

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Marek Zákopčaník

**Rekombinantní příprava DNA vazebné domény
transkripčního faktoru TEAD4**

Recombinant preparation of DNA binding domain of
transcription factor TEAD4

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Růžena Filandrová

Praha 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne

.....

Bc. Marek Zákopčaník

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

Abstract

Transcription factors play a key role in the management of cell growth and differentiation and their deregulation is associated with many cancers. TEAD proteins utilise highly conserved DNA binding domain to recognise specific DNA sequences. This domain could facilitate new drug design and development.

The goal of this master thesis includes recombinant preparation of DNA binding domain of transcriptional factor TEAD4 extended by a part of an unstructured variable sequence, which connects this domain with transactivation domain. Purification steps include affinity chromatography followed by size exclusion chromatography. The characterization of produced protein was performed by mass spectrometry and finally, native gel electrophoresis was used to prove the ability of the produced protein to bind DNA.

During purification steps, a fragmentation from C-terminus was observed. Based on analysis of the mass spectra, three most represented forms of produced protein were described all of which were fragmented. The most abundant form (55%) consisted of amino acids 30–131 from TEAD4 protein. Second most abundant form (18%) consisted of amino acids 30–144 and the third form consisted of amino acids 30–81. Native gel electrophoresis verified the ability to bind DNA, the efficiency was however lower than expected. Future improvements could include changes in the length of the construct to reduce the effect of fragmentation on the relevance of DNA interaction studies.

Key words: recombinant expression, protein purification, DNA binding protein, transcription factor, cell signaling, TEAD4, native electrophoresis, mass spectrometry

[IN CZECH]

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za poskytnutí prostředí pro vypracování této práce, odbornou pomoc a vedení v průběhu jejího vzniku. Dále můj dík patří Mgr. Růženě Filandrové za cenné základy pro práci a všem členům Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za ochotu při konzultaci mnohorodé problematiky.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	10
Úvod	12
1 Teoretická část	13
1.1 Transkripční faktory.....	13
1.1.1 Responzivní elementy.....	14
1.1.2 Struktura transkripčních faktorů	16
1.1.2.1 Efektorová doména	16
1.1.2.2 DNA vazebná doména	17
1.2 Transkripční faktory TEAD	18
1.2.1 TEAD4	20
1.2.2 DNA vazebná doména.....	23
1.2.2.1 Vazebný motiv.....	25
1.2.3 Transaktivační doména.....	26
1.2.4 Koaktivátory	27
1.2.4.1 YAP.....	27
1.2.4.2 TAZ.....	29
1.2.4.3 VGLL	29
1.3 Cílové geny pro TEAD a jejich funkce.....	30
1.3.1 Role proteinů TEAD v nádorových onemocněních.....	31
2 Cíle práce	33
3 Materiály a metody	34
3.1 Použité chemikálie	34
3.1.1 Chemikálie.....	34
3.1.2 Bakteriální kmeny	35
3.1.3 Vektory a oligonukleotidy	35
3.1.4 Pufry a roztoky	35
3.2 Použité přístroje.....	36
3.3 Použité metody	38
3.3.1 Produkce	38

3.3.1.1	Příprava kompetentních buněk.....	38
3.3.1.2	Transformace kompetentních buněk.....	38
3.3.1.3	Test produkce proteinu TEAD4-DBD long.....	39
3.3.1.4	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného	40
3.3.2	Purifikace.....	41
3.3.2.1	Velkoobjemová produkce TEAD4-DBD long.....	41
3.3.2.2	Izolace proteinů z bakteriální kultury	41
3.3.2.3	Afinitní chromatografie	43
3.3.2.4	Štěpení polyhistidinové kotvy.....	43
3.3.2.5	Gelová permeační chromatografie	44
3.3.3	Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu.....	44
3.3.4	Ověření schopnosti proteinu TEAD4-DBD long vázat dvouřetězcovou DNA	45
3.3.4.1	Příprava dvouřetězcové DNA.....	45
3.3.4.2	Tvorba komplexů proteinu TEAD4-DBD long s DNA a příprava vzorků pro nativní elektroforézu.....	45
3.3.4.3	Nativní gelová elektroforéza	46
4	Výsledky.....	48
4.1	Test produkce TEAD4-DBD long	48
4.2	Purifikace.....	49
4.2.1	Izolace proteinů z bakteriální kultury.....	49
4.2.2	Afinitní chromatografie a odštěpení polyhistidinové kotvy	52
4.2.3	Gelová permeační chromatografie.....	55
4.3	Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu	56
4.4	Ověření schopnosti TEAD4-DBD long vázat dvouřetězcovou DNA	59
5	Diskuze	61
6	Závěr.....	66
	Seznam použité literatury	67
	Příloha 1	74

Seznam zkratek a symbolů

APS	peroxodisíran amonný
ATTS	starší název pro TEA doménu; podle proteinů, ve kterých byla nalezena: AbaA, TEC1, TEF-1 a Scalloped
AXL	gen kódující receptorovou tyrosinkinasu
BIRC2	gen pro bakulovirový inhibitor apoptosy obsahující repetic (z angl. „ <i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing protein</i> “)
Cdx2	cílový gen proteinu TEAD (z angl. „ <i>caudal type homeobox</i> “)
CTGF	gen pro růstový faktor pojivové tkáně (z angl. „ <i>connective tissue growth factor</i> “)
Cyr61	gen kódující angiogenní induktor bohatý na cystein (z angl. „ <i>cystein-rich 61 angiogenic inducer</i> “)
DBD	DNA vazebná doména
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiothreitol
EDN	gen kódující endotelin (z angl. „ <i>Endothelin</i> “)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI-FT-ICR	ionizace elektrosprejem a iontově cyklotronová resonance s Fourierovou transformací
Fgfr2	gen pro receptor fibroblastového růstového faktoru (z angl. „ <i>fibroblast growth factor receptor</i> “)
Gata3	gen kódující transkripční faktor vázající GATA sekvenci DNA
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
LATS	kinasa patřící do Hippo signální dráhy (z anglického „ <i>large tumor suppressor</i> “)
LB médium	Luria-Bertani médium
M-CAT	specifická sekvence DNA, kterou váže TEAD ve svalech (z angl. „ <i>muscle cytosine, adenine, thymine</i> “)
Mcl2	cílový gen proteinu TEAD (z angl. „ <i>myeloid cell leukemia</i> “)
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie

NMR	nukleární magnetická resonance
<i>Oct</i>	gen pro transkripční faktor vázající oktamer (z angl. „ <i>octamer-binding transcription factor</i> “)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
<i>Pax</i>	cílový gen proteinu TEAD (z angl. „ <i>paired box</i> “)
PDZ motiv	strukturní motiv aktivační domény YAP proteinu, akronym z názvu proteinů, ve kterých byl jako první nalezen (PSD95, Dlg1, zo-1)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RE	responzivní elementy
RHAMM	receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou motilitu (z angl. „ <i>receptor for hyaluronan-mediated motility</i> “)
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný
<i>SOX</i>	cílový gen proteinu TEAD (z angl. „ <i>SRY-related HMG-box</i> “, kde <i>SRY</i> je zkratkou pro „ <i>sex-determining region Y</i> “ a HMG „ <i>high mobility group</i> “)
ssDNA	jednovláknová 2-deoxyribonukleová kyselina
TAZ	transkripční koaktivátor s motivem vázajícím se na PDZ (z angl. „ <i>transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i> “)
TBE pufr	Tris-borát-EDTA pufr
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEA	aktivátor enhanceru pro transkripci (z angl. „ <i>transcriptional enhancer activator</i> “)
TEAD	rodina transkripčních faktorů obsahujících TEA doménu (z angl. „ <i>transcriptional enhancer activator domain</i> “)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan
TF	transkripční faktor
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vg	protein Vestigial
VGLL	koaktivátor podobný proteinu Vestigial (z angl. „ <i>Vestigial like</i> “)
YAP	koaktivátor proteinu TEAD (z angl. „ <i>YES-associated protein</i> “)
<i>ZEB2</i>	cílový gen proteinu TEAD (z angl. „ <i>zinc finger E-box-binding homeobox</i> “)

Úvod

Proteiny TEAD tvoří významnou rodinu transkripčních faktorů, která řídí expresi široké palety genů a je tak zapojená do regulace růstu a diferenciace buněk [1,2]. Všichni čtyři zástupci sdílí vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménu a transaktivační doménu, díky které interagují s dalšími koaktivátory. Touto formou jsou zapojeny do konzervované Hippo signální dráhy, jejíž poruchy jsou spojovány s řadou nádorových onemocnění [3,4]. Transkripční faktory TEAD představují možný terapeutický cíl při vývoji protinádorových léčiv. Jedním ze způsobů potlačení vlivu těchto proteinů je inhibice jejich vazby na DNA pomocí blokace DNA vazebné domény.

Tato práce se zabývá přípravou DNA vazebné domény TEAD4 prodloužené o část variabilní sekvence. Cílem práce je purifikace a charakterizace tohoto proteinu a následné ověření schopnosti vázat DNA.

Struktura DNA vazebné domény a princip její vazby na DNA již byla objasněna a pomocí nukleární magnetické resonance a rentgenové difrakce [5,6]. Ačkoli je DNA vazebná doména v rámci jednotlivých zástupců rodiny TEAD téměř identická, její jednotliví zástupci se mírně liší v preferenci DNA sekvencí. Tento rozdíl by mohl být vysvětlen vlivem variabilní sekvence, která spojuje DNA vazebnou doménu s transaktivační doménou.

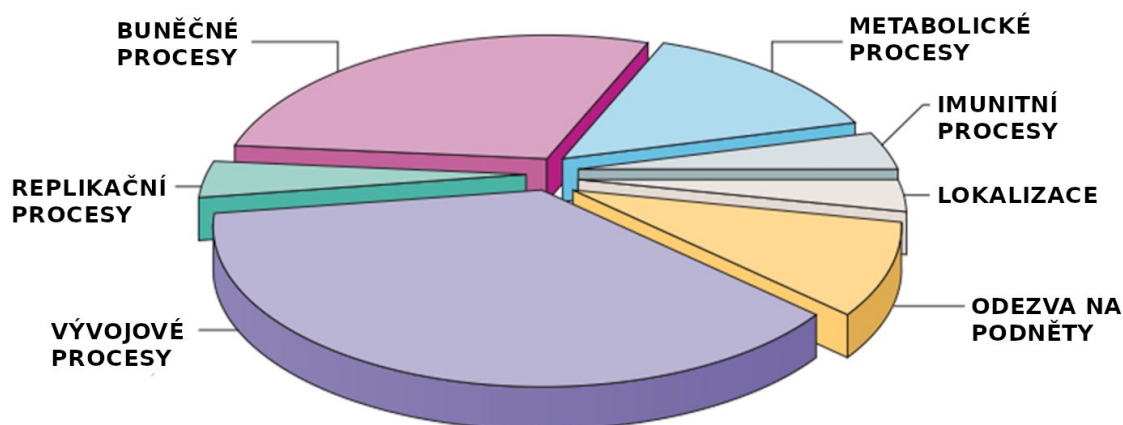
1 Teoretická část

1.1 Transkripční faktory

Transkripční faktory (TF) jsou proteiny, které hrají klíčovou úlohu v expresi genomu [7]. Obecně se tak označují proteiny schopné specificky vázat úseky deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a regulovat transkripci – ať už jako aktivátory, nebo jako represory [8,9]. Během procesu transkripce dochází k přepisu genetické informace kódované v DNA do primárního transkriptu, který je pak dále zpracováván buňkou až do podoby produktu s biologickou funkcí – tím bývá typicky protein (strukturní, katalytický), ale nositelem biologické funkce může být i upravená ribonukleová kyselina (RNA) [10].

