na komerčně získaném přístroji Beckman Coulter ProteomeLab PF2D (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), který se sestává ze dvou specificky upravených systémů HPLC spojených vloženým kolektorem frakcí a současným injektorem frakcí do druhého rozměru separace.

První část systému dělí proteiny na základě chromatofokusace – čili na základě jejich povrchového náboje a affinity ke stacionární fázi za specifických podmínek určovaných mobilní fází s proměnlivým pH a následně se vzrůstající koncentrací NaCl, což od pH 6,5 plní stejný účel jako

další snižování pH. Na základě této separace jsou ze systému vyplavovány frakce proteinů podle jejich molekulárně lokálního povrchového náboje a afinity ke stacionární fázi s nejdříve uvolňovanými bazickými proteiny a nakonec silně acidickými proteiny.

Primární frakce jsou pak separovány v druhém systému založeném na HPLC s reverzní fází (HPRP — High Performance Reversed Phase Chromatography), který separuje proteiny na základě jejich hydrophobicity. Systém je pak doplněn sběračem frakcí FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA) umožňujícím automatický sběr více než 1200 sekundárních frakcí. V uspořádání pro komparativní dvoudimenzionální chromatografii pak systém analyzuje obsah proteinů v jednotlivých frakcích na základě spektrometrické UV detekce při vlnové délce 214 nm (s maximem absorpance zaměřeným na peptidickou vazbu) a porovnává spektrometrické hodnoty ve srovnávaných proteomech pomocí počítačových programů 32Karat, ProteoVue and

DeltaVue, které (posloupně) umožňují ovládání systému, analýzu získaných frakcí a jejich vzájemné kvantitativní porovnání. Individuální frakce pak byly analyzovány pomocí Western blotu pro charakterizaci celého systému na základě sledování NHR-60 specifickou protilátkou nebo na detekci diferencially exprimovaných proteinů následnou LC/MS/MS (liquid chromatography – tandem mass spectrometry) s využitím natrávení trypsinem separace LC (s kolonou Magic-C18 (0.180 × 150 mm, 200 Å, 5 µm — Michrom Bioresources, Auburn, CA), následnou gradientovou elucí a hmotnostní analýzou provedenou na přístroji LCQDECA Ion Trap Mass Spectrometer (ThermoQuest, San Jose, CA, USA) spojeným s iontovým zdrojem (Nanoelectrospray Ion Source). Hmotnostní spektra byla analyzována programem SEQUEST™ s napojením na databázi SwissProt. Detaily jsou uvedeny v příložené publikaci (Kostrouch et al. 2014).

2.4 .Metody použité v analýze intracelulárního rozložení editovaného *mdt-28* exprimujícího GFP::MDT-28 a transgenních linií *C. elegans* nesoucích extrachromosální konstrukty exprimující MDT::GFP

2.4.1.Editované a transgenní line

Tři linie *C. elegans* exprimující zelený fluorescenční protein (GFP) byly použity jako výchozí materiál pro imunoprecipitaci s využitím GFP jako epitopu. Jedna linie exprimující samotný GFP byla použita jako kontrolní materiál k odlišení proteinů, které se váží na povrch neadsorbovaných agarózových mikroparticulí nebo na GFP. Jako experimentální protein byly použity dvě linie, jedna s editovaným genem *mdt-28* vedoucí k expresi MDT-28 s připojeným GFP na N-konci MDT-28 a druhá exprimující MDT-28 s připojeným GFP na C-konci MDT-28. Druhá transgenní linie byla připravena ve formě extrachromosálního konstrukt (extrachromosomal arrays). Expresní vzorec těchto linií je popsán v připojené publikaci (Kostrouchova et al. 2017). Původní popis linií je v publikaci (Kostrouchova et al. 2017).

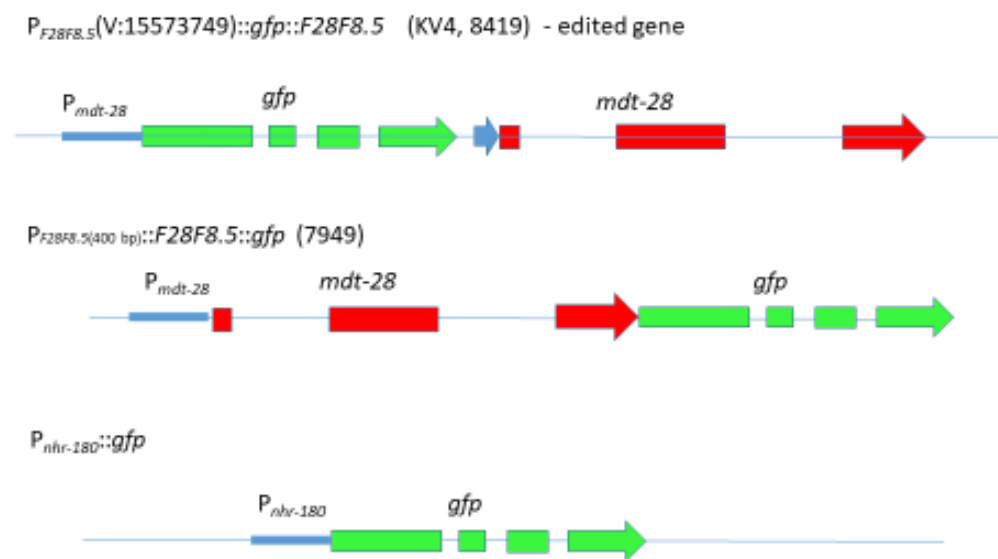
Zkrácená charakterizace linií je následující:

1. Linie KV4 (8419) nesoucí editované alely F28F8.5 do formy *gfp::F28F8.5* v jejich normální genomické lokalizaci $P_{F28F8.5}(V:15573749)::gfp::F28F8.5$ vedoucí k expresi GFP::MDT-28.
2. *C. elegans* linie 7949 nesoucí extrachromosální konstrukt $P_{F28F8.5(400\text{ bp})::F28F8.5::gfp}$ regulovaný vnitřním promotorem o délce 400 párů bazí byla spojena s upraveným genem *gfp* s vloženými umělými introny, které byly amplifikovány z vektoru pPD95.75 a ukončeny 3' UTR (3' nepřekládanou oblastí) převzatou z genu *unc-54*. Konstrukt byl dále doplněn selekčním markerem

pRF4 způsobujícím rolující fenotyp pro snadnější výběr transgenických organismů (Kostrouchova et al. 2017).

3. Kontrolní transgenická linie exprimující samotný GFP z extrachromosomálního konstruktu nesoucího gen *gfp* regulovaný promotorem převzatým z genu *nhr-180* (Kostrouchova et al. 2018).

Následující schéma použitých linií je převzato z publikace Yilma et al. (in Press).



Obr. 3 Schematické znázornění použitých linií.

2.4.2. Laboratorní velkoobjemové kultury *C. elegans*

C. elegans byly kultivovány na Petriho miskách pokrytých agarozovým gelem s médiem podporujícím růst hliště a bakteriálním kmenu *Escherichia coli* OP50, které slouží jako potrava hliště (Brenner 1974). Kultury byly inkubovány při teplotě 22.5° C v omezeném osvětlení dokud

nedosáhly podobné density hlístic (obvykle během 4 dnů). Transgenní *C. elegans* byly kontrolovány na udržení exprese transgenů a kultury, které splňovaly kritérium minimálně 60% organismů s viditelnou expresí fluorescenčního **márkeru** byly separovány a zmrazeny před dalším použitím.

2.5. Metoda GFP-TRAP

System GFP-TRAP zakoupený od firmy Chromotek (<https://www.chromotek.com/products/nano-traps/gfp-trap/>) byl použit na separaci samotného kontroního GFP nebo MDT-28 s připojeným proteinem GFP na N- nebo C- konci a k nim navázaných proteinů. Editovaná linie byla stabilní a nevyžadovala žádnou další selekční kontrolu. Naproti tomu linie nesoucí extrachromosomální konstrukty (arrays) s MDT-28 s připojeným GFP na C-konci vykazovala trend ztrácení transgenů během kultivace ukazující na negativní biologickou aktivitu fúzního proteinu. Tato linie byla proto kontrolována pomocí fluorescenční mikroskopie s použitím mikroskopu Olympus SZX12 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

Kultury, které splnily kritéria pro další použití byly převedeny do vodních suspenzí a promytím zbaveny zbytků bakteriální potravy. Výsledné vzorky s objemem od 1 do 2.6 ml byly použity pro další experimenty.

Pro metodu GFP-TRAP byly vzorky převedeny do likvidní formy s přidáním lyzujícího pufru s inhibitory proteáz (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a sonikovány 10 krát po dobu 15 s (with 45 s přestávkou) při 0° C (UP50H Ultrasonic Processor, Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Německo). Vzorky

byly centrifugovány 25 min. při 18600 xg a 4° C a supernatant byl skladován při -20° C. Imunoprecipitace metodou GFP-TRAP byla pak provedena podle návodu producenta.

Hmotnostní spektrometrie byla dále provedena po převedení materiálu imunoprecipitovaného spolu s imunitními partikulami do roztoku expozicí v 100 mM bikarbonátu triethylammonia (TEAB) s 1% sodným deoxycholátem (SDC). Cysteiny byly redukovány roztokem 5 mM (konečná koncentrace) tris(2-carboxyethyl)phosphinu (TCEP) a to při 60 °C, 60 min. a blokovány 10 mM (konečná koncentrace) methyl methanethiosulfonátem (MMTS) (Thermo Fisher Scientific) po dobu 10 min. při 22 °C.

Další detaily jsou popsány v příloženém rukopisu publikace přijaté do tisku (Yilma et al. 2019). Metoda využila *n*LC/MS/MS analýzu spojenou s hmotnostní spektrometrií provedenou na přístroji Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT- qIT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Data byla analyzována s využitím programu MaxQuant (version 1.5.3.8) (Cox et al. 2014). Kvantifikace byly vypočteny pomocí programu Perseus 1.5.2.4 (Masuda et al. 2008; Cox et al. 2014; Hebert et al. 2014; Tyanova et al. 2016).

