

Abstrakt

Transkripční faktory TEAD hrají důležitou roli v řízení buněčného růstu a diferenciaci. Jejich deregulace je spojována s řadou nádorových onemocnění. Proteiny TEAD rozpoznávají DNA pomocí vysoce konzervované DNA vazebné domény. Ta by mohla představovat slibný cíl terapeutického zásahu pro budoucí protinádorová léčiva.

Cílem této diplomové práce byla produkce DNA vazebné domény transkripčního faktoru TEAD4 prodloužená o nestrukturovanou variabilní část spojující tuto doménu s transaktivací doménou. Jako purifikační kroky byla využita afinitní chromatografie a gelová permeační chromatografie. Následně byl produkovaný protein charakterizován pomocí hmotnostní spektrometrie. Konečným krokem bylo použití nativní elektroforézy k ověření schopnosti produkovaného proteinu vázat DNA.

V průběhu purifikace byla pozorována fragmentace produkovaného proteinu od C-konce. Na základě analýzy spektra z hmotnostní spektrometrie byly popsány tři nejzastoupenější fragmenty produkovaného proteinu. První z forem (55 %) obsahovala aminokyseliny 30–131 proteinu TEAD4, druhá nejzastoupenější forma (18 %) obsahovala aminokyseliny 30–144 a třetí forma (16 %) obsahovala aminokyseliny 30–81. Na závěr byla u produkovaného proteinu potvrzena schopnost vazby DNA, účinnost však byla nižší než očekávaná. Do budoucna je možné uvažovat nad změnou délky produkovaného konstruktů pro snížení vlivu fragmentace na relevantnost studií interakce s DNA.

Klíčová slova: rekombinantní exprese, purifikace proteinu, DNA vazebný protein, transkripční faktor, buněčná signalizace, TEAD4, nativní elektroforéza, hmotnostní spektrometrie