Tyto řídicí jednotky ovlivňují všechny úrovně biologických systémů, ať už se jedná o udržování stálosti vnitřního prostředí při odezvě na změny v okolí, proliferaci a diferenciaci buněk, tkáňově specifické signální dráhy či kompletní ontogenezi organismů [7,8]. Schopnost adaptace a udržení identity jednotlivých buněčných linií je hlavní vlastností mnohobuněčných organismů. Kromě rozdílů v expresi genů mezi jednotlivými tkáněmi jsou součástí přirozeného vývoje organismu i změny v expresi v průběhu času, kdy některé geny v pozdějším vývojovém stádiu už postrádají svůj účel [7,11,12].

Exprese samotných TF je řízena pomocí jiných, vyšších transkripčních faktorů, a tak je tvořena komplexní regulační kaskáda interpretace genetické informace [8]. Lidský genom obsahuje více než 1 600 genů kódujících různé transkripční faktory, přičemž pro větší část z nich stále není známá jejich přesná funkce a způsob vazby DNA [7]. To je přičítáno dosud nezmapovaným kooperačním interakcím mezi více různými TF či mezi TF a nukleosomy. Podíl jednotlivých procesů, které jsou řízeny transkripčními faktory se známou funkcí je ilustrován na Obr. 1, str. 14.



Obr. 1 Přehled rozdělení buněčných pochodů regulovaných transkripčními faktory se známou funkcí. Upraveno podle [8].

Specifické transkripční faktory fungují ve formě multiproteinových komplexů, které zajišťují tři základní kroky vedoucí k přepisu DNA do RNA:

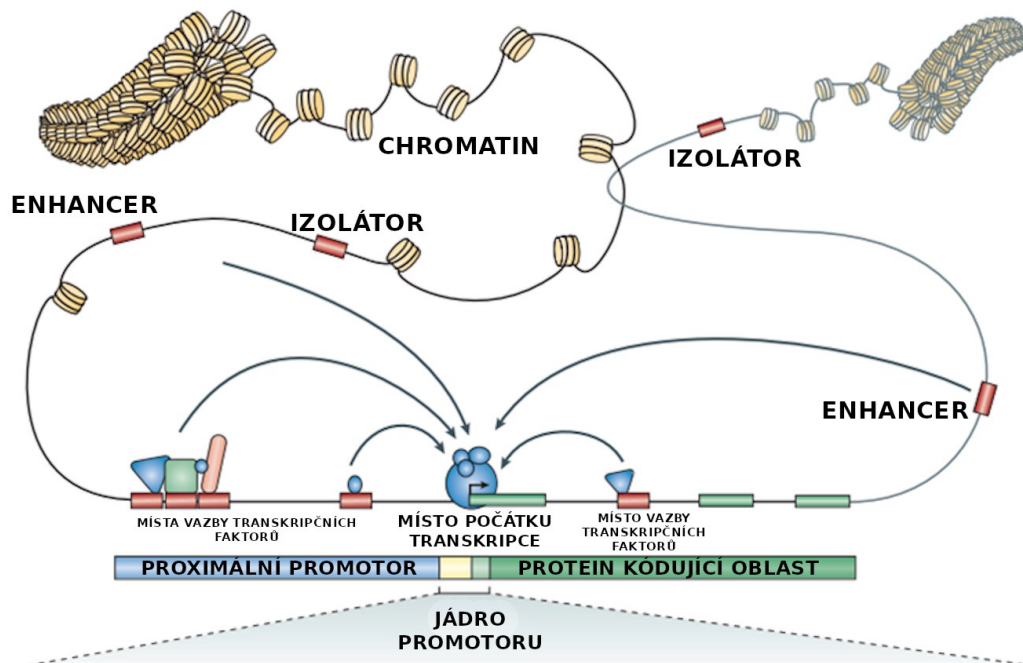
1. rozvolnění struktury chromatinu a s tím spojené zpřístupnění dosud skrytých/blokovaných úseků;
2. zformování preiniciačního komplexu;
3. přechod od iniciace transkripce k elongaci [8,13,14].

Bylo prokázáno, že poruchy v regulaci exprese na úrovni transkripčních faktorů vedou k řadě závažným onemocněním a až třetina vývojových vad je způsobena mutacemi transkripčních faktorů [9,13,15,16]. Mezi nejznámější zástupce těchto onemocnění patří rakovina, kdy nadměrná exprese určitých transkripčních faktorů zásadně mění chod a regulaci buňky [13,17]. Na TF je tak nahlíženo jako na slibné terapeutické cíle, či dokonce prostředky pro opravu deregulovaných buněčných pochodů v rámci vývoje nových léčiv [16,18,19]. Z těchto důvodů je v současnosti u řady transkripčních faktorů zkoumána jejich struktura, funkce a interakce v rámci buněčných procesů.

1.1.1 Responzivní elementy

Oblasti, které jsou TF rozpoznávány, jsou označovány jako responzivní elementy (RE) [20]. Tyto úseky se mohou nacházet v přímém sousedství s místem počátku transkripce (promotor), ale i v sekvenčně vzdálené oblasti, která stále hraje regulační úlohu při přepisu daného genu [20]. Na Obr. 2, str. 15 je schematické zná-

zornění jednotlivých RE. Fakt, že se i velmi vzdálené úseky DNA (v některých případech vzdálené až 3 miliony párů bazí) mohou podílet na regulaci interakcí v promotorové oblasti, je dán prostorovým uspořádáním vlákna DNA, kdy se díky záhybům mohou i takto sekvenčně vzdálené úseky k sobě přiblížit [21].



Obr. 2 Schematické znázornění jednotlivých *cis*-regulačních úseků, které jsou zapojeny do řízení transkripce. Převzato a upraveno dle [22].

Promotorem je nazývána sekvence nekódující DNA, zpravidla v přímém sousedství s regulovaným genem, nutná k zahájení transkripce [23]. Samy o sobě jsou však schopné tvorby pouze malého množství transkriptu – pro přepis celého genu je zapotřebí ostatních složek aparátu. Jejich spolupráce s obecnými transkripčními faktory napovídá, že i samotné promotorové oblasti jsou silně konzervované. Naopak mutace těchto úseků jsou často původcem řady onemocnění. Obecné transkripční faktory spolu s RNA polymerasou II tvoří tzv. preiniciační komplex, který se váže na jádro promotoru – oblast počátku transkripce [13,22]. Obecně se má za to, že promotory nejsou rozhodujícím prvkem variability v přepisu genomu [23].

Mezi vzdálenější regulační úseky patří enhancery, což jsou přibližně stovky párů bazí dlouhé úseky DNA schopné vazbou specifických TF posilovat transkripci regulovaného genu [21,22,24]. Eukaryotní transkripční faktory běžně rozeznávají pouze 6–12 párů bazí dlouhé úseky, což naznačuje, že vazba některých transkripč-

ních faktorů na enhancery je ovlivněna přítomností jiných TF (případně dalších kofaktorů) [21,24]. Tímto mechanismem může být zaručena tkáňová specifita, či přesnější načasování exprese daného genu pro určitou fázi buněčného cyklu [24].

Protipólem enhancerů jsou silencery – úseky, které váží represivní faktory a tak utlumují promotorovou oblast a v konečném důsledku samotnou transkripci [24]. Může se tak dít prostřednictvím interakcí se samotným transkripčním aparátem, nebo výše zmíněnými enhancery.

Jako izolátory jsou pak označovány části chromatinu, které blokuje interakce enhancerů či silencerů s promotorovou oblastí [24].

Jelikož se regulační úseky DNA nacházejí v relativní (sekvenční) blízkosti regulovaného genu, jsou označovány jako takzvané *cis*-regulační elementy [23]. Samotné transkripční faktory jsou však ovlivňují transkripci genů napříč celým genomem (tedy i sekvenčně velmi vzdálené úseky) a jsou tedy nazývány jako *trans*-regulační elementy.

1.1.2 Struktura transkripčních faktorů

Transkripční faktory se skládají nejméně ze dvou domén – DNA-vazebné domény, zajišťující specifickou vazbu na příslušný responzivní element, a efektorové domény, která zajišťuje interakci s dalšími složkami transkripčního aparátu [14,25].

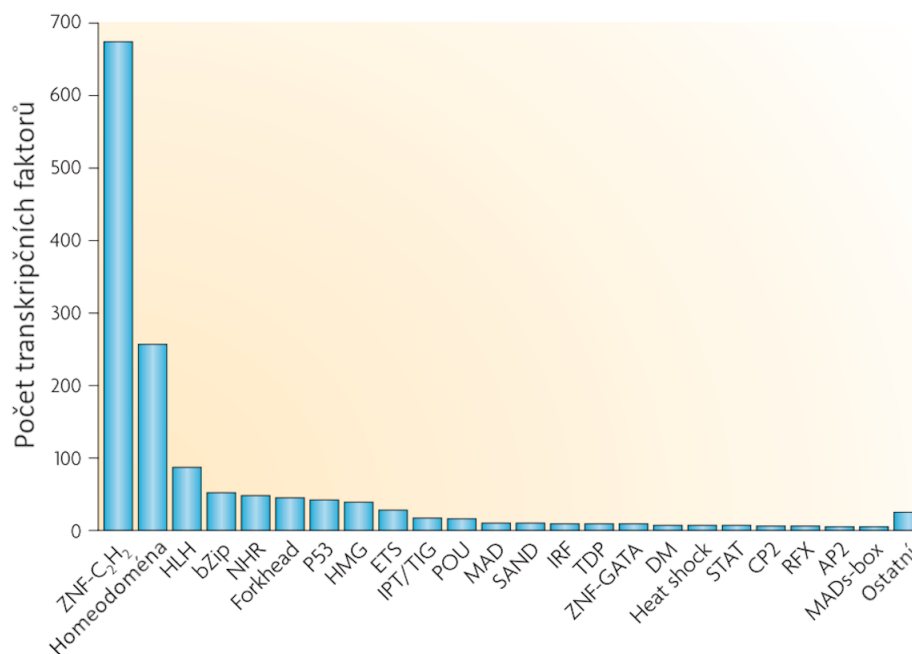
1.1.2.1 Efektorová doména

V případě efektorových domén se konkrétně může jednat o přímou asociaci RNA polymerasy k místu transkripce, vazbu kofaktorů, či dalších (obecných i specifických) transkripčních faktorů [7]. Společně pak v rámci takového multiproteinového komplexu regulují transkripci na více úrovních – od stericky restriktivních interakcí, přes vazbu chromatinu, přestavbu nukleosomu až po kovalentní modifikace histonů [7,14]. Způsob regulace zprostředkovaný efektorovou doménou se může výrazně lišit na základě vazby různých ko-regulačních proteinů [14]. Vazba odlišných ko-regulátorů je spojena s konkrétním responzivním elementem, na který TF právě nasedá. Ač se tedy jedná o funkčně odlišné domény, není možné je studovat jako samostatné jednotky.