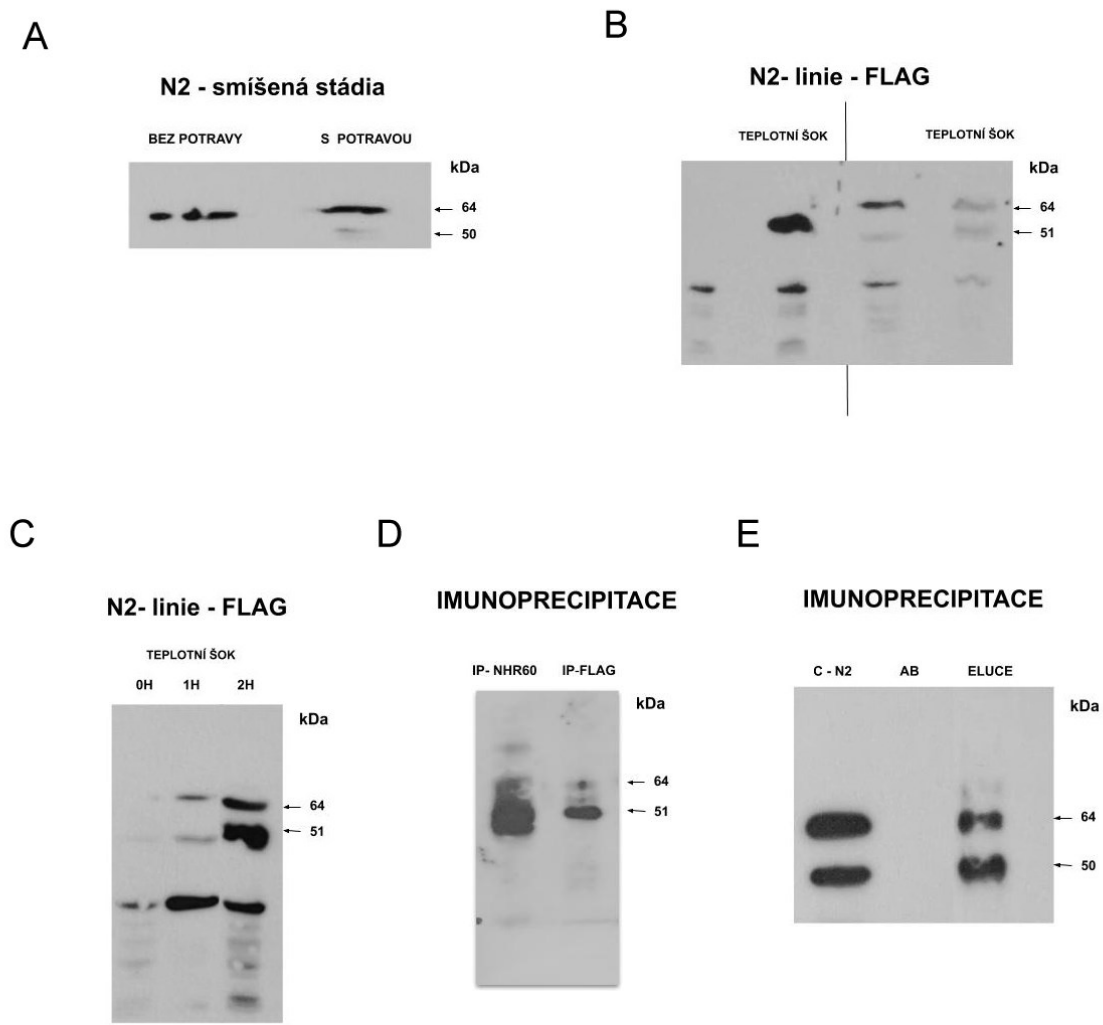
Neprocesovaná data byla uložena do veřejně přístupné databáze <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/> pod číslem PXD015552 (**Project DOI:** 10.6019/PXD015552, **Username:** reviewer73133@ebi.ac.uk, **Password:** 2l2c gHCZ).

3. Výsledky

3.1. Proteomická charakterizace jaderného receptoru NHR-60. NHR-60 je exprimován ve dvou proteinových formách jejichž vzájemný poměr je závislý na stresových podmínkách

Experimenty zaměřené na další charakterizaci NHR-60 na proteinové úrovni pomocí imunoblotingu detekovaly obě proteinové formy o velikostech 50 kDa a 64 kDa v různých vzájemných poměrech při použití lyzátů připravených z jednotlivých kultur *C. elegans*.

Pro možné monitorování vlivu density hlístic nebo množství potravy byla porovnávání exprese imunodetekovatelného NHR-60 v kulturách s dostatkem potravy a v kulturách vystavených hladovění. Při hladovění se výrazně snížila exprese protein o velikosti 50 kDa a naopak intenzita vyšší formy se výrazně zvýšila (Obr. 4 , Panel A), což naznačuje, že by se mohla uptaňovat posttranslační modifikace navozená stresovými podmínkami. Ve shodě s tím, vystavení kultur teplotnímu šoku 34° C po dobu 30 min. vedlo také k výraznému zvýšení detekce proteinu o větší molekulární hmotnosti, které bylo doprovázeno snížením detekce NHR-60 o velikosti 50 kDa.



Obr. 4 Detekce NHR-60 N2 *C. elegans* a v transgenní linii nesoucí extrachromosomální konstrukt (array) z níž je exprimován FLAG-NHR-60 pod regulací teplotním šokem řízeným promotorem. Panel A ukazuje nejčastější vzorec detekce proteinů rozpoznávaných v lyzátech metodou Western blotu protilátkou 4529 namířenou proti NHR-60. Nejvýraznější protein rozpoznávaný protilátkou má velikost 64 kDa, méně zřetelný je protein o velikosti 50 kDa, který je viditelný jen v kultuře s dostatkem potravy. Panel B ukazuje imunodetekci ve Western blotu protilátkou vytvořenou proti sekvenci FLAG v lyzátech z transgenních *C. elegans* nesoucích transgen FLAG-NHR-60 regulovaný promotorem řízeným teplotním šokem. Pravá strana panelu ukazuje stejnou situaci v detekci s protilátkou proti 4529 namířenou proti NHR-60. Výsledek ukazuje počínající expresi FLAG-NHR-60 po 30 minutách inkubace po teplotním šoku a detekci protilátkou 4529. Panel C

ukazuje stejnou situaci jako panel B v detekci s protilátkou proti peptidu FLAG v časovém rozmezí bez zahřátí kultury a s aplikací teplotního šoku a inkubací 1 a 2 hodin. Výsledek dokládá tvorbu proteinu s připojenou sekvencí FLAG ve dvou formách, 50 kDa a 64 kDa. Panel D ukazuje detekci imunoreaktivních proteinů detekovaných protilátkou 4529 namířenou proti NHR-60 v imunoprecipitátech precipitovaných protilátkou proti sekvenci FLAG a protilátkou 4529. Výsledek ukazuje, že imunoprecipitace protilátkou proti sekvenci FLAG precipituje protein o velikosti 64 kDa rozpoznávaný protilátkou 4529. Panel E ukazuje detekci proteinů rozpoznávaných protilátkou 4529, namířenou proti NHR-60 v lyzátu z transgenních linií *C. elegans* exprimujících nadměrné množství NHR-60 z transgenní podregulací teplotním šokem řízeným receptorem. Detekce je patrná v primárním lyzátu z této transgenní linie a z eluovaných proteinů po imunoprecipitaci, ale ne v samotných agarozových partikulích s navázanou protilátkou 4529. Výsledky podporují, vytváření vyšší formy NHR-60 o velikosti 64 kDa.

K další charakterizaci byla použita metoda imunoprecipitace a to ve dvou variantách. První použila imunoprecipitaci s králičí polyklonální protilátkou 4529 vytvořenou proti NHR-60 a druhá použila myší monoklonální protilátku proti sekvenci FLAG. K tomu byly použity dvě linie s extrachromosomálním konstruktem (extrachromosomal arrays) nesoucí genovou sekvencí *nhr-60* s připojenou sekvencí kódující pro peptid FLAG na 5' konci (s vloženým kodonem START). Druhá linie nesla transgen obsahující *nhr-60* regulovaný promotorem ovládaným teplotním šokem.

Proteinové lyzáty z těchto linií byly vyšetřeny pomocí Western blotu (s protilátkami proti FLAG a protilátkou 4529 proti NHR-60) nebo metodou imunoprecipitace se stejnými protilátkami. Materiál získaný pomocí imunoprecipitace byl pak vyšetřen jednak metodou Western blotu se stejnými protilátkami (použitými v navzájem opačném pořadí) (Obr. 4) nebo pomocí hmotnostní spektrometrie. K tomu byly použity oblasti gelů, jejichž poloviny byly vyšetřeny metodou WB na pozici proteinů rozpoznávaných protilátkami.

Hmotnostní spektrometrie prokázala NHR-60 precipitovaného protilátkou 4529 v pozici 50 kDa a to jak při precipitaci protilátkou proti NHR-60, tak při precipitaci protilátkou proti sekvenci FLAG.

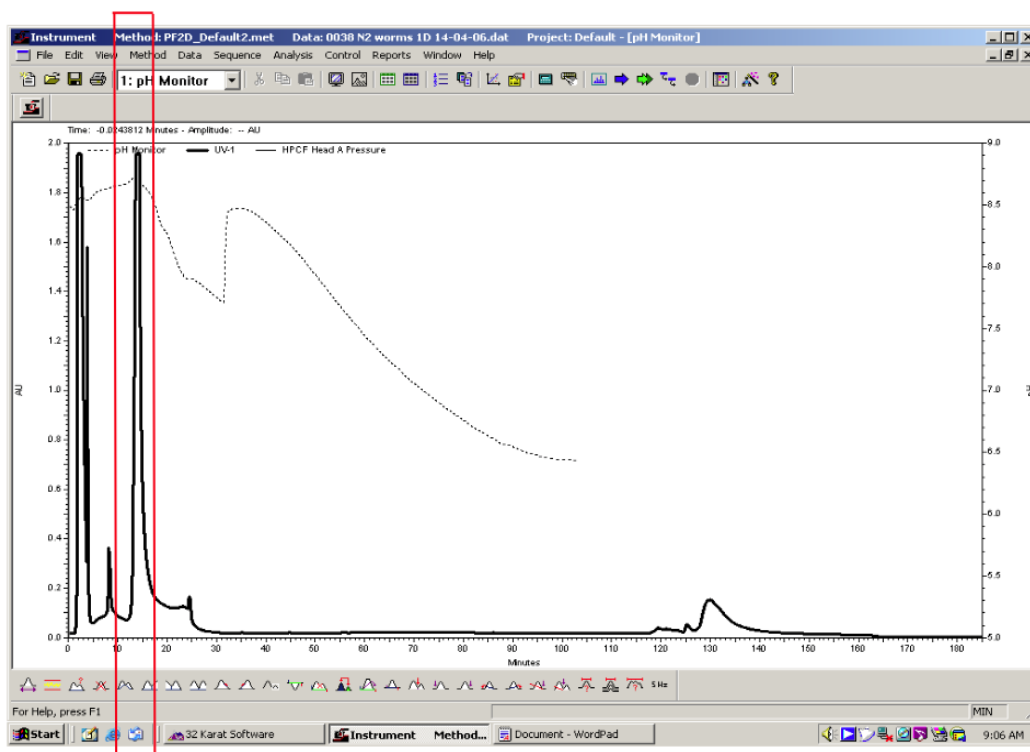
V pozici 64 kDa však NHR-60 detekován nebyl. V této pozici byl při precipitaci protilátkou proti sekvenci FLAG detekován s velkou spolehlivostí protein HSP-1.

3.2. Charakterizace separace proteinu NHR-60 v systému dvoudimenzionální chromatografie

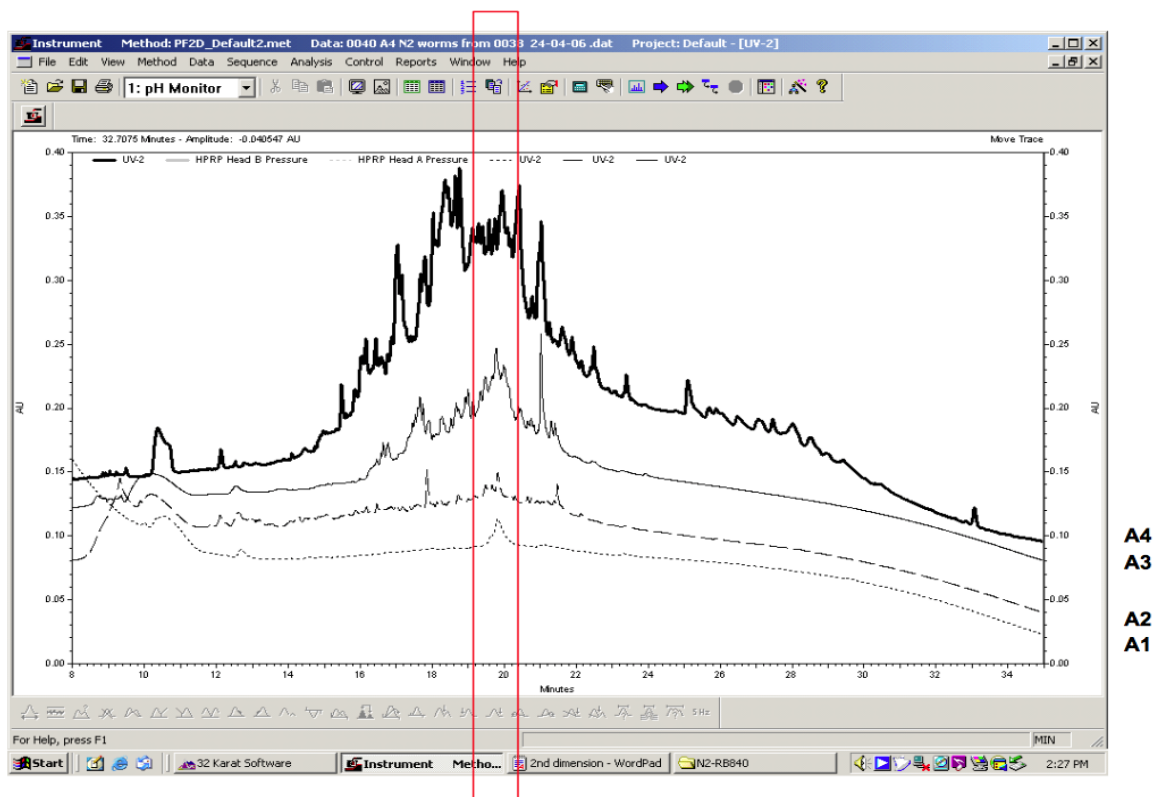
Limity a separační schopnosti dvoudimenzionální chromatografické separace a jejího použití pro komparativní analýzu experimentálních a kontrolních proteomů získaných z velkoobjemových kultur *C. elegans* byly testovány pomocí protilátky vytvořené pro rozpoznávání NHR-60. Kultura *C. elegans* obsahující všechna stadia byla podrobena standardnímu postupu v metodě vyvinuté firmou Beckam-Coulter (Proteome Lab, PF2D) a veškeré frakce prvního rozměru separace (podle chromatofokusace) byly vyšetřeny metodou Western Blotu. NHR-60 (o velikosti 64 kDa) byl detekován v jediné frakci (Obr. 5 ,Obr. 6 a Obr. 7). Tato frakce byla separována ve druhém rozměru (podle hydrofobicity) a frakce byly opět analyzovány metodou Western blotu. NHR-60 (64 kDa) byl opět detekován v jediné frakci (Obr. 7 a Obr. 9).

Nezávislý experiment za stejných podmínek vedl k separaci proteinu NHR-60 (64 kDa) při stejných chromatografických časech a prokázal reproducibilitu metody a její vhodnost pro komparativní znázornění porovnávaných proteomů.

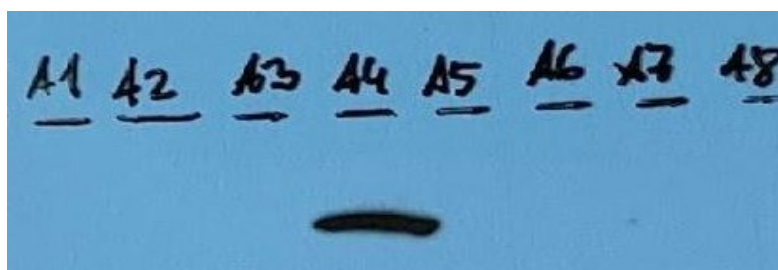
Komparativní dvoudimenzionální chromatografie pak prokázala celoproteomové kvantitativní změny při experimentálním navození nadměrné exprese proteinu BIR-1 .



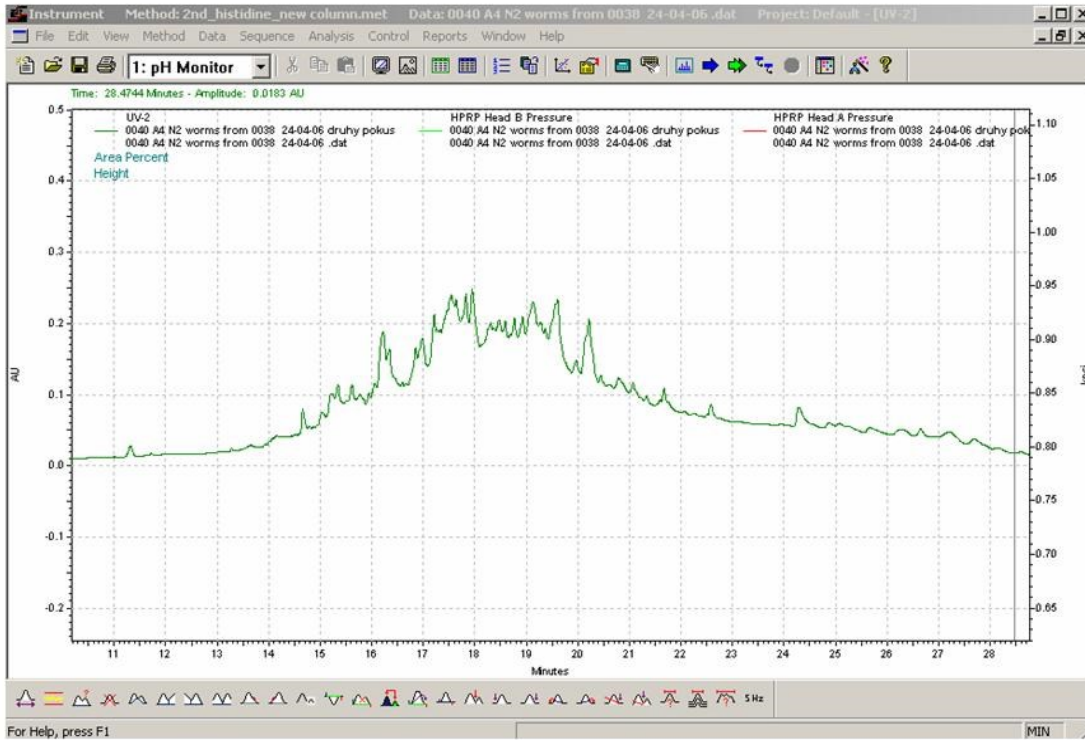
Obr. 5 Chromatogram prvního rozměru separace proteinového lyzátu Metodou ProteomeLab PF2D.Červený rámeček naznačuje separaci frakcí A1 až A8. Tmavá linie ukazuje kontinuální absorbanci eluátu. Tečkovaná linie pak ukazuje aktuální naměřené hodnoty pH vztažené k elučnímu času. Poměrně velký propad hodnoty pH pravděpodobně neovlivnil reprodučibilitu metody.



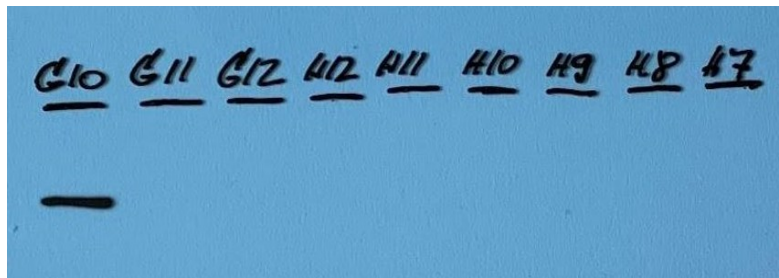
Obr. 6 Souborné chromatogramy (Absorbance A_{214}) druhého rozměru separace frakcí A1 až A4.



Obr. 7 Imunodetekce NHR-60 pomocí protilátky 4529 ve frakcích získaných po prvním rozměru separace. Protein o velikosti 64 kDa je detekován v jediné primární frakci.



Obr. 8 Chromatogram frakce A4 druhého rozměru separace. Absorbance A_{214} ukazuje separaci do frakcí z různými spektrofotometrickými absorpcemi.



Obr. 9 Detekce protein NHR-60 ve frakcích druhého separačního rozměru. NHR-60 je separován v jediné chromatografické frakci.

3.3. Proteomická charakterizace interaktomu mediátorové podjednotky MDT-28

V druhé části práce jsem se zaměřil na identifikaci proteinových interakcí Mediátorové podjednotky MDT-28. Pro detekci proteinů interagujících s MDT-28 *in vivo* byla použita linie *C. elegans* s editovaným genem *mdt-28* a komerčně dostupný systém GFP-Trap, který imunoprecipituje proteiny spojené s proteinem GFP. Pro kontrolu a vyloučení proteinů nespecificky vázanými proteinem samotným nebo povrchem neabsorbovaných partikulí byla využita linie exprimující samotný GFP.

Jako kritérium pro pozitivní detekci interagujícího proteinu byla použita hodnota 18 a identifikace nejméně dvou peptidů. K označení proteinu jako protein interagující s MDT-28 byly označeny jediné proteiny pod stanovenou hladinou ve všech čtyřech kontrolních experimentech v hodnocení programem Perseus.

Zcela prominentně vystoupily proteiny, které jsou známé podjednotky Mediátorového komplexu a zahrnovaly především podjednotky modulu Hlavy: MDT-6, MDT-8, MDT-11, MDT-17, MDT-20, MDT-22 a MDT-30. Mezi interagujícími proteiny byl také nalezen protein MDT-14, který pravděpodobně tvoří páteř celého Mediátoru a je klasifikován jako protein Těla Mediátoru. Ostatní podjednotky Mediátorového komplexu a to jak modulu těla, tak ocasu Mediátoru nalezeny nebyly při stanovených kritériích selekce. Podjednotka MDT-18 byla nalezena ve čtyřech experimentech ale s menší signifikancí založené na identifikaci jediného peptidového fragmentu (Tabulka 1).