Konkrétním případem efektorových domén jsou takzvané transaktivační domény, které regulují transkripci díky vazbě s obecnými transkripčními faktory a složkami preiniciačního komplexu, jako je TATA-vazný protein, faktory asociované s TATA-vazným proteinem, TFIIA, TFIIB a TFIIF [14,26]. Byla pozorována částečná korelace mezi aminokyselinovým složením transaktivačních domén a jejich vazbou určitých obecných transkripčních faktorů. Tento způsob rozdělení na základě aminokyselinové sekvence ale není možné aplikovat na všechny transaktivační domény a spíše se používá jejich rozdělení dle stimulované fáze – stimulace iniciace vs. elongace. Strukturální studie dále odhalily, že se transaktivační domény řady transkripčních faktorů nacházejí v nestructurované formě a určitou sekundární strukturu zaujímají až na základě protein–proteinových interakcí s ostatními složkami transkripčního aparátu.

1.1.2.2 DNA vazebná doména

Úseky, schopné vázat specifické sekvence DNA jsou označovány jako DNA vazebné domény – DBD (z angl. „*DNA binding domain*“). Tyto domény vykazují poměrně jasné definované motivy, podle nichž je možné dělení do jednotlivých rodin (Obr. 3) [8].



Obr. 3 Četnost výskytu jednotlivých motivů DNA vazebných domén transkripčních faktorů se známou strukturou. Převzato a upraveno [8].

Tyto motivy také napovídají jakým způsobem transkripční faktory rozeznávají a vážou specifické úseky DNA, či dokonce, který z buněčných pochodů regulují [8]. Například TF s DNA vazebnou doménou s motivem homeodomény často regulují vývojové procesy, zatímco TF z rodiny regulující expresi interferonů jsou obecně spojovány s imunitní odezvou na virové infekce.

Každý z transkripčních faktorů je schopen se vázat na responzivní elementy (a tedy i regulovat) stovky až tisíce různých genů, což dále potvrzuje nutnost komplexních regulačních mechanismů pro řízení exprese genů [14,27].

1.2 Transkripční faktory TEAD

Transkripční faktory označované jako TEAD (z angl. „*transcriptional enhancer associated domain*“) jsou rodina vysoce konzervovaných savčích transkripčních faktorů, které hrají klíčovou roli během embryogeneze [1,28]. Tyto TF je možné detekovat již ve stádiu 2-buněčného embrya [29]. Napříč obratlovci, bezobratlími a dokonce i u jednobuněčných eukaryot je možné nalézt ortologní transkripční faktory [1,5]. Jsou nezastupitelné pro správný vývoj srdeční tkáně, kosterního svalstva, neurální lišty a trofoektodermu [4,28].

Celkem čtyři TF (TEAD1–4) sdílí téměř identickou DNA vazebnou doménu lokalizovanou na N-konci proteinu [4,5]. Tato doména se sestává z tří α -helixů, které se uskupují do podoby homeodomény. Z porovnání sekvence aminokyselin DNA vazebné domény lidského TEAD1 s TEAD2 vychází shoda 97,5 %, pro TEAD3 98,8 % a pro TEAD4 dokonce 100 % [30]. Ačkoli však jsou DNA vazebné domény jednotlivých forem skoro bez rozdílu a samotná doména je postačující pro sekvencně specifickou vazbu na DNA, ostatní, sekvencně více variabilní oblasti tuto vazbu ovlivňují [25]. V C-terminální oblasti transkripčních faktorů TEAD se nachází další sekvencní úsek s výraznou identitou mezi jednotlivými zástupci [4]. Porovnání sekvencí aminokyselin pro jednotlivé formy je uvedeno na Obr. 4, str. 19.

TEAD1	1	MEP-----SSWSGSESP-AENMERMSDSADKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAI	49
TEAD2	1	.GEPRAGAALDDG.G.T...EG-S.EGTGG.EGA-GGDGGPD.....	59
TEAD3	1	-----MAS---N.NA.S...-G.AR.DGPEGL.GL.....	49
TEAD4	1	..GTAGTITS---NE..SPT..EGSTASGG.QAL.....	57
TEAD1	50	YPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHIOVLARRKSRDFHSKL	109
TEAD2	60EIQ...	119
TEAD3	50K.V.EYQVGI	109
TEAD4	58A.EIQA..	117
TEAD1	110	K---DQTAKDKALQHMAAMSSAQIVSATAIHNKLGKLP-IPRPTFPGAP---GFWPGMI	161
TEAD2	120VS....F.T..T....LI..PSLQA.....G.Q.SELFQ..S.--	166
TEAD3	110	.AMNL..VS.....S..S.....SVLQ..FSP.SPL.QAV.STSS---R..SSPP	166
TEAD4	118A.....S.....I....F.SSMA.A---RG.GR.AVS---...Q.AL	168
TEAD1	162	QTGQ-PGSSQDVKPFVQQAYPEIQAQVAVTAP---IPGFEPASAPAPS---VP-----A--	205
TEAD2	167	GS.P-.WNVP.....S.T--.FTLSL.P.STDL..Y..PQ.LS.L----P.PTPSPP.--	217
TEAD3	167	LL..Q..P...I...A.P.....PLPPT---LSSY..L..L..AAAS..-----V--	214
TEAD4	169	-P..-A.T.H.....S..T.AV..PL---L...SPAG.....PS-----PP	210
TEAD1	206	---WQGRSIGTTKLRLEVFSAFLEQQRDPDSYNKHLFVHIGHANHSYSDDLLESVDIRQI	262
TEAD2	218	---.A.GL..AR.Q.....V.PPDAV...QR.....SQHCP.PGA.P....V...	274
TEAD3	215	---.D.T.ASSR...L.Y...M.V....T.S.....QT.PAF...P..A..V...	271
TEAD4	211	APP.....VASS..WML.....Q...T.....QSSP.....Y..A.....	270
TEAD1	263	YDKFPEKKGGLKELFGKGPQNAFFLVKFWADLNCNIQDD-----AGAFYGVTSQYE	313
TEAD2	275R..YDR..PH.....WGPSGEEAGAGGSISS.G...S...	334
TEAD3	272YE..P.....ST..EG-----P.....S...S	322
TEAD4	271D..ER..S.....T..E.E-----GSS...S...	321
TEAD1	314	SSENMTVTCSTKVCSEFGKQVVEKVEYARFENGRFVYRINRSPMCEYMINFIHKLKHL	373
TEAD2	335	.L.H..L..S.....R.QL.D.....LL.....LV..L..RQ..	394
TEAD3	323	.ADS..ISV.....L.....H.....	382
TEAD4	322	.P...II.....Y...HYS...H...L.....	381
TEAD1	374	EKYMMNSVLENFTILLVVTNRDTQETLLCMACVFVSNSEHGAQHIIYRLVKD	426
TEAD2	395	.R.....Q.....L..T.Y....T..R.....R.	447
TEAD3	383Q..S..S...VI.F....T.....V.K....	435
TEAD4	382Q.....I.Y....A.....E	434

Obr. 4 Porovnání sekvencí lidských transkripčních faktorů rodiny TEAD z databáze UniProt. Tečky značí identitu aminokyselin, pomlčkou je značeno přerušení sekvence. Identifikační kódy pro jednotlivé sekvence jsou uvedeny v závorce – TEAD1 (P28347-1), TEAD2 (Q15562-1), TEAD3 (Q99594-1) a TEAD4 (Q15561-1). Modře je vyznačena DNA vazebná doména, žlutě transaktivační doména. Převzato z [31] a upraveno pomocí [32].

Bylo prokázáno, že jednotlivé formy těchto transkripčních faktorů jsou tkáňově specifické – téměř v každé tkáni byla nalezena alespoň jedna z jeho forem, v některých tkáních všechny čtyři formy [1].

Pokusy na myších ukázaly, že bez TEAD1 umírá embryo kolem 11 až 12 dne vývoje s mnoha defekty v oblasti srdeční tkáně [33]. V pozdějších fázích embryogeneze pak byl TEAD1 nalezen ve vyvíjejících se strukturách střeva, čichového ústrojí, ledvin, kosterního svalstva a i nadále v myokardu [34].

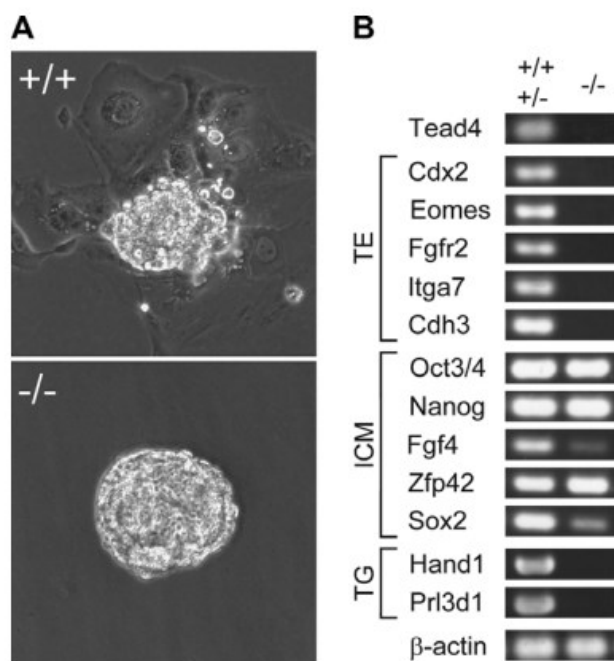
Expres TEAD2 byla detekována v již 2-buněčném stádiu embrya a z celé rodiny TEAD transkripčních faktorů je jeho exprese v počátku embryogeneze (prvních 7 dní) nejvyšší [30,35]. Jeho hlavní úloha spočívá v řízení vývoje neurální lišty [36] a struny hřbetní [37]. V embryonálních buňkách byl TEAD2 detekován ve vyvíjející se mozkové tkáni, ovšem u dospělých jedinců již nikoli [35]. Naproti tomu byla jeho exprese detekována v plicní tkáni a vaječnicích [29].