Tabulka 1. Podjednotky Mediátorového komplexu identifikované jako interaktory proteinu MDT-

28

	Ctrl 1	Ctrl 2	Ctrl 3	Ctrl 4	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
	GFP	GFP	GFP	GFP	C-term (7949)	C-term (7949)	C-term (7949)	N-term (8419)	N-term (8419)	N-term (8419)
MDT-6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
MDT-8	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
MDT-11	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
MDT-14	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
MDT-17	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MDT-20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MDT-22	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
MDT-28	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
MDT-30	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+

Tabulka 1. Detekce předpovězených podjednotek Mediátorového komplexu identifikovaných jako interaktory proteinu MDT-28. Experimenty označené jako Ctrl 1 až 4 jsou proteiny separované z linií *C. elegans* exprimujících samotný GFP. Linie exprimující C-terminálně označený MDT-28 (MDT-28::GFP) exprimovaný z extrachromosomálního konstruku (arrays) jsou označené jako Exp 1 to 3 (vyznačené žlutě) a N-terminálně označený MDT-28 (GFP::MDT-28) exprimovaný z

editovaného genu (v obou alelách) je v oblasti tabulky vyznačené zelenou barvou (a značené Exp 4 a 6). Zatímco kontrolní experimenty neukazují na precipitaci žádných Mediátorových podjednotek, linie označené GFP interagují s vyznačenými podjednotkami Mediátoru.

3.4. MDT-28 vykazuje asociaci s dalšími strukturními proteiny a enzymy

Srovnání pozitivních dat ze všech experimentů vedlo k identifikaci poměrně malého počtu proteinů, které mohou být klasifikovány jako interagující proteiny s MDT-28 při aplikaci námi zvolenými kritérii (Tabulka 2).

Tato skupina zahrnovala proteiny jejichž funkce v genové expresi je známa, nebo mají jinou známou jadernou regulační funkci. Některé proteiny identifikované s velkou pravděpodobností jako MDT-28 interaktory patřily mezi enzymy, nebo v současné době nemají známou funkci.

Méně překvapivě některé identifikované proteiny jsou klasifikovány jako chromatin organizující protein, jaderné transportery nebo jadéřkové proteiny. Dva proteiny, klasifikované jako silné interaktory jsou klasifikovány jako ribozomální proteiny RPL-24.2 a RPL-29.

Ucelenou skupinu s zatím těžko vysvětlitelným významem tvořily mitochondriální ribozomální proteiny a zahrnovaly protein malé podjednotky MRPS-2, MRPS-5, MRPS-6, MRPS-7, MRPS-15 a MRPS-26. Další skupina proteinů se váže ke komplexu Ubiquinol-cytochrom C oxidoreductasy a zahrnovala protein UCR-1.1, UCR-2.1, UCR-2.2 and UCR-2.3 a UCR-11.

Tabulka 2. Další proteiny imunoprecipitované s proteinem MDT-28

	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	GO/ poznámka
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	
	GFP	GFP	GFP	GFP	C-(7949)	C-(7949)	C-(7949)	N-(8419)	N-(8419)	N-(8419)	
ARX-1		-	-	-	-	+	+	+	+	-	Vazba aktinu
DHC-1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Enzym Cytoskeleton
EKL-4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Corepressor
GLY-7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	N/C enzym Golgi
HECD-1	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	E3 ligáza Jaderný protein
HRP-2	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	Ribonukleo- protein
IMA-3	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	Jaderný lokalizační signál
LET-716	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Vazba nukleových kyselin

NGP-1 GNL2 homol.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Enzym GTPáza, Nonsense mediated decay
RPL- 24.2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
RPL- 29	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
SWAN -1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	N/C enzym GTPáza
VBH-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	Helikáza

Tabulka 2. Detekce proteinů interagujících s MDT-28 ve vzorcích imunoprecipitovaných z kontrolních experimentů (označených jako Ctrl 1 až 4) založených na lini *C. elegans* exprimující samotný GFP, linií exprimující C-terminálně označený MDT-28 (MDT-28::GFP) exprimovaný z extrachromosomálního konstrukt (arrays) (označeno jako Exp 1 až 3, žluté buňky tabulky) a N-terminálně označený MDT-28 (GFP::MDT-28) exprimovaný v *C. elegans* lini s editovaným genem *mdt-28* (označeno jako Exp 4 až 6, zelené buňky tabulky). GO – genová ontologie, možné jaderné a cytoplazmatické funkce identifikovaných proteinů. V souhrnu tyto experimenty ukazují, že MDT-28 vykazuje interakce s podjednotkami tvořícími modul hlavy Mediátorového komplexu *C. elegans*.

4. Diskuse

4.1. Analýza regulace genové exprese na proteomické úrovni

V experimentální práci vedoucí k této disertaci jsme se snažili použít proteomické metody k analýze mechanismu řízené genové exprese. V první části práce vázané k této disertaci (Kostrouch et al. 2014) jsme při snaze najít vazebné proteiny proteinů BIR-1 a SKP-1 našli proteiny, které nespádají do předpokládaných kategorií, ale naopak zahrnovaly proteiny strukturní, enzymy a proteiny zatím funkčně nezařazené u SKP-1 (který je ortholog prokázaného transkripčního koregulátoru) a naopak v případě BIR-1, který má prokázanou cytoskeletální funkci jsme identifikovali transkripční faktory. Tento výsledek jsme získali v přístupech, které lze považovat za přístupy bez předchozího racionálního výběru (Yeast Two-Hybrid Screen). Výsledky tak dovolovaly postavit hypotézu, že proteiny, které jsou primárně strukturní, se mohou zapojovat do regulačních sítí genové exprese, jestliže se nemohou zabudovat do buněčných struktur a stanou se součástí “volného proteomu”. Volný proteom by pak představoval proteiny dostupné interakcím s regulačními komplexy v cytoplazmě a v jádře (Kostrouch et al. 2014).

Pro testování této hypotézy jsme zvolili metodu komparativní dvoudimenzionální chromatografie, kterou jsme chtěli vizualizovat změny na úrovni proteomu synchronizovaných kultur *C. elegans* s krátkodobě navozenou nadměrnou expresí proteinu BIR-1.

Práce předkladatele této disertace byla zaměřena na určení chromatografické charakterizace proteinu, proti kterému jsme měli vytvořenou protilátku, která umožnila vizualizovat chromatografickou separaci tohoto proteinu v systému dvoudimenzionální chromatografie přístrojem ProteomeLab PF2D dostupným komerčně a reprodukcibilitu metody.

Jaderný receptor NHR-60 představoval zajímavý cíl proteomické analýzy z dalšího důvodu. NHR-60 je v regulační kaskádě pod jaderným receptorem NHR-23 a vyznačuje se dvěma zvláštnostmi: na proteinové úrovni je exprimován jako dvě distinktní formy s velikostí přibližně 50 kDa a 64 kDa. Přitom je známa jediná forma mRNA kódující pro tento receptor a to pro protein, který má vypočítanou molekulární hmotnost 50 kDa. Druhou zvláštností NHR-60 je jeho intracelulární lokalizace, která je převážně perinukleární, nebo nukleární v oblasti vázané na jaderný obal (Simeckova et al. 2007).

Práce předkladatele této disertace byla zaměřena na proteinovou charakterizaci NHR-60 a to na určení podstaty a významu existence dvou proteinových formem NHR-60 a na nalezení proteinů interagujících s NHR-60. Experimenty ukázaly, že vyšší forma NHR-60 vzniká na posttranslační úrovni pravděpodobnou posttranslační modifikací. Experimenty dále ukázaly, že NHR-60 je konvertován na vyšší proteinovou formu v závislosti na stresu vyvolaném hladováním nebo teplotním šokem. Proteinovou podstatu této modifikace se zatím nalézt nepodařilo. Selhání proteomických metod v určení této předpokládané posttranslační modifikace může spočívat v chybění modifikačního proteinu v databázích, které jsme použili k hmotnostní spektrometrii zaměřené na stanovení této modifikace nebo poměry ve vyšetřovaných frakcích.

Zatímco výsledky dostatečně podporují snížení detekce menší formy NHR-60 ve spojení se stresem, a tedy zapojení stresu do regulační kaskády NHR-23 na úrovni NHR-60, podstata proteinu o velikosti 64 kDa rozpoznávaného protilátkou jasná není. Dva směry podporující existenci větší formy NHR-60 pramení z doloženého snížení detekce vyšší formy po aplikaci specifické RNA interference namířené proti kódující sekvenci NHR-60 (Simeckova et al. 2007). Výsledky spojené s touto disertací jsou v souladu s publikovanými údaji. Detekce transgenního NHR-60 s připojenou sekvencí FLAG protilátkou specifickou pro sekvenci FLAG ukazuje na

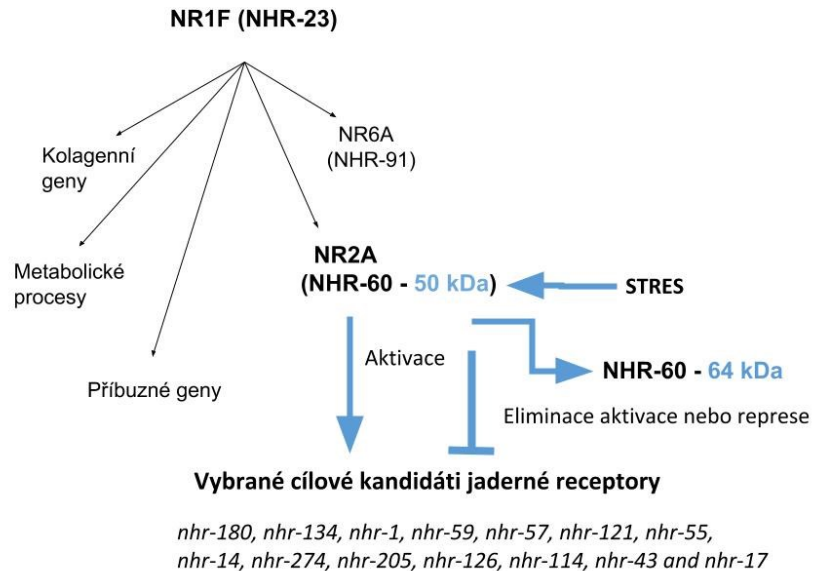
indukovatelnou expresi protein o obou velikostech, 50 (přesněji 51 kDa pro protein s připojenou sekvencí FLAG) i proteinů s přibližnou velikostí 64 kDa. Zatímco protein o velikosti 50 kDa byl také prokázán v imunoprecipitovaných frakcích hmotnostní spektrometrií, NHR-60 nebyl hmotnostní spektrometrií potvrzen v oblastech gelů, kde by mohl být přítomen NHR-60 o větší molekulární velikosti. Velikostně může větší forma NHR-60 odpovídat proteinu monoubiqitinovanému UBQ-2.

4.2. V regulační kaskádě jaderného receptoru NHR-23 je zapojena odpověď na stres

Jaderné receptory vytvářejí regulační sítě a kaskády (Landers and Spelsberg 1992; Goodwin et al. 2000; Swevers and Iatrou 2003). Ty často zahrnují další jaderné receptory, které tak vytvářejí regulační sítě. NHR-23 je hlavní regulátor v kaskádě, která zahrnuje další dva jaderné receptory, NHR-91 a NHR-60 (Simeckova et al. 2007; Kostrouchova and Kostrouch 2015).