TEAD3 byl detekován především v placentě, ovšem přibližně až od 10. dne embryonálního vývoje [38]. Určité menší množství je exprimováno v zárodečných vrstvách centrální nervové soustavy, ústní a nosní dutiny, zubů, uší, žaludku a střeva.

Transkripčnímu faktoru TEAD4 je věnována celá následující kapitola.

1.2.1 TEAD4

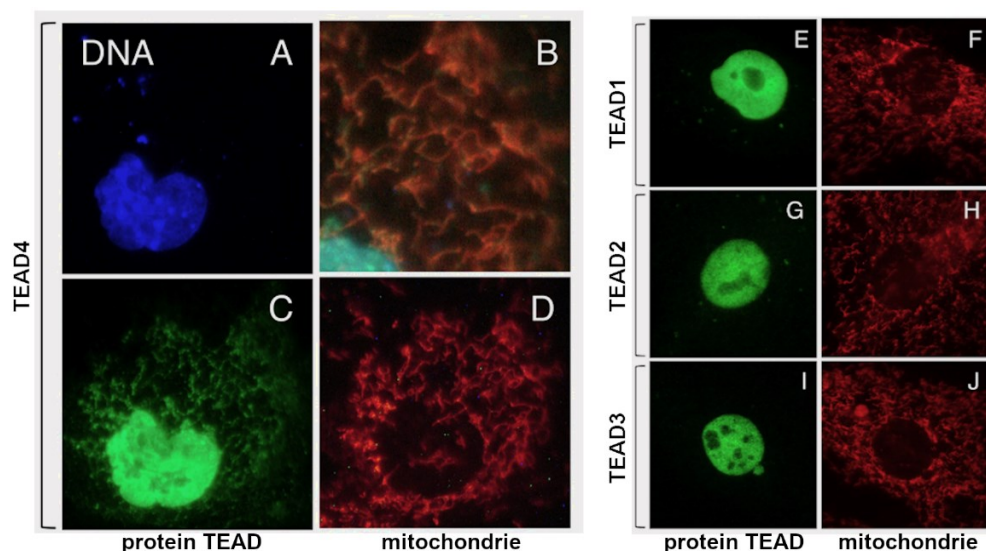
TEAD 4 se v rámci vývoje organismu poprvé také objevuje již v 2-buněčném stádiu blastomery, což značí, že hraje klíčovou roli v embryonálním vývoji [30]. Prvotní experimenty na myším modelu naznačovaly, že TEAD4 je nutný k diferenciaci totipotentní blastomery v linii trofoektodermu [39,40]. V myších buňkách trofoektodermu byla detekována 27× vyšší exprese TEAD4 než v buňkách embryoblastu [39] a u myší s vyřazeným genem pro TEAD4 nedocházelo k expresi genů *Eomes* a *Cdx2*, které zajišťují správnou diferenciaci v trofoektoderm [41], genu *Itga7*, nutného pro zahnízdění embrya [42], i genů potřebných pro následný vývoj po zahnízdění, jako je *Fgfr2* [43] a dalších (viz Obr. 5, str. 21). U embryí, u nichž byl gen pro TEAD4 vyřazen, se tak nevyvinula prvotní tělní dutina (blastocoel), nebyla schopna zahnízdění (nidace) a jejich vývoj tak nemohl pokračovat [40].



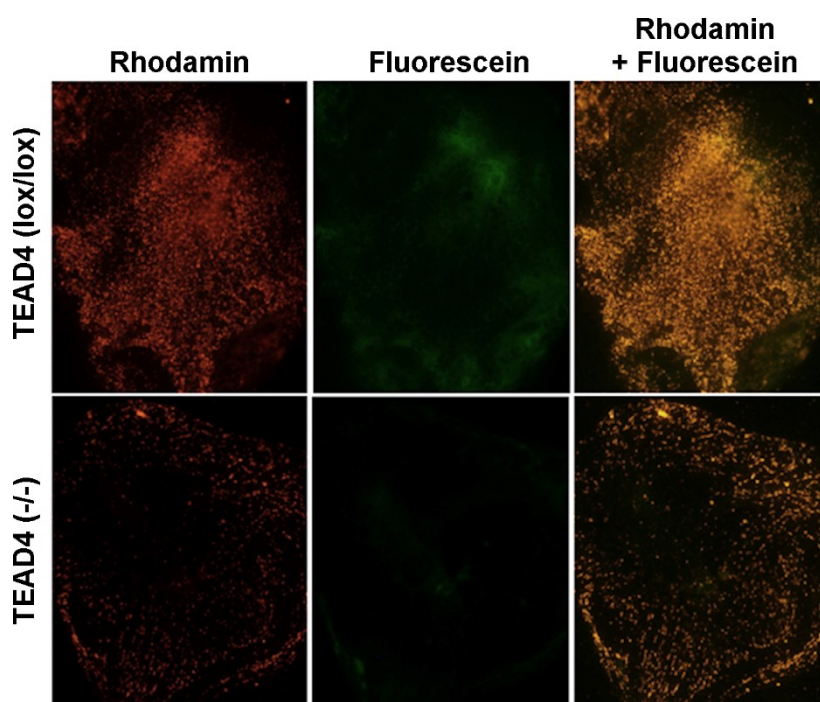
Obr. 5 (A) Porovnání normálních buněk obsahujících TEAD4 (+/+) a mutantů s vyřazeným genem pro TEAD4 (-/-). U kontrolních buněk jsou patrné velké buňky trofoblastu. Mutantní buňky se nebyly schopné přichytit na želatinou pokryté misky a nedošlo u nich k růstu trofoektodermu. **(B) Rozdíl v expresi genů klíčových pro diferenciaci trofoektodermu.** Převzato z [36].

Novější výzkum ovšem ukázal, že TEAD4 není přímým řídicím faktorem exprese těchto genů spojených s diferenciací trofoektodermu, ale pravděpodobně jeho úloha spočívá v udržení optimálních podmínek během energetických změn uvnitř buňky [44]. Před samotným zformováním blastocoelu embryo mění svůj primární zdroj energie z pyruvátu a laktátu na glukosu, což vede ke zvýšené spotřebě kyslíku [45]. Oxidativní fosforylace, která v této fázi vystupuje do popředí, přináší také zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku [46,47]. Bylo ukázáno, že po snížení koncentrace kyslíku z 21 % na pouhých 5 % docházelo k formaci prvotní tělní dutiny (blastocoel) a expresi genů asociovaných s diferenciací trofoektodermu i v myších embryích, které měly gen pro TEAD4 vyřazený [44]. Dle výsledků této studie tak TEAD4 napomáhá regulovat oxidativní stres a snižovat množství reaktivních forem kyslíku, které vznikají uvnitř buněk během formování prvotní tělní dutiny.

Fluorescenčním značením bylo zjištěno, že TEAD4 se jako jediný z rodiny transkripčních faktorů TEAD nachází jak v jádře, tak i v mitochondriích (viz Obr. 6, str. 22) [44].



Obr. 6 Srovnání fluorescenčního značení specificky pro jednotlivé formy transkripčních faktorů TEAD. (A) Specifické barvení DNA modře. (C) – (J) Zeleně jsou barveny proteiny TEAD, červeně pak mitochondrie. Pouze u TEAD4 je možné pozorovat překryv výskytu tohoto proteinu s výskytem mitochondrií – na sloučeném obrázku (B) oranžově. Převzato a upraveno dle [44].



Obr. 7 Specifické barvení mitochondrií u buněk s aktivním genem pro TEAD4 (lox/lox) a u buněk s vyřazeným genem pro TEAD4 (-/-). Červeně – mitochondrie s vysokým membránovým potenciálem, zeleně – mitochondrie s nízkým membránovým potenciálem. Pro separaci těchto spekter byly použity filtry pro rhodamin a fluorescein. Spojením obou fluorescenčních signálů do jedné vrstvy je pak vidět celkový stav mitochondrií v buňce (oranžově). Převzato a upraveno dle [44].

Na Obr. 7, str. 22 je vidět specifické barvení vůči membránovému potenciálu mitochondrií, díky kterému je patrné, že u buněk s vyřazeným genem pro TEAD4 dochází k výraznému úbytku aktivních mitochondrií. V diferencujících buňkách trofoektodermu je tak TEAD4 nutný k udržení mitochondriální homeostázy [44].

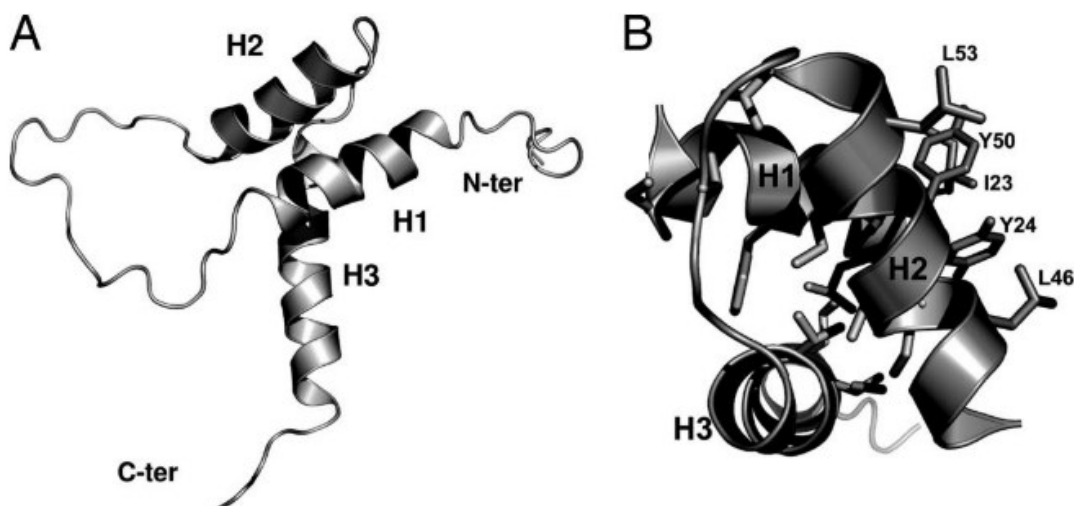
Hlavní úloha TEAD4 tedy může spočívat v udržování energetické homeostázy a správné funkce mitochondrií v počátečních stádiích embryonálního vývoje. Dále ve vývoji však TEAD4 ztrácí svou nepostradatelnost, jelikož jeho vyřazení po zahánění embrya nijak neovlivní normální průběh ontogeneze [2].

V pozdějším stádiu vývoje organismů je TEAD4 součástí regulace genů kosterního svalstva [38].

1.2.2 DNA vazebná doména

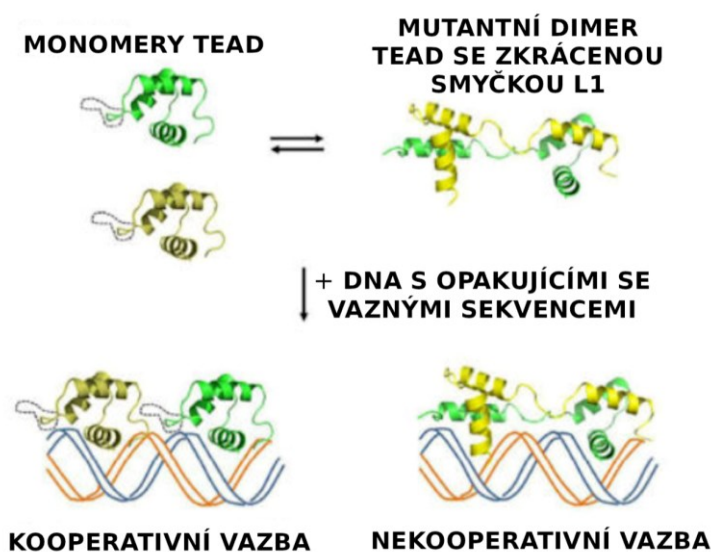
Tato 72 aminokyselin dlouhá doména zodpovědná za vazbu DNA je označovaná jako TEA doména (z angl. *transcriptional enhancer activator*), či ATTS – podle prvních písmen názvů proteinů, ve kterých byla tato doména poprvé identifikována [48]. Jedná se o proteiny AbaA (*Aspergillus nidulans*), TEC1 (*Saccharomyces cerevisiae*), TEAD1 a Scalloped (*Drosophila*).

Studium její struktury pomocí nukleární magnetické resonance (NMR) odhalilo, že se jedná o globulární protein složený z trojice α -helixů (H1, H2, H3) vzájemně propojenými dvěma β smyčkami spolu s řadou nestrukturovaných oblastí (Obr. 8, str. 24) [5]. První dva helixy jsou v téměř antiparalelním uspořádání, helix H3 pak slouží k celkové stabilizaci struktury a samotné vazbě na DNA (díky absenci záporně nabitých aminokyselin). V části třetího helixu, která je odhalená, je i trojice serinů (S-65, S-66 a S-76), jejichž fosforylací dochází k snížení schopnosti vázat DNA.



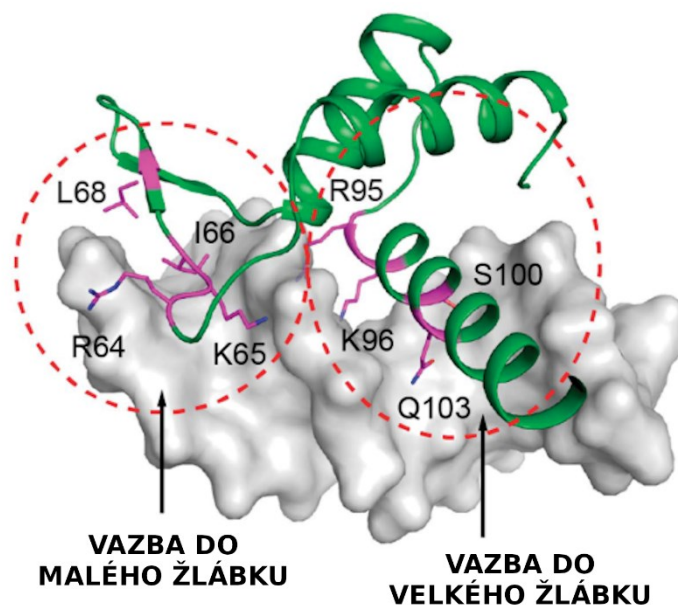
Obr. 8 Struktura TEA domény získaná pomocí NMR. A – stužkový model s vyznačenými helixy (H1, H3, H3); B – detail na helix H3 s vyznačením hydrofobních aminokyselinových zbytků [5].

Dále bylo prokázáno, že i první smyčka L1 (spojující helix 1 a 2) má podíl na vazbě DNA [6]. Zkrácení této smyčky sice nezabrání samotné vazbě na DNA, či tvorbě homodimeru, ten ale není schopen vázat DNA kooperativně na opakujících se sekvencích (Obr. 9).



Obr. 9 Schematické znázornění vlivu smyčky L1 na kooperativní vazbu opakujících se sekvencí DNA. Napravo je znázorněn dimer vzniklý z mutantních proteinů se zkrácenou smyčkou L1 [6].

Vazba probíhá na dvou místech – α -helix H3 se váže do velkého žlábků, zatímco smyčka L1 společně s oběma β obrátkami pak do malého žlábků [49]. Mutačními testy byly odhaleny klíčové aminokyseliny nutné k vazbě na DNA (viz Obr. 10, str. 25).



Obr. 10 Model krystalové struktury DNA vazebné domény TEAD4 s M-CAT elementem. Struktura DNA vazebné domény je znázorněna zeleně, DNA je znázorněna šedivě. Fialově jsou vyznačeny aminokyseliny, jejichž mutace znemožňuje vazbu DNA. Převzato a upraveno [49].

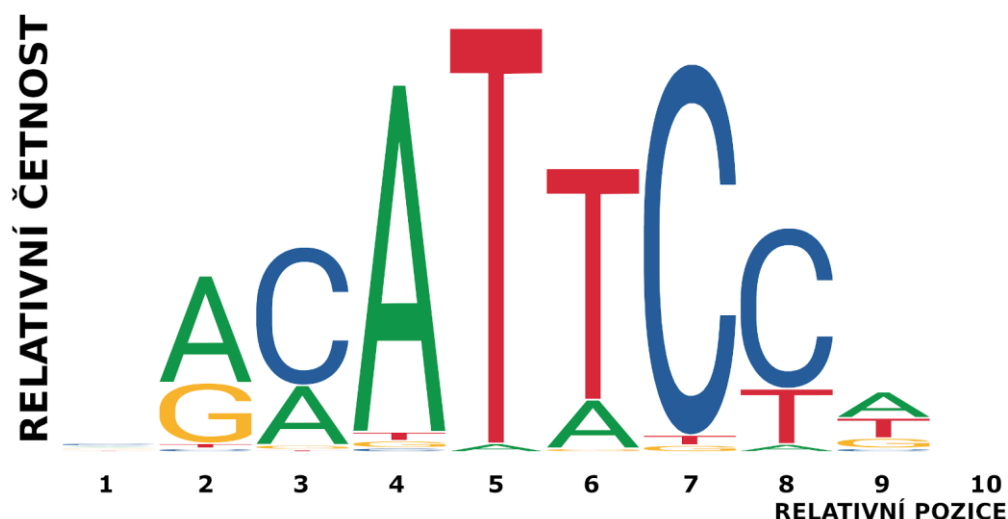
Na základě této struktury, byla TEA doména zařazena do rodiny transkripčních faktorů s motivem homeodomény [5].

1.2.2.1 Vazebný motiv

Poprvé byla TEAD rodina transkripčních faktorů nalezena při vazbě na enhancer opičího viru SV40 v lidských HeLa buňkách na sekvenci označované jako GT-II motiv [50]. Pro samotnou vazbu DNA vazebné domény je pak konkrétně klíčová sekvence 5'-TGGAATGT-3' [5].

Dalším vazebným motivem je skupina tzv. M-CAT elementů (z angl. „*muscle cytosine, adenosine, thymine*“), které se nachází v regulačních oblastech genů specifických pro srdeční svalovou tkáň, či buňky hladkého a kosterního svalstva [51,52]. Mezi konkrétní zástupce patří srdeční troponin T, těžký řetězec β -myosinu či α -aktin v hladkém i kosterním svalstvu [51]. Klíčovou sekvencí M-CAT elementů je 5'-CATTCCT-3'. Je možné, aby se tato sekvence v promotorové oblasti nacházela i víckrát – pokud je to stericky možné, váží pak transkripční faktory TEAD tyto úseky kooperativně v formě homodimeru.

Nejvyšší afinita pro izolovanou TEA doménu byla zatím zjištěna pro obecnou sekvenci 5'-N(A/T/G)G(A/T/C)ATNT-3', kde N značí libovolnou bázi [5]. Ve všech případech se musí jednat o dvouřetězcovou DNA [53]. Na Obr. 11 je schematicky znázorněna relativní četnost jednotlivých bazí v dosud identifikovaných vazebných sekvencích pro TEAD4.



Obr. 11 Relativní četnost bazí ve vazebné sekvenci pro TEAD4. Převzato a upraveno [54].

1.2.3 Transaktivační doména

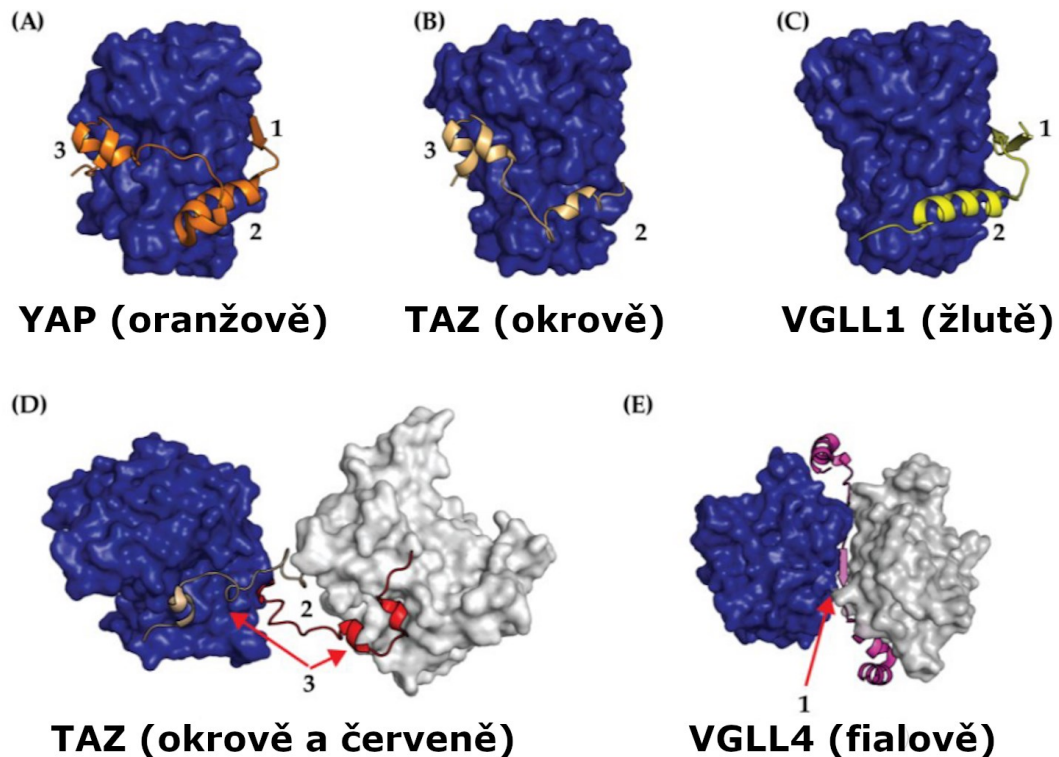
Jelikož transkripční faktory TEAD neobsahují samy o sobě aktivační doménu, která by byla schopna přímo ovlivňovat transkripci, spoléhají na regulaci pomocí koaktivátorů [1,55]. Úsek, pomocí kterého k této vazbě dochází, je označován jako transaktivační doména.