Výsledky spojené s touto disertací ukazují, NHR-60 je významným způsobem regulován na proteinové úrovni a to přeměnou jeho formy o velikosti 50 kDa na protein o velikosti 64 kDa.

Imunodetekce obou forem NHR-60 v lyzátech z kultur *C. elegans* pomocí Western blotu ukazuje, že forma o velikosti 50 kDa je minoritní a větší forma převažuje a její detekce je navíc zvýrazněna stresovými podmínkami, především hladověním (Obr.10). Detekce této větší formy NHR-60 protilátkou 4529 při nativních podmínkách je s velkou pravděpodobností zásadně menší, než při denaturujících podmínkách použitých při detekci Western blotem.



Obr. 10 Stres se promítá do regulační kaskády NHR-23 na úrovni NHR-60. Výsledky prezentované v této disertaci ukazují na výrazné snížení exprese NHR-60 o velikosti 50 kDa. Toto snížení je doprovázeno zvýšením detekce formy NHR-60 o velikosti 64 kDa.

V experimentech zacílených na charakterizaci NHR-60 byl identifikován jako koimunoprecipitující protein HSP-1. Uspořádání experimentu (zde uváděného i jiného nezávislého a zde neuváděného experimentu, který také detekoval HSP-1) zahrnovalo expresi nadměrného množství NHR-60. Protože HSP70 a jeho ortolog HSP-1 je znám jako protein reagující s velkým množstvím proteinů, je tato interakce sice pravděpodobně funkční, ale vzhledem k funkci NHR-60 spíše vedlejší. HSP70 váže nově produkované proteiny, proteiné nesprávně složené i proteiny funkční. Nicméně, interakce HSP70 je známá v případě estrogenního receptoru ER alfa (Dhamad

et al. 2016) a v případě funkčního dimeru ekdysonového receptoru EcR-RXR u hmyzu (Arbeitman and Hogness 2000) a podobný mechanismus u NHR-60 proto není vyloučen.

4.3. Proteomická studie zaměřená na interaktory MDT-28 potvrzuje zapojení MDT-28 v modulu Hlavy Mediátorového komplexu

V další části práce představující hlavní zaměření předkladatele této disertace bylo stanovení proteinů interagujících s mediátorovou podjednotkou MDT-28. MDT-28 je velmi významná podjednotka Mediátorového komplexu z několika důvodů.

Tato podjednotka je evolučně recentní, pravděpodobně vzniklá v souvislosti s evolucí mnohobuněčných organismů. Mohla by tedy zprostředkovávat spojení se signály z diferenciačního stavu buňky s regulací genové exprese. Tato podjednotka nebyla známá v hlísticích a proto nemohla být funkčně studována. Práce naší výzkumné skupiny tuto jednotku identifikovala v genomu *C. elegans* a částečně charakterizovala. Použití nezávislé proteomové charakterizace MDT-28 má význam pro další nezávislé doložení její klasifikace a funkčního potenciálu. K tomu bylo využito linie s editovaným genem MDT-28 do formy GFP::MDT-28 a linie nesoucí extrachromosomální array obsahující MDT-28::GFP.

Oba transgenní přístupy podpořily významnou vazbu na další podjednotky modulu Hlavy Mediátoru a podjednotky MDT-14, která tvoří základní kostru Mediátoru rozpoznávaného protilátkou (Soutourina 2018).

U Mediátorové podjednotky jsme očekávali, že budeme nacházet mimo další podjednotky Mediátoru také četné transkripční faktory. Naše očekávání se v tomto směru nenaplnilo. To pravděpodobně ukazuje, že funkční interakce transkripčních faktorů s Mediátorovým komplexem je velmi dynamická a krátkodobá.

Naše výsledky jsou zajímavé ze statistického hlediska. Samotná podstata hmotnostní analýzy použité pro detekci interagujících proteinů je statistická, nebo lépe řečeno pravděpodobnostní. Metoda přiřazuje aktuálně pozorovaná spektra odvozených hmotnostních hodnot hypotetických proteinů k hypotetickým hodnotám proteinů odvozených od známých sekvencí genů a jejich mRNA s různou mírou zahrnutí možných posttranslačních modifikací a pravděpodobnostním zastoupením hmotnostních izotopů jednotlivých atomů. Tento postup je aplikován na hypotetické proteinové fragmenty odvozených proteinů. Metoda tedy může naznačit existenci těch proteinů ve vyšetřovaných frakcích, které byly derivovány na základě primárních dat nukleových databází a jsou uloženy v proteomických databázích. Hodnoty p v programech použitých k interpretaci proteomických dat jsou navíc vztaženy k počtu cílových proteinů posuzovaného genomu.

Naše interpretace získaných dat pro jednotlivé proteiny se však dále zásadně liší pro jednotlivé proteiny a jejich skupiny podle jejich funkční povahy.

Jestliže jsme identifikovali různé cytoskeletální proteiny s velmi malou hodnotou pravděpodobnosti uplatnění nulové hypotézy, tedy malou pravděpodobností že získaný výsledek je náhodný, pak je matematicky vzato pravděpodobné, že pozorovaný protein ve frakci skutečně byl. Jiným problémem je biologická významnost tohoto nálezu.

Pokud byl pro NHR-60 identifikován jako ko-imunoprecipitovaný protein HSP-1, je velká pravděpodobnost, že daný protein byl skutečně specificky imunoprecipitován s NHR-60. Hodnota p , je většinou mnohem nižší než obvykle používané hodnoty $p < 0,001$. Výsledek znamená, že pravděpodobnost, že skutečné existence HSP-1 ve frakci koimunoprecipitující s NHR-60 je statisticky velmi významný.

Další podpora této interpretace je biologická. Heat shock proteiny a specificky HSP-70 jsou známé interaktanty s funkčním dopadem v případě ER alfa a homologů RXR u hmyzu. Funkční dopad může být jak inaktivující se zapojením mechanismu, který se nazývá „unfolded protein response“ odpověď na rozvolněné proteiny, tak aktivující (Melville et al. 2003; Dhamad et al. 2016).

Můžeme tedy uvažovat, že je ještě více pravděpodobné, že získaný výsledek má výpovědní hodnotu. Přesto však výsledky tohoto typu vyžadují další úroveň validace, než by mohly být zařazeny do přijatého stavu poznání.

Jiná situace je v případě identifikace mediátorových podjednotek jako pravděpodobných proteinů interagujících s MDT-28. Pro každou z identifikovaných podjednotek platí podobné uvažování, jako pro ostatní proteiny v případě, že jde jedinou identifikovanou podjednotku. Jde o identifikaci se statistickou signifikancí s hodnotou p maximálně 0,001, ale často ještě mnohem menší v případě identifikace většího počtu peptidických fragmentů jednotlivého proteinu. Jde tedy o poměrně vysokou signifikanci. Protože zapojení těchto jednotek do Mediátorového komplexu je známé a dostatečně experimentálně podložené, je identifikace dvou takových podjednotek násobkem pravděpodobnostních hodnot jejich identifikace, tedy p maximálně dosahující hodnotu 10^{-6} , ale opět v případě menších hodnot pravděpodobností nulové hypotézy obou proteinů jejich

daleko menším součinem. Jestliže bylo v jediném experimentu (Tabulka 1, EXP 6) identifikováno 7 mediátorových podjednotek, pak je již výsledná hodnota pravděpodobnosti uplatnění nulové hypotézy menší než 10^{-21} .

Získaný výsledek tedy velmi významně validuje klasifikaci MDT-28 jako skutečné podjednotky Mediátorového komplexu *C. elegans*.

Metoda, kterou jsme použili patří do oblasti Afinitní purifikace spojené s hmotnostní spektrometrií (Affinity Purification Mass Spectrometry (AP-MS)) a je řazena mezi velmi efektivní přístupy s velkou výpovědní hodnotou pro identifikaci funkčních proteinových komplexů (Keilhauer et al. 2015). V našem experimentálním uspořádání měla velkou výhodu v experimentálním uspořádání s GFP-označeným proteinem exprimovaným z obou editovaných allel cílového proteinu, MDT-28. bylo to umožněno skutečností, že MDT-28 má na N-konci poměrně velkou doménu s vnitřně neuspořádanou oblastí, ke které bylo možno připojit fluorescenční protein bez takového ovlivnění funkce označeného proteinu, které by zabraňovalo jeho základní funkci. Použití nadměrně exprimovaného transgenu vedoucího k expresi MDT-28 označeného na druhé, evolučně zachovalé části proteinu umožnilo také poměrně dobré zachycení interagujících proteinů, i když rozsah identifikovaných proteinů byl menší.

4.4. Možná existence menší formy Mediátorového komplexu obsahujícího MDT-28, MDT-6, MDT-8, MDT-11, MDT-17, MDT-20, MDT-22, MDT-30 a podjednotku Modulu těla MDT-14.

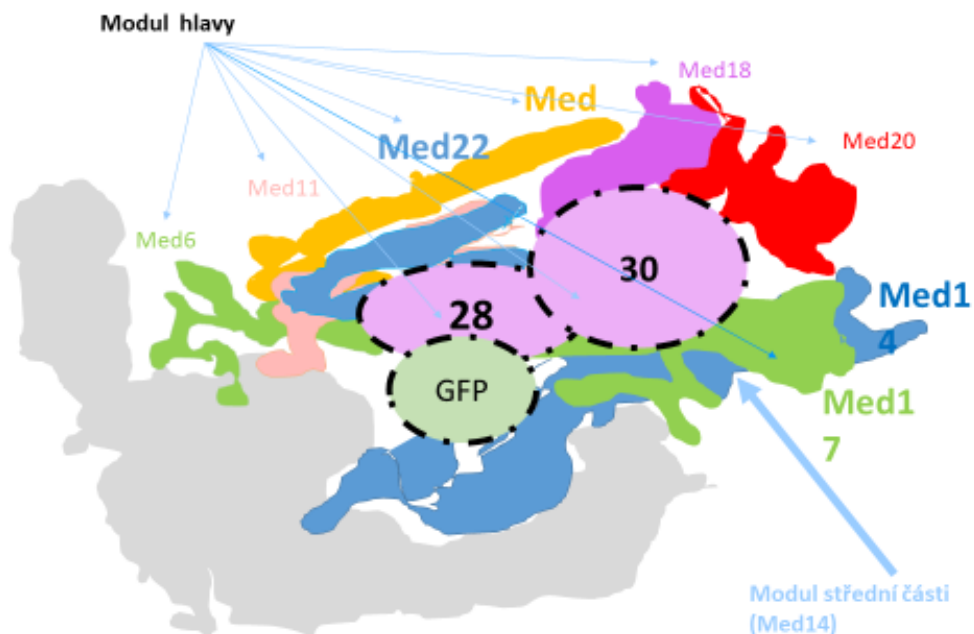
Naše experimenty ukázaly že MDT-28 váže preferenčně soubor několika podjednotek Modulu Hlavy Mediátoru (MDT-6, MDT-8, MDT-11, MDT-17, MDT-20, MDT-22, MDT-30) a podjednotku MDT-14, která tvoří spojující strukturu celého Mediátoru. Protože MDT-28 je poměrně malý protein tvořený jen 202 nebo ve druhé formě 202 aminokyselinami, je pravděpodobné že tyto podjednotky tvoří komplex, spíše než že by byly vázány každá samostatně. Experimenty také podporují určení lokalizace MDT-28 v modulu Hlavy Mediátoru. Interakce se dvěma podjednotkami Mediátoru, MDT-6 a MDT-30 byla rozpoznána již dříve (Kostrouchova et al. 2017). Interakce s podjednotkou MDT-30 je pravděpodobně přímá, protože byla pozorována jako interakce dvou proteinů připravených expresí v bakteriích a nebyla tedy zprostředkována jiným proteinem přítomným v eukaryotních buňkách (Kostrouchova et al. 2017). Výsledky zároveň podporují MDT-30 jako skutečný ortolog MED30.