Struktura této domény je zatím známa pro TEAD1, 2 a 4. Ta je ve všech případech stejná a skládá se ze dvou β -skládaných listů (jeden tvořen pěti antiparalelními vlákny a druhý sedmi paralelními i antiparalelními vlákny) a dvou helix-turn-helix motivů [56–58].

Důležitým prvkem pro funkčnost transaktivační domény je posttranslační modifikace cysteinu, na kterém dochází k S-palmitoylaci [59,60]. Tato reversibilní kovalentní modifikace přispívá ke stabilitě celé transaktivační domény a napomáhá její vazbě s koaktivátory.

1.2.4 Koaktivátory

Jako koaktivátory transkripčních faktorů TEAD byly doposud identifikovány proteiny skupiny YAP a jeho paralogu TAZ, VGLL proteiny a rodina nukleárních receptorů p160 [1]. Na Obr. 12 jsou vybrané koaktivátory zobrazeny ve vazbě na transaktivační doménu TEAD.



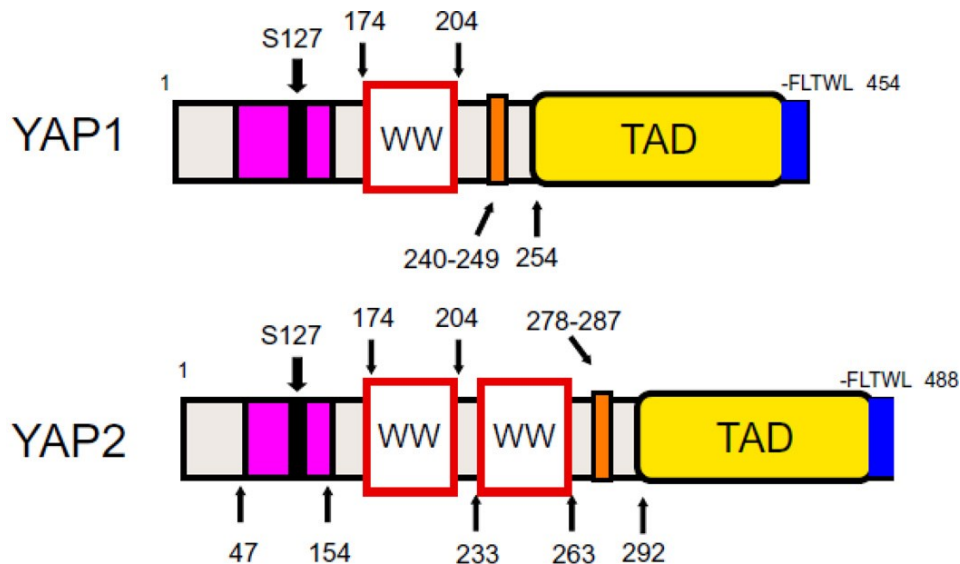
Obr. 12 Modely krystalových struktur transaktivační domény TEAD (modře a bíle) s vybranými koaktivátory. (A) YAP (oranžově); (B) TAZ (okrově); (C) VGLL1 (žlutě); a pro dimery (D) TAZ (okrově a červeně) a (E) VGLL4 (fialově). Převzato a upraveno [3].

1.2.4.1 YAP

Protein YAP (z angl. „*Yes associated protein*“) byl prvním objeveným koaktivátorem pro transkripční faktory TEAD [55]. Jedná se o vícedoménový protein konzervovaný napříč eukaryotními organismy [61].

Schopnost interakce s transkripčními faktory zajišťuje TEAD-vazebná doména lokalizovaná na N-konci. Dle konkrétní isoformy za ní následuje jedna, či dvě WW domény, které hrají roli v dalších protein-proteinových interakcích (například

s kinasami LATS1/2). Dále v sekvenci se nachází krátký SH3 vazný motiv a transaktivační doména [57,62]. Na samotném C-konci YAP se nachází pětice aminokyselin (FLTWL), které jsou schopné interagovat s PDZ doménami proteinů ZO-1 a ZO-2 a jenž zároveň hrají důležitou roli v translokaci do buněčného jádra [4,63]. Schématické znázornění jednotlivých domén je uvedeno na Obr. 13.



Obr. 13 Doménová struktura pro isoformy YAP1 a 2. Fialově je vyznačena TEAD vazebná doména a v něm přítomný serin-127, který je podstatný pro buněčnou lokalizaci YAP. Dále jsou vyznačeny WW domény, oranžová značí SH3 vazný motiv, žlutá transaktivační doménu a modře je znázorněn PDZ vazebný motiv. Převzato a upraveno [64]

Množství YAP přítomného v buňce je limitujícím faktorem transkripční aktivity genů řízených transkripčními faktory TEAD [55]. Zároveň se většina YAP nachází v cytoplasmě, zatímco proteiny TEAD jsou lokalizovány v jádře. Poměr, v jakém je YAP distribuován mezi jádrem a cytoplasmou, má vliv na osud buňky – stimuluje proliferaci a zabraňuje apoptose [65]. Transkripční aktivita cílových genů pro TEAD je přes tento poměr regulována prostřednictvím vysoce konzervované signalizační dráhy Hippo [66]. Pokud je tato dráha aktivní, přenáší se signál až na kinasy LATS1/2, které fosforylují YAP na serinu-127 – tím je stimulována vazba YAP na protein 14-3-3, jenž udržuje YAP v cytoplasmě a tím inhibuje jeho aktivitu [55,66,67]. Stimulem ke změně této rovnováhy může být v některých tkáních i jejich poškození – YAP (i TAZ – viz. kap. 1.2.4.2) se tak podílí na regeneraci tkáně [65]. Alternativně pak může být YAP fosforylován na serinu-381, což vede k další fosforylaci pomocí kasein kinasy 1 a následné ubiquitinaci a degradaci celého proteinu [67].

1.2.4.2 TAZ

Protein TAZ (z angl. „*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*“) je homologem YAP s cca 50% identitou v sekvenci a velmi podobnou topologií [67,68].

Stejně jako YAP obsahuje i protein TAZ N-koncovou TEAD vazebnou doménu, která ovšem u proteinu TAZ neobsahuje smyčku PXXOP (kde O značí libovolnou hydrofobní aminokyselinu), WW doména je obsažena pouze jedna [69,70]. Transaktivační doména je pak shodně s YAP zakončena TBZ vazným motivem. Lokalizace tohoto proteinu je také řízena přes Hippo signální dráhu, kdy je po fosforylaci serinu-89 stimulována vazba na protein 14-3-3 a TAZ je tak zadržován v cytoplasmě [68].

Stejně jako YAP, interaguje i TAZ se všemi čtyřmi transkripčními faktory TEAD, ovšem s rozdílnou afinitou [69]. Pokusy na myších ukázaly, že po odstranění genu pro YAP dochází k přerušení vývoje ještě ve stádiu embrya, zatímco myši s vyřazeným genem pro TAZ umíraly až po narození na komplikace spojené s ledvinovými cystami a rozedmou plic [70,71]. To značí, že role těchto dvou koaktivátorů je v organismu zřejmě odlišná.

1.2.4.3 VGLL

Koaktivátory VGLL (z angl. *Vestigial like*) získaly svůj název podle transkripčního koaktivátoru Vestigial, který byl poprvé nalezen v *Drosophila* jako klíčový regulátor vývoje křídel [1]. Konzervovaný, 25 aminokyselin dlouhý motiv je jediný, ve kterém se tato dvojice proteinů shoduje. Zároveň se jedná o jedinou definovatelnou doménu VGLL proteinů, ostatní oblasti jsou nestrukturované. Vestigial doména tedy VGLL proteinům propůjčuje schopnost interakce s transkripčními faktory TEAD a stimulace exprese genů. Celkem čtveřice VGLL proteinů vykazuje částečnou tkáňově specifickou expresi [1,72]. U lidí je VGLL1 exprimován v plicích, srdci a ledvinách plodu a částečně také v placentě. VGLL2 převažuje v kosterním svalstvu a spíše než buněčnou proliferaci řídí diferenciaci aktivací genů specifických pro svalovou tkáň. Hlavní tkání pro VGLL3 je placenta, dále byl detekován i v kosterním svalstvu, srdci, ledvinách, mozku a játrech. Expresi VGLL4 se podařilo detekovat v řadě tkání, jeho specifita spočívá v tom, že jako jediný obsahuje dvojici Vestigial domén. Tento

protein je schopen kompetovat s proteiny YAP a TAZ o vazbu na TEAD. Kromě své role transkripčního koaktivátoru je také součástí regulace apoptosy.

1.3 Cílové geny pro TEAD a jejich funkce

Transkripční faktory TEAD hrají roli především v proliferaci buněk, jejich diferenciaci, tkáňové homeostáze a bránění apoptose, a to již od samotného počátku vývoje organismu [73]. Regulované geny lze rozdělit do dvou základních kategorií. První kategorie zahrnuje geny potřebné pro růst a vývoj tkání, exprimované především v kosterním svalstvu, hladkém svalstvu stěn cév a myokardu [1,66]. Do druhé kategorie se pak řadí geny spojené s neřízenou proliferací, invazivností a tvorbou metastáz [65,74].

Jedním z prvních objevených cílových genů byly *CTGF* (z angl. „*connective tissue growth factor*“), a *Cyr61* (z angl. „*cystein-rich 61*“), což jsou geny pro extracelulárně exprimované proteiny, jenž jsou schopny modulovat interakce mezi buňkami, jejich adhezi či proliferaci za pomoci řady cytokinů a růstových faktorů [75–77], oba také způsobují rezistenci na chemoterapeutikum Taxol [78]. Úroveň exprese CTGF je úzce spjata s množstvím kolagenu v pojivové tkáni a jeho nadměrná aktivace vede ke vzniku fibrotických poruch [77,79]. Exprese CTGF může být spojena s růstem nádorů (akutní lymfoblastická leukemie, rakovina prsu, slinivky a žaludku) či naopak se supresí nádorového bujení (rakovina konečníku, plic a vaječnicků) [80]. Nadměrná exprese CYR61 je spojována s progresí rakoviny vaječnicků nebo invazivností a tvorbou metastáz u rakoviny prsu [81,82].

Dalšími geny spojenými s buněčnou proliferací jsou například tyrosin kinasa kódovaná genem *AXL*, jenž hraje roli v nádorové signalizační kaskádě hepatocelulárního karcinomu, jeho proliferaci a šíření [83]. Dále pak geny *EDN1/2* kódující endothelin regulují správnou funkci ledvin, rovnováhu iontů a proliferaci hepatocytů, která je spojena i s genem *c-MYC* (míra jeho exprese je řízena *EDN1*) [74,84]. Zvýšená exprese *EDN1/2* a *c-MYC* má přímou souvislost s rakovinou ledvin. Jistou roli má pak *EDN1* i ve vzniku nádoru močového měchýře. A nadměrná exprese *RHAMM* (z angl. „*receptor for hyaluronan-mediated motility*“) vede ke vzniku, proliferaci a tvorbě metastáz rakoviny prsu [85].

Ještě větší spojitost s nádorovými onemocněními mají geny bránící diferenciaci buněk, například geny pro *Oct-3/4* a *Nanog*, jenž hrají důležitou roli v sebeobnovovacím procesu pluripotentních embryonálních kmenových buněk a mohou již diferencovanou buňku uvést opět do stavu embryonální kmenové buňky [86,87]. Zvýšená exprese *Nanog* ovlivňuje negativní zpětnou vazbou aktivitu TEAD2. Také pomocí genu *SOX9* jsou buňky schopné přecházet zpět do stavu kmenových buněk, dochází k proliferaci nádorů a tvorbě metastáz [88].

Jiné geny jsou naopak zodpovědné právě za buněčnou diferenciaci. K takovým genům, jejichž exprese je indukována transkripčním faktorem TEAD4, se řadí *Cdx2* a *Gata3* [40,89]. Ty spolu s dalšími geny řídí přeměnu embryonálních kmenových buněk v linii trofoektodermu – mimo jiné také potlačením exprese již zmíněného *Oct4*. Selektivní diferenciaci vnějších buněk embrya je způsobena tím, že exprese *Cdx2* je inhibována mezibuněčným kontaktem [90]. V embryogenezi je dalším příkladem *Pax3*, který se účastní vzniku neurální lišty a řady svalů [36].

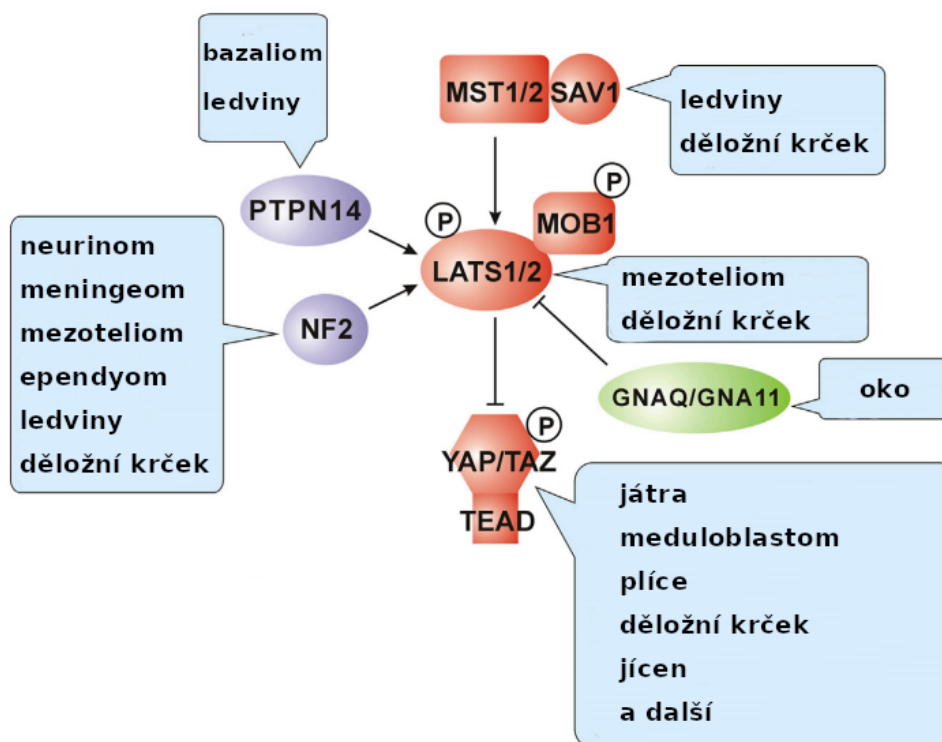
Další geny jsou schopné zvrátit buněčný osud – exprese CDK6 zabraňuje buněčnému stárnutí a potlačuje účinky chemoterapeutika Pemetrexed [91]. Geny z rodiny inhibitorů apoptosy, jako je například *Survivin*, *BIRC2* a *MCL1*, pozměňují aktivitu caspasy-3 a poly-(ADP)-ribosa-polymerasy (PARP) [84].

Genem *ZEB2* je kódován DNA vázající transkripční represor, který zabraňuje progresi mezi dvěma typy rakovin plic [92].

1.3.1 Role proteinů TEAD v nádorových onemocněních

Geny, řízené pomocí transkripčních faktorů z rodiny TEAD napomáhají růstu a proliferaci buněk, jejich diferenciaci, zpomalují stárnutí či inhibují apoptosu [2,75,84]. Všechny tyto důležité procesy však mohou přerůst v závažné komplikace, pokud nejsou správně řízeny. Pokud si buňka osvojí schopnosti rychlého dělení, unikání řízené buněčné smrti a vlastnosti podobné kmenovým buňkám, dává tak počátek nádorovému bujení.

Mezi řadou typů rakovin – jako například rakovina prostaty, prsu, vaječníků, žaludku, konečníku, ledvin, plic či střev – byla nalezena zvýšená aktivita transkripčních faktorů TEAD, spolu s vyšší přítomností jejich koaktivátorů YAP/TAZ v jádře [1,3,67]. Jedním z důvodů takové situace může být porucha v již výše zmíněné Hippo signální dráze (viz Obr. 14). Jedná se o dráhu vysoce konzervovanou napříč eukaryotními organismy, jež hraje důležitou roli v regulaci velikosti orgánů [65,67,68]. Tato signální dráha je řízena kaskádou kináz, jejímž konečným účinkem je fosforylace YAP na serinu-187 (případně TAZ na serinu-89). Díky tomu je YAP/TAZ ve vazbě na protein 14-3-3 zadržován v cytoplasmě a nemůže tak interagovat s jadernými transkripčními faktory TEAD. Pokud je však dráha porušena a protein YAP/TAZ není fosforylován, spouští v jádře spolu s TEAD transkripci svých cílových genů, což může vést až ke vzniku nádorových onemocnění.



Obr. 14 Nádorová onemocnění vzniklá porušením některého z článků Hippo signální dráhy. Převzato a upraveno [93].

2 Cíle práce

- příprava DNA vazebné domény proteinu TEAD4 v bakteriálním expresním systému *E. coli*
- purifikace a charakterizace produkovaného proteinu
- ověření schopnosti produkovaného proteinu vázat DNA

3 Materiály a metody

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Chemikálie

(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, USA
1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
1,4-dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS)	Sigma-Aldrich, USA
agar	Oxoid, UK
akrylamid	Serva, Německo
boritá kyselina	Merck, Německo
bromfenolová modř	Serva, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250	VWR International, USA
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, ČR
dodecylsírán sodný (SDS)	Avantor, USA
ethanol	VWR International, USA
extrakt z kvasnic	VWR International, USA
fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Serva, Německo
GelRed barvivo	Biotium, USA
glycin	Sigma-Aldrich, USA
chloramfenikol	Jersey Lab Supply, USA
chlorid kobaltnatý hexahydrát	VWR International, USA
chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
imidazol	Fluka chemika, Švýcarsko
isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	VWR International, USA
kanamycin	Serva, Německo
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	VWR International, USA
kyselina octová	VWR International, USA
methanol	Lach-Ner, ČR
N,N-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
peroxodisírán amonný (APS)	VWR International, USA

Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad, USA
Pre-Stained Protein Standard SeeBlue™ Plus2	Invitrogen, USA
směs inhibitorů proteas Sigmafast™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free	Sigma-Aldrich, USA
thrombin	EMD Millipore Corp, USA
Tris	Lach-Ner, ČR
Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)	VWR International, USA
Trypton	Oxoid, UK
voda (LC/MS čistota)	EMD Millipore Corp, USA

3.1.2 Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL;	Stratagene, USA
Genotyp: F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU proL Camr</i>] [<i>argU ileY leuW</i> Strep/Specr]	

3.1.3 Vektory a oligonukleotidy

pET-28a(+)-TEAD4-DBD long vloženo mezi místo EcoR1 a Nde1	Generey, Čína
<i>CTGF f</i> (5'-AGT CAC ATT CCT CCG-3')	IDT, USA
<i>CTGF r</i> (5'-CGG AGG AAT GTG ACT-3')	IDT, USA

3.1.4 Pufry a roztoky

akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%)	70% (v/v) H ₂ O; 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) N,N-methylen-bis-akrylamid
barvicí roztok pro SDS-PAGE gely	4 % (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
lyzační pufr 1	25mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5M NaCl; 1mM 2-merkapt ethanol; pH 7,4; přefiltrováno
lyzační pufr 2	25mM HEPES; 0,5M NaCl; 1mM 2-merkapt ethanol; pH 7,4; přefiltrováno
eluční pufr	lyzační pufr; 0,2M imidazol; pH 7,4; přefiltrováno
HEPES pufr	20mM HEPES; 150mM NaCl; 1mM TCEP; pH 7,4; přefiltrováno

LB médium	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) extrakt z kvasnic; 1% (w/v) NaCl; pH 7,4; sterilizováno
LB médium s agarem	1,25% (w/v) agar v LB médiu; sterilizováno
odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely	55% (v/v) H ₂ O; 35% (v/v) CH ₃ CH ₂ OH; 10% (v/v) CH ₃ COOH
promývací pufr	lyzační pufr; 30mM imidazol; pH 7,4; přefiltrováno
TBE pufr, 10× koncentrovaný	0,89M Tris; 0,89M H ₃ BO ₃ ; 0,02M EDTA; pH 8,3
TFB I	30mM CH ₃ COOK; 100mM RbCl; 50mM MnCl ₂ ; 10mM CaCl ₂ ; 15% glycerol; pH 5,8
TFB II	10mM MOPS; 10mM RbCl; 75mM CaCl ₂ ; 15% glycerol; pH 6,8
Tris-Glycin SDS pufr	komerční výrobek firmy Bio-Rad, USA
vzorkový pufr pro nativní elektroforézu, neredukující	10mM Tris; 0,03% (w/v) bromfenolová modř; 60% (v/v) glycerol; 60mM EDTA; pH 7,6
vzorkový pufr pro SDS-PAGE 2× koncentrovaný, redukující	50mM Tris; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) bromfenolová modř; 100mM DTT, pH 6,8