Výsledný Mediátorový komplex by mohl vypadat podobně jako je naznačeno v Obr. 11

Je postaven na struktuře kvasinkového minimálního Mediátorového komplexu vizualizovaného kryogenní elektronovou mikroskopií (Nozawa et al. 2017). Centrální část tohoto

kvasinkového Mediátorového komplexu je méně vyplněna proteiny a je možné, že právě do této oblasti se MDT-28 a MDT-30 váží, tak jak je naznačeno v příloženém schématu.

Obr. 11. Hypotetický model minimálního Mediátorového komplexu obsahujícího MDT-28



vytvořený na základě publikované struktury Mediátorového komplexu kvasinek (Nozawa et al. 2017). Označení MDT-28 proteinem GFP je vyznačeno (GFP). MDT-28 a MDT-30 jsou vloženy do centrální oblasti kvasinkového mediátoru v níž elektronmikroskopické studie nacházejí nevyplněný prostor.

Přímá interakce MDT-28 a MDT-30 je podporována publikovanými výsledky přímé vazby mezi těmito proteiny připravenými expresí v bakteriích a následně purifikovaných (Kostrouchova et al. 2017). MDT-30 předpovězený na základě porovnání primární struktury (Bourbon 2008) je tedy velmi pravděpodobně předpovězen správně i když se velikostně od

MED30 obratlovců liší sekvencí, která nemá pevně předpověditelnou strukturu a pravděpodobně odpovídá oblasti se skutečnou vnitřně rozvolněnou strukturou (intrinsically disordered region). Ta by pravděpodobně fungovala podobně jako podobná oblast v MDT-28 (Kostrouchova et al. 2017).

Vztah těchto dvou evolučně nových proteinů, MDT-28 a MDT-30 má tedy pravděpodobně zásadní funkční význam přinejmenším v hlísticích.

Intenzivní proteinové interakce MED28 s dalšími podjednotkami hlavy Mediátorového komplexu byly dostatečně dokumentovány (Tsai et al. 2014). Nicméně, v našich experimentech jsme pozorovali menší rozsah podjednotek Mediátorového komplexu koprecipitovaných s MDT-28. Experimentální uspořádání v našich experimentech se od publikovaných prací týkajících se Mediátorového komplexu živočišných buněk odlišují především v tom, že v našem systému jde o celé organismy, jejichž buňky jsou v naprosté převaze již v terminálně diferencované. Nabízí se proto možné vysvětlení, že Mediátorový komplex v terminálně diferencovaných buňkách nemusí mít nutně veškeré podjednotky a mohl by také zahrnovat interakce s proteiny, které nemají primární úlohu v regulaci genové exprese.

4.5. Jaderné a cytoplazmatické proteiny vykazující interakce s MDT-28

Z cytoplazmatických proteinů, které byly očekávány jako interaktory MDT-28 jde především o proteiny ortologní proteinům Grb2, NF2 a cytoskeletální regulační proteiny, které byly prokázány jako protein interagující s MED28 (Wiederhold et al. 2004; Lee et al. 2006; Kostrouchova et al. 2017; Kostrouchova et al. 2018)), tedy SEM-5 (Clark et al. 1992; Downward 1994) a NFM-1 (Josephson et al. 2017). Tyto proteiny v našich experimentech detekovány nebyly. Kandidátní proteiny, které by mohly zprostředkovávat vazbu na výše uvedené proteiny asociované s cytoskeletem však zachyceny byly. Jde především o ARX-1, protein ortologní lidskému ACTR3

(Actin-related protein 3), který je součástí komplexu Arp2/3. Tento komplex se nachází na povrchu buněk a reguluje buněčný tvar a motilitu spolu s F-aktinem a Contractinem (Weed et al. 2000). Spojení ARP2/3 s MDT-28 nemusí být nutně funkcí cytoplazmatickou protože tento komplex je také lokalizován v jádrech a má známou funkci v regulaci polymerace aktinu spojené s genovou expresí, a mechanismem opravy DNA (Schrank et al. 2018). Mediátorový komplex je prokázanou součástí tohoto procesu (Soutourina and Werner 2014).

Dalším proteinem, který byl identifikován jako možný interactor MDT-28 je těžký řetězec dyneinu DHC-1. Byl identifikován s velmi vysokými intenzitami a 22 unikátními peptidy ve dvou ze tří experimentů, které použily N-terminálně označený MDT-28 proteinem GFP. Dynein se účastní celé řady proteinových interakcí jak v cytoplazmě, tak v jádře. Interaguje jak s P53 tak glukokortikoidním receptorem (Harrell et al. 2004).

Naše experimenty dále ukázaly na asociaci dalších proteinů s MDT-28 a to EKL-4, GLY-7, HECD-1, HRP-2, IMA-3, LET-716, NGP-1, VBH-1, DHC-1, RPL-24.2 and RPL-29. Tyto proteiny mohou být také funkčně protože mají jadernou lokalizaci a některých případech také prokázanou funkci spojenou s regulací genové exprese. Proteiny označené jako ribozomální proteiny RPL-24.2 and RPL-29 ve skutečnosti nejsou klasickými ribozomální proteiny a jejich klasifikace je založena pouze na sekvenční podobnosti. Oba tyto proteiny mají pravděpodobně funkci v regulaci genové exprese. RPL-29 je homologní k proteinu HIP/RPL29, který má jak jadernou tak cytoplazmatickou lokalizaci a uplatňuje se ve vývoji mléčné žlázy v dospělosti (Kirm-Safran et al. 2002). RPL-24.2 je ortolog RSL24D1, což je jaderný protein s dosud neznámou funkcí (The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137876-RSL24D1/cell>).

Naše experimenty identifikovaly také omezený set proteinů malé podjednotky mitochondriálních ribosome jako možné interaktory MDT-28. Tyto proteiny byly nalezeny v obou experimentálních uspořádáních s MDT-28 s připojeným GFP na N-konci i na C-konci. Je otázkou do jaké míry je možné považovat tyto proteiny za skutečné interaktory s MDT-28 a to přesto, že v kontrolách nalezeny nebyly a hodnoty jejich identifikace vykazovaly značnou specifitu. Stejně tak je otevřenou otázkou, zda tyto proteiny byly precipitovány s MDT-28 jako komplex držený pohromadě nějakou společnou větší proteinovou nebo ribonukleovou strukturou, nebo adherovaly k imunoprecipitujícím partikulám jednotlivě. Proti první možnosti svědčí chybění dalších ribozomálních proteinů malé podjednotky.

Je také možné, že precipitace mitochondriálních ribozomálních proteinů vznikla až během buněčné dezintegrace v lyzátech z experimentálních kultur. Tato situace však nemusí být jen arteficiální a může odrážet fyziologicky relevantní proces, mitochondriální stresovou odpověď (Hill et al. 2018). Interakce mitochondriálních ribozomálních proteinů s proteiny regulujícími genovou expresi má pravděpodobně úlohu v regulaci vývoje rostlin ribozomální proteiny (Robles and Quesada 2017). Tato představa je dále kompatibilní s navrženým konceptem ribozomální filtru (“The Ribosome Filter Redux” or “The ribosome filter hypothesis”) (Mauro and Edelman 2002; Mauro and Edelman 2007).

4.6. Faktory omezující experimentální výpovědní hodnotu proteomických přístupů

Pro interpretaci výsledků jsou důležitá experimentální omezení jednotlivých metod.

Solubilizace proteinů je základní předpoklad pro práci s proteiny převedených do likvidních fází. Je nejen předpokladem, ale také zásadním omezením tohoto experimentálního přístupu. Ačkoliv

můžeme poměrně snadno získat vodné roztoky a suspenze obsahující proteiny, problémem je reprodukovatelnost takových přístupů, protože jednotlivé proteiny jsou různě zastoupeny v proteinových agregátech a proteinových komplexech, ať už ustanovených ve vzniklé experimentální frakci nebo pocházejících z původních funkčních komplexů.

Pokud je metoda dostatečně reprodukcibilní, můžeme takto vzniklý vzorek považovat za z výchozího materiálu ustanovený solubilní proteom. V případě, že výchozím materiálem jsou organické tkáně nebo celé organismy, pak při použití většiny metod je solubilní proteom jen částečnou frakcí původních proteinů obsažených v tkáních. Pro transkripční faktory, frakce připravené z kultivovaných buněk extrahovaných běžným extrakčním pufrům (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.5% Nonidet P-40, s inhibitory proteáz) nebyly solubilizovány proteiny s vazbou na chromatin pokud nebyly použity DNAázy (Li et al. 2015). V proteinových lyzátech se dále vyskytují agregáty proteinů a to jak vzniklých v původní tkáni nebo buňkách tak později během přípravy lyzátů (Siegel et al. 1966; Kiefhaber et al. 1991; Ignatova and Gierasch 2006; Hands et al. 2011; Tanase et al. 2015).

Tento proces však také probíhá obráceně, komplexy purifikované z buněčného materiálu se během přípravy lyzátů rozpadají a v případě Mediátoru, Uthe et al. pozoroval závislost počtu izolovaných podjednotek na použité purifikační metodě (Uthe et al. 2017).

4.7. Faktory ovlivňující výpovědní hodnotu identifikace interakcí MDT-28 s proteiny se strukturální, enzymatickou nebo neznámou funkcí

Získané hodnoty pro další proteiny potenciálně interagující s MDT-28 pak zasluhují interpretaci složitější. Pro některé proteiny platí předpoklady podobné jako pro proteiny u nichž

nám známá funkční data v současné době nijak v interpretaci nepomáhají a u některých pak pomáhají částečně. U proteinů, které mají známou společnou funkci nebo dokonce strukturní uspořádání, jako je tomu v případě mitochondriálních ribozomálních proteinů nebo buněčných ribozomálních proteinů, se nabízí možnost interpretace jako významnější. Protože však zařazení těchto proteinů je někdy jen na úrovni sekvenční podobnosti, může být věrohodnost signifikance naopak ve skutečnosti zásadním způsobem falešně pozitivně ovlivněna. Z tohoto důvodu jsou sice tyto proteiny jako ko-imunoprecipitované proteiny uváděny, ovšem bez další interpretace s jasnou potřebou další validace.

Zdánlivě velkým problémem uvedených proteomických přístupů v případě MED-28 je fakt, že v jednotlivých experimentech nejsou identifikované interagující proteiny zastoupeny zcela shodně. Naše interpretace výsledků však předpokládá, že je to naopak očekávatelný výsledek.

Vyplývá to z úvah jakým způsobem se funkční proteinové komplexy skládají a rozpadají a jakým způsobem se skládají a rozpadají shluky proteinů a to jak *in vivo*, tak *in vitro* včetně konkrétních metodických kroků v jednotlivých experimentálních přístupech. K vysvětlení této úvahy v této disertaci přikládám zjednodušený pohled na funkční proteinové komplexy a proteinové agregáty a fyzikální a biologické procesy podmiňující jejich existenci, tvorbu a jejich rozpadání.

Proteinové komplexy je možné definovat jako komplexy proteinů, které mají funkční význam. Velké množství buněčných procesů závisí na funkčních proteinových komplexech. Ty vznikají na základě vazebných afinit jednotlivých komponent a jejich fyzikální vektorové skladbě. Biofyzikální jevy, které podmiňují proteinové interakce zahrnují van der Waalsovy interakce, vodíkové vazby, hydrofobní skládání (packing), sterické komplementarity, allostické interakce

indukující konformační změny a kooperativity jednotlivých vazeb a navozených proteinových změn (Yang et al. 2003). Tyto fyzikální jevy se však také uplatňují při vzniku proteinových agregátů (Kiefhaber et al. 1991; Ignatova and Gierasch 2006; Rieger et al. 2006).

Z hlediska rozdělení proteinových funkčních komplexů a proteinových agregátů pro uvažování v této disertaci lze ustanovit, že proteinové komplexy jsou komplexy proteinů, které mají biologické, biochemické a biofyzikální funkční významy a proteinové agregáty jsou shluky proteinů vznikající na základě biologických, často patologických specifických podmínek *in vivo* a *in vitro* v důsledku zvláštních podmínek, například experimentálně navozenou současnou přítomností proteinů, které se obvykle v buňkách do kontaktu nedostávají. Navíc takové proteiny mohou být experimentálními podmínkami ovlivněny ve smyslu změny jejich sterického složení a rozvolnění jejich sekundární struktury.

Funkční proteinové komplexy jsou vysoce dynamické a podléhají změnám jak ve složení jejich proteinových součástí, což je často spojeno s dynamickými a reverzibilními posttranslačními modifikacemi. Proto takové proteinové funkční komplexy často existují v přechodných formách a jejich součásti bývají zapojené do dalších proteinových komplexů s odlišnými funkcemi.

Pro pochopení existence a funkce proteinových komplexů je zásadní jejich identifikace, lokalizace a funkční následky jejich rozpojení.

V tomto pohledu je možné, že společná imunoprecipitace proteinů v jednotlivých experimentech je výsledek existence funkčního komplexu Mediátorového komplexu obsahujícího MDT-28 ve výchozím biologickém materiálu *in vivo*, který se různou měrou rozpadal v jednotlivých experimentech a vedl k identifikaci jádrového mediátoru obsahujícího MDT-28 (MDT-28 containing core Mediator komplex) (což se zdá přijatelnější), nebo se naopak skládal

během jednotlivých experimentálních kroků. U takových proteinů, jako jsou mitochondriální ribozomální proteiny se naopak jeví pravděpodobnější, že k jejich vytváření docházelo během jednotlivých experimentálních kroků naší proteomické analýzy. Tento výsledek by mohl znamenat afinitu a schopnosti těchto proteinů vytvářet proteinové agregáty, které by se však mohly vytvářet také in vivo a být podstatou takových stavů jako je například mitochondriální stres. Tyto úvahy však již přesahují námi vytčené experimentální cíle.

Celkově výsledky proteomických přístupů umocňují experimentální výpovědní hodnotu modelového systému *C. elegans*. Jejich zásadní význam spočívá ve spojení přístupu, který není postaven na předcházející hypotéze vyplývající ze známých experimentálních dat a má tedy předpoklad přinést zcela nová spojení a vest k hypotézám, které je pak možné následně experimentálně testovat.

5. Reference

- Allen, B. L., Taatjes, D. J. (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:155-166.
- Arbeitman, M. N., Hogness, D. S. (2000) Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* 101:67-77. 10.1016/S0092-8674(00)80624-8
- Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Kornberg, R. D. (1999) Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* 283:985-987.
- Beyer, K. S., Beauchamp, R. L., Lee, M. F., Gusella, J. F., Naar, A. M., Ramesh, V. (2007) Mediator subunit MED28 (Magicin) is a repressor of smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 282:32152-32157.
- Bhattacharjee, S., Renganaath, K., Mehrotra, R., Mehrotra, S. (2013) Combinatorial control of gene expression. *Biomed Res Int* 2013:407263. 10.1155/2013/407263
- Bourbon, H. M. (2008) Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res* 36:3993-4008. 10.1093/nar/gkn349
- Bourbon, H. M., Aguilera, A., Ansari, A. Z., Asturias, F. J., Berk, A. J., Bjorklund, S., Blackwell, T. K., Borggrefe, T., Carey, M., Carlson, M., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Emmons, S. W., Fondell, J. D., Freedman, L. P., Fukasawa, T., Gustafsson, C. M., Han, M., He, X., Herman, P. K., Hinnebusch, A. G., Holmberg, S., Holstege, F. C., Jaehning, J. A., Kim, Y. J., Kuras, L., Leutz, A., Lis, J. T., Meisterernest, M., Naar, A. M., Nasmyth, K., Parvin, J. D., Ptashne, M., Reinberg, D., Ronne, H., Sadowski, I., Sakurai, H., Sipiczki, M., Sternberg, P. W., Stillman, D. J., Strich, R., Struhl, K., Svejstrup, J. Q., Tuck, S., Winston, F., Roeder, R. G., Kornberg, R. D. (2004) A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* 14:553-557. 10.1016/j.molcel.2004.05.011
- Bragelmann, J., Klumper, N., Offermann, A., von Massenhausen, A., Bohm, D., Deng, M., Queisser, A., Sanders, C., Syring, I., Merseburger, A. S., Vogel, W., Sievers, E., Vlastic, I., Carlsson, J., Andren, O., Brossart, P., Duensing, S., Svensson, M. A., Shaikhibrahim, Z., Kirfel, J., Perner, S. (2016) Pan-Cancer Analysis of the Mediator Complex Transcriptome Identifies CDK19 and CDK8 as Therapeutic Targets in Advanced Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 10.1158/1078-0432.CCR-16-0094
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- Chughtai, A. A., Kassak, F., Kostrouchova, M., Novotny, J. P., Krause, M. W., Saudek, V., Kostrouch, Z., Kostrouchova, M. (2015) Perilipin-related protein regulates lipid metabolism in *C. elegans*. *PeerJ* 3:e1213. 10.7717/peerj.1213
- Clark, S. G., Stern, M. J., Horvitz, H. R. (1992) *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356:340-344. 10.1038/356340a0
- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13:2513-2526. 10.1074/mcp.M113.031591
- Dettmann, A., Jaschke, Y., Triebel, I., Bogs, J., Schroder, I., Schuller, H.-J. (2010) Mediator subunits and histone methyltransferase Set2 contribute to Ino2-dependent transcriptional

- activation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 283:211-221.
- Dhamad, A. E., Zhou, Z., Zhou, J., Du, Y. (2016) Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ERalpha) and Biochemical Characterization of the ERalpha-Hsp70 Interaction. *PLoS One* 11:e0160312. 10.1371/journal.pone.0160312
- Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D., Asturias, F. J. (2000) Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14307-14310. 10.1073/pnas.260489497
- Downward, J. (1994) The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett* 338:113-117. 10.1016/0014-5793(94)80346-3
- Evans, R. M., Mangelsdorf, D. J. (2014) Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 157:255-266. 10.1016/j.cell.2014.03.012
- Gonzalez-Agosti, C., Xu, L., Pinney, D., Beauchamp, R., Hobbs, W., Gusella, J., Ramesh, V. (1996) The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* 13:1239-1247.
- Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., Maloney, P. R., Willson, T. M., Kliwer, S. A. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6:517-526. 10.1016/s1097-2765(00)00051-4
- Grants, J. M., Goh, G. Y., Taubert, S. (2015) The Mediator complex of *Caenorhabditis elegans*: insights into the developmental and physiological roles of a conserved transcriptional coregulator. *Nucleic Acids Res* 43:2442-2453.
- Hands, S., Sajjad, M. U., Newton, M. J., Wyttenbach, A. (2011) In vitro and in vivo aggregation of a fragment of huntingtin protein directly causes free radical production. *J Biol Chem* 286:44512-44520. 10.1074/jbc.M111.307587
- Harper, T. M., Taatjes, D. J. (2017) The complex structure and function of Mediator. *J Biol Chem*. 10.1074/jbc.R117.794438
- Harrell, J. M., Murphy, P. J., Morishima, Y., Chen, H., Mansfield, J. F., Galigniana, M. D., Pratt, W. B. (2004) Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J Biol Chem* 279:54647-54654. 10.1074/jbc.M406863200
- Hawkins, L. J., Al-Attar, R., Storey, K. B. (2018) Transcriptional regulation of metabolism in disease: From transcription factors to epigenetics. *PeerJ* 6:e5062. 10.7717/peerj.5062
- Hebert, A. S., Richards, A. L., Bailey, D. J., Ulbrich, A., Coughlin, E. E., Westphall, M. S., Coon, J. J. (2014) The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* 13:339-347. 10.1074/mcp.M113.034769
- Hill, S., Sataranatarajan, K., Remmen, H. V. (2018) Role of Signaling Molecules in Mitochondrial Stress Response. *Front Genet* 9:225. 10.3389/fgene.2018.00225
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., Young, R. A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95:717-728.
- Huang, C. Y., Chou, Y. H., Hsieh, N. T., Chen, H. H., Lee, M. F. (2012) MED28 regulates MEK1-dependent cellular migration in human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 227:3820-3827. 10.1002/jcp.24093