3.2 Použité přístroje

analytické váhy ML 104/01	Mettler Toledo, ČR
automatické pipety	Gilson, USA; Thermo Scientific, USA; Mettler Toledo, Švýcarsko
centrifuga 5415R	Eppendorf, Německo
centrifuga 5920R	Eppendorf, Německo
centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, USA
centrifuga stolní Mini spin	Eppendorf, Německo
centrifuga stolní VSMC-13	Shelton Scientific, USA
fotodokumentační box ChemiDoc MP Universal Hood III	Bio-Rad, USA
hmotnostní spektrometr solariX XR	Bruker Daltonics, Německo
homogenizátor EmulsiFlex-C3	Avestin, Kanada
chromatografický systém NGC Quest 10	Bio-Rad, USA

inkubátor MCO-170AICUV-PE	Panasonic, Japonsko
kolona ENrich SEC 70 10 × 300 mm	Bio-Rad, USA
kolona Protein MicroTrap	Michrom BioResources, USA
koncentrátor Amicon Ultra-0,5 Ultracel – (0,5 ml, MWCO 3000)	Merck, Německo
koncentrátor Amicon Ultra-15 Ultracel – (15 ml, MWCO 3000)	Merck, Německo
magnetická míchačka C-MAG HS 10 digital	Ika, Německo
membránové filtry Durapore PVDF 0,45 µm	Merck, Německo
nosič TALON Superflow Metal Affinity Resin	Takara Bio, USA
peristaltická pumpa Econo gradient pump	Bio-Rad, USA
pH elektroda InLab Expert	Mettler Toledo, Švýcarsko
předvážky HF-1200G	AND, USA
sběrač frakcí BioLogic™ BioFrac	Bio-Rad, USA
sonikační lázeň Elmasonic S 30 H	Elma Schmidbauer, Německo
souprava pro NATIVE-PAGE SE250/SE260	Hoefler, USA
souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
spektrofotometrický detektor LCD 5000	Ingos, ČR
spektrofotometr DeNovix DS-11 FX+	DeNovix, USA
stříkačka	Hamilton, USA
termostat	Pol-eko, Polsko
termostat s třepačkou Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
třepačka Multitron Pro	Biotrade, ČR
ultrazvukový homogenizátor UP200S	Hielscher, Německo
vortex MS 3 digital	Ika, Německo
zdroj napětí PowerPac Universal	Bio-Rad, USA

3.3 Použité metody

3.3.1 Produkce

3.3.1.1 Příprava kompetentních buněk

Do 10 ml sterilního LB média s 10 µl chloramfenikolu bylo přidáno 100 µl suspenze buněk *Escherichia coli* BL21 (DE3) CodonPlus – RIPL z kryokonzervy. Kultura byla ponechána třepat do druhého dne při 37 °C a 200 ot./min.

Druhý den bylo 100 ml sterilního LB média s chloramfenikolem očkováno 1,5 ml noční kultury a následně bylo inkubováno při 37 °C a 200 ot./min. Průběžně byla měřena OD₆₀₀ proti vodě až do dosažení OD₆₀₀ = 0,8–0,9. Poté byla kultura přelita do 2 falkon o objemu 50 ml předem předchlazených z mrazáku (–20 °C).

Falkony byly centrifugovány na 3 000× g při 4 °C po dobu 10 min. Každá peleta byla resuspendována v 15 ml roztoku TFB I a ponechána inkubovat 20 min na ledu. Následovala druhá centrifugace na 3 000× g při 4 °C po dobu 10 min. Poté byla peleta v jedné z falkon resuspendována ve 4 ml roztoku TFB II, suspenze byla přenesena do druhé falkony a byla resuspendována i druhá peleta.

Na závěr byla buněčná suspenze rozdělena pomocí automatické pipety do sterilních a předchlazených mikrozkušavek po 100 µl, na 2 h ponechána zamrazit do mrazáku při –20 °C a poté přendána do mrazáku o teplotě –80 °C, kde byly kompetentní buňky dlouhodobě skladovány.

3.3.1.2 Transformace kompetentních buněk

Byl použit vektor pET 28(a)-TEAD4-DBD long, ve kterém je sekvence pro tento protein vložena mezi úseky pro restriční endonukleasy *NdeI* a *EcoRI*. Dále konstrukt obsahuje lac operon, sekvence kódující rezistenci vůči antibiotikům kanamycinu a chloramfenikolu a samotný protein je rozšířen o polyhistidinovou kotvu připojenou přes štěpné místo pro thrombin.

Kompetentní buňky *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus – RIPL byly ponechány rozmraznout na ledě. Po rozmrazení bylo k buňkám přidáno 0,5 µl vektoru a suspenze byla ponechána 20 min na ledě. Přechod vektoru do buněk byl proveden tepelným šokem v termobloku při teplotě 42 °C po dobu 45 s. Ihned poté byly buňky opět přendány na led. V blízkosti zapáleného kahanu byl přidán 1 ml sterilního LB média bez antibiotik a buňky byly ponechány růst 1 h při 37 °C za stálého míchání 300 ot./min v termobloku.

Po uplynutí 1 h byly mikrozkušavky centrifugovány ve stolní centrifuze 3 min na 1 000× g. Bylo odebráno 600 µl supernatantu a ve zbylém objemu byla peletka resuspendována. Následně bylo 35 µl vzniklé suspenze rozetřeno sterilní kličkou na Petriho misku s tuhým LB médiem (s agarem) obsahujícím kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml). Miska byla ponechána v inkubátoru přes noc při 37 °C dnem vzhůru.

K transformaci byla provedena i negativní kontrola, která se od uvedeného postupu lišila pouze tím, že k buňkám bylo místo vektoru přidáno 0,5 µl deionizované vody.

3.3.1.3 Test produkce proteinu TEAD4-DBD long

Do 8 skleněných zkumavek bylo přidáno po 1 ml sterilního LB média, ke kterému byla přidána antibiotika kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml). Z transformovaných buněk kultivovaných na tuhém LB médiu na Petriho misce (viz kap. 3.3.1.2) bylo vybráno 8 kolonií, kterými byla média očkována. Kultury byly inkubovány přes noc při 37 °C a třepání 200 ot./min.

Z každé zkumavky s noční kulturou byly očkovány (přenesením 20 µl noční kultury) dvě zkumavky obsahující 1 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a chloramfenikolem (35 µg/ml). Těchto celkem 16 zkumavek bylo ponecháno třepat 2 h při teplotě 37 °C a třepání 200 ot./min. Následně byl vždy k jedné z dvojice kultur přidán roztok isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) do výsledné koncentrace 0,05 mM. Všechny zkumavky byly inkubovány další 2 h opět při 37 °C a 200 ot./min.

Dále byl z každé zkumavky odebrán 1 ml kultury, která byla centrifugována na stolní centrifuze při 1 000× g po dobu 5 min. Bakteriální peleta byla resuspendována ve 100 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Tyto vzorky pak byly analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.

3.3.1.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Pro elektroforézu byl připraven 15% separační gel spojený s 5% zaostřovacím gelem. Jejich složení je uvedeno v Tab. 1. Vzorky byly zahřáty na teplotu 95 °C po dobu 5 min a následně centrifugovány na stolní centrifuze při 5 000× g po dobu 5 min. Do jamek gelu bylo nanášeno 10 µl proteinového standardu a 12 µl od každého vzorku. Elektroforéza probíhala v prostředí Tris-glycin SDS pufru za konstantního proudu nejprve 15 mA na gel a po zaputování vzorků do separačního gelu byl proud zvýšen na 30 mA na gel.

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

složka	objem (ml)	
	5% zaostřovací gel	15% separační gel
deionizovaná voda	0,68	1,1
30% akrylamidová směs	0,17	2,5
1,5M Tris (pH 8,8)	–	1,3
0,5M Tris (pH 6,8)	0,13	–
10% dodecylsírany sodný (SDS)	0,01	0,05
10% peroxosírany amonný (APS)	0,01	0,05
TEMED	0,001	0,002

Elektroforéza byla ukončena po cca 60 min, kdy barva z vzorkového pufru doputovala k čelu gelu. Pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue bylo provedeno barvení po dobu 15 min s následným odbarvením pozadí pomocí odbarvovacího roztoku. Po dostatečném odbarvení byl gel vyfocen ve fotodokumentačním boxu. Pro dlouhodobé uchování byly gely přeneseny do roztoku 1% kys. octové.

3.3.2 Purifikace

3.3.2.1 Velkoobjemová produkce TEAD4-DBD long

Do 20 ml sterilního tekutého LB média byl přidán kanamycin do finální koncentrace 35 µg/ml a chloramfenikol do finální koncentrace 50 µg/ml. Pomocí sterilní pipetovací špičky byla přenesena 1 kolonie transformovaných bakteriálních buněk (viz kap. 3.3.1.2) z Petriho misky do 20 ml tekutého LB média s antibiotiky. Buňky byly ponechány růst přes noc při 37 °C za souvislého třepání při rychlosti 200 ot./min.

Byly připraveny 2 l tekutého LB média, které bylo rovnoměrně rozlito do 4 Erlenmayerových baněk o objemu 2 l a média byla sterilizována za pomoci autoklávu. Do každé Erlenmayerovy baňky byl přidán kanamycin (výsledná koncentrace 35 µg/ml) a chloramfenikol (výsledná koncentrace 50 µg/ml). Pomocí elektronického pipetovače bylo sterilní plastovou pipetou přidáno do každé baňky 5 ml noční kultury. Roztoky byly inkubovány při 37 °C za souvislého třepání při rychlosti 200 ot./min.

Průběžně byla měřena OD_{600} proti vodě a při dosažení $OD_{600} = 0,8$ byl k buněčným kulturám přidán roztok isopropyl IPTG do výsledné koncentrace 0,05 mM. Následně byly buněčné kultury ponechány inkubovat po dobu 1 h při teplotě 30 °C při rychlosti třepání 200 ot./min.

3.3.2.2 Izolace proteinů z bakteriální kultury

Média s buňkami byla přelita do dvou centrifugačních kyvet o objemu 1 l a následně byla centrifugována na 2 000× g při 4 °C po dobu 15 min. K jedné z pelet bylo přidáno 50 ml lyzačního pufru, ve kterém byla těsně před použitím rozpuštěna tableta s inhibitory proteas, a peleta byla resuspendována. Vzniklá suspenze byla přelita do druhé kyvety a byla resuspendována i druhá peleta.

Pro následnou dezintegraci buněk bylo vyzkoušeno více postupů a podmínek; jsou tedy uvedeny níže v pořadí, v jakém byly testovány:

A