- Ignatova, Z., Gierasch, L. M. (2006) Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13357-13361. 10.1073/pnas.0603772103
- Jiang, Y. W., Veschambre, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Kornberg, R. D. (1998) Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8538-8543.
- Josephson, M. P., Aliani, R., Norris, M. L., Ochs, M. E., Gujar, M., Lundquist, E. A. (2017) The *Caenorhabditis elegans* NF2/Merlin Molecule NFM-1 Nonautonomously Regulates Neuroblast Migration and Interacts Genetically with the Guidance Cue SLT-1/Slit. *Genetics* 205:737-748. 10.1534/genetics.116.191957
- Keilhauer, E. C., Hein, M. Y., Mann, M. (2015) Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS). *Mol Cell Proteomics* 14:120-135. 10.1074/mcp.M114.041012
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., Buchner, J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* 9:825-829.
- Kirn-Safran, C. B., Julian, J., Fongemie, J. E., Hoke, D. E., Czymmek, K. J., Carson, D. D. (2002) Changes in the cytologic distribution of heparin/heparan sulfate interacting protein/ribosomal protein L29 (HIP/RPL29) during in vivo and in vitro mouse mammary epithelial cell expression and differentiation. *Dev Dyn* 223:70-84. 10.1002/dvdy.1226
- Kostrouch, D., Kostrouchova, M., Yilma, P., Chughtai, A. A., Novotny, J. P., Novak, P., Kostrouchova, V., Kostrouchova, M., Kostrouch, Z. (2014) SKIP and BIR-1/Survivin have potential to integrate proteome status with gene expression. *J Proteomics* 110:93-106. 10.1016/j.jprot.2014.07.023
- Kostrouch, Z., Kostrouchova, M., Rall, J. E. (1995) Steroid/thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:156-159.
- Kostrouchova, M., Kostrouch, D., Chughtai, A. A., Kassak, F., Novotny, J. P., Kostrouchova, V., Benda, A., Krause, M. W., Saudek, V., Kostrouchova, M., Kostrouch, Z. (2017) The nematode homologue of Mediator complex subunit 28, F28F8.5, is a critical regulator of *C. elegans* development. *PeerJ* 5:e3390. 10.7717/peerj.3390
- Kostrouchova, M., Kostrouch, Z. (2015) Nuclear receptors in nematode development: Natural experiments made by a phylum. *Biochim Biophys Acta* 1849:224-237. 10.1016/j.bbagr.2014.06.016
- Kostrouchova, M., Kostrouchova, V., Yilma, P., Benda, A., Mandys, V., Kostrouchova, M. (2018) Valproic Acid Decreases the Nuclear Localization of MDT-28, the Nematode Orthologue of MED28. *Folia Biol (Praha)* 64:1-9.
- Kostrouchova, M., Krause, M., Kostrouch, Z., Rall, J. E. (1998) CHR3: a *Caenorhabditis elegans* orphan nuclear hormone receptor required for proper epidermal development and molting. *Development* 125:1617-1626.
- Kostrouchova, M., Krause, M., Kostrouch, Z., Rall, J. E. (2001) Nuclear hormone receptor CHR3 is a critical regulator of all four larval molts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7360-7365. 10.1073/pnas.131171898
- Kouns, N. A., Nakielna, J., Behensky, F., Krause, M. W., Kostrouch, Z., Kostrouchova, M. (2011) NHR-23 dependent collagen and hedgehog-related genes required for molting. *Biochem Biophys Res Commun* 413:515-520. 10.1016/j.bbrc.2011.08.124

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 10.1038/227680a0
- Landers, J. P., Spelsberg, T. C. (1992) New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2:19-63.
- Lee, M. F., Beauchamp, R. L., Beyer, K. S., Gusella, J. F., Ramesh, V. (2006) Magicin associates with the Src-family kinases and is phosphorylated upon CD3 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 348:826-831. 10.1016/j.bbrc.2006.07.126
- Li, X., Wang, W., Wang, J., Malovannaya, A., Xi, Y., Li, W., Guerra, R., Hawke, D. H., Qin, J., Chen, J. (2015) Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Mol Syst Biol* 11:775. 10.15252/msb.20145504
- Lu, M., Zhang, L., Sartippour, M. R., Norris, A. J., Brooks, M. N. (2006) EG-1 interacts with c-Src and activates its signaling pathway. *Int J Oncol* 29:1013-1018.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839. 10.1016/0092-8674(95)90199-x
- Masuda, T., Tomita, M., Ishihama, Y. (2008) Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res* 7:731-740. 10.1021/pr700658q
- Mathur, S., Vyas, S., Kapoor, S., Tyagi, A. K. (2011) The Mediator complex in plants: structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (rice) during reproduction and abiotic stress. *Plant Physiol* 157:1609-1627. 10.1104/pp.111.188300
- Mauro, V. P., Edelman, G. M. (2002) The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12031-12036. 10.1073/pnas.192442499
- Mauro, V. P., Edelman, G. M. (2007) The ribosome filter redux. *Cell Cycle* 6:2246-2251. 10.4161/cc.6.18.4739
- Melville, M. W., McClellan, A. J., Meyer, A. S., Darveau, A., Frydman, J. (2003) The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex. *Mol Cell Biol* 23:3141-3151.
- Novac, N., Heinzl, T. (2004) Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3:335-346.
- Nozawa, K., Schneider, T. R., Cramer, P. (2017) Core Mediator structure at 3.4 Å extends model of transcription initiation complex. *Nature* 545:248-251. 10.1038/nature22328
- Nuclear Receptors Nomenclature, C. (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161-163. 10.1016/s0092-8674(00)80726-6
- Paoletti, A. C., Parmely, T. J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Zhu, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Florens, L., Washburn, M. P. (2006) Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18928-18933. 10.1073/pnas.0606379103
- Piras, V., Tomita, M., Selvarajoo, K. (2012) Is central dogma a global property of cellular information flow? *Front Physiol* 3:439. 10.3389/fphys.2012.00439
- Poss, Z. C., Ebmeier, C. C., Taatjes, D. J. (2013) The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48:575-608. 10.3109/10409238.2013.840259
- Reinke, V., Krause, M., Okkema, P. (2013) Transcriptional regulation of gene expression in *C. elegans*. *WormBook*:1-34. 10.1895/wormbook.1.45.2

- Rieger, T. R., Morimoto, R. I., Hatzimanikatis, V. (2006) Bistability explains threshold phenomena in protein aggregation both in vitro and in vivo. *Biophysical Journal* 90:886-895. 10.1529/biophysj.105.066662
- Robinson, P. J., Bushnell, D. A., Trnka, M. J., Burlingame, A. L., Kornberg, R. D. (2012) Structure of the mediator head module bound to the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17931-17935. 10.1073/pnas.1215241109
- Robinson, P. J., Trnka, M. J., Bushnell, D. A., Davis, R. E., Mattei, P. J., Burlingame, A. L., Kornberg, R. D. (2016) Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell* 166:1411-1422 e1416. 10.1016/j.cell.2016.08.050
- Robinson, P. J., Trnka, M. J., Pellarin, R., Greenberg, C. H., Bushnell, D. A., Davis, R., Burlingame, A. L., Sali, A., Kornberg, R. D. (2015) Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *Elife* 4. 10.7554/eLife.08719
- Robles, P., Quesada, V. (2017) Emerging Roles of Mitochondrial Ribosomal Proteins in Plant Development. *Int J Mol Sci* 18. 10.3390/ijms18122595
- Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybaylov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C. (2004) A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14:685-691.
- Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D., Diaz, J. J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* 13:4100-4109. 10.1091/mbc.e02-05-0271
- Schrank, B. R., Aparicio, T., Li, Y., Chang, W., Chait, B. T., Gundersen, G. G., Gottesman, M. E., Gautier, J. (2018) Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature* 559:61-66. 10.1038/s41586-018-0237-5
- Siegel, A., Hills, G. J., Markham, R. (1966) In vitro and in vivo aggregation of the defective PM2 tobacco mosaic virus protein. *J Mol Biol* 19:140-144. 10.1016/s0022-2836(66)80056-6
- Simeckova, K., Brozova, E., Vohanka, J., Pohludka, M., Kostrouch, Z., Krause, M. W., Rall, J. E., Kostrouchova, M. (2007) Supplementary nuclear receptor NHR-60 is required for normal embryonic and early larval development of *Caenorhabditis elegans*. *Folia Biol (Praha)* 53:85-96.
- Soutourina, J. (2018) Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:262-274. 10.1038/nrm.2017.115
- Soutourina, J., Werner, M. (2014) A novel link of Mediator with DNA repair. *Cell Cycle* 13:1362-1363. 10.4161/cc.28749
- Swevers, L., Iatrou, K. (2003) The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkworm paradigm. *Insect Biochem Mol Biol* 33:1285-1297.
- Syring, I., Klumper, N., Offermann, A., Braun, M., Deng, M., Boehm, D., Queisser, A., von Massenhausen, A., Bragelmann, J., Vogel, W., Schmidt, D., Majores, M., Schindler, A., Kristiansen, G., Muller, S. C., Ellinger, J., Shaikhibrahim, Z., Perner, S. (2016) Comprehensive analysis of the transcriptional profile of the Mediator complex across human cancer types. *Oncotarget* 7:23043-23055. 10.18632/oncotarget.8469
- Tanase, M., Zolla, V., Clement, C. C., Borghi, F., Urbanska, A. M., Rodriguez-Navarro, J. A., Roda, B., Zattoni, A., Reschiglian, P., Cuervo, A. M., Santambrogio, L. (2015)

- Hydrodynamic size-based separation and characterization of protein aggregates from total cell lysates. *Nat Protoc* 10:134-148. 10.1038/nprot.2015.009
- Thompson, C. M., Young, R. A. (1995) General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4587-4590.
- Tsai, K. L., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Asturias, F. J. (2014) Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex. *Cell* 157:1430-1444. 10.1016/j.cell.2014.05.015
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731-740. 10.1038/nmeth.3901
- Uthe, H., Vanselow, J. T., Schlosser, A. (2017) Proteomic Analysis of the Mediator Complex Interactome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 7:43584. 10.1038/srep43584
- Verger, A., Monte, D., Villeret, V. (2019) Twenty years of Mediator complex structural studies. *Biochem Soc Trans*. 10.1042/BST20180608
- Wang, K., Nishida, H. (2015) REGULATOR: a database of metazoan transcription factors and maternal factors for developmental studies. *BMC Bioinformatics* 16:114. 10.1186/s12859-015-0552-x
- Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A., Parsons, J. T. (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 151:29-40. 10.1083/jcb.151.1.29
- Wiederhold, T., Lee, M. F., James, M., Neujahr, R., Smith, N., Murthy, A., Hartwig, J., Gusella, J. F., Ramesh, V. (2004) Magicin, a novel cytoskeletal protein associates with the NF2 tumor suppressor merlin and Grb2. *Oncogene* 23:8815-8825.
- Yang, J., Swaminathan, C. P., Huang, Y., Guan, R., Cho, S., Kieke, M. C., Kranz, D. M., Mariuzza, R. A., Sundberg, E. J. (2003) Dissecting cooperative and additive binding energetics in the affinity maturation pathway of a protein-protein interface. *J Biol Chem* 278:50412-50421. 10.1074/jbc.M306848200
- Yilma, P., Kostrouchová, M. J., Talacko, P., Kostrouchová, V., Kostrouch, D., Novák, P., Kostrouchová, M. (2019) Proteomic interactome of *C. elegans* Mediator complex subunit 28 (MDT-28) reveals predominant association with a restricted set of core Mediator subunits and an affinity to additional structural and enzymatic proteins. *Folia Biol (Praha)* In Press.
- Yin, J. W., Wang, G. (2014) The Mediator complex: a master coordinator of transcription and cell lineage development. *Development* 141:977-987. 10.1242/dev.098392
- Zhang, S., Kuhn, J. R. (2013) Cell isolation and culture. *WormBook*:1-39. 10.1895/wormbook.1.157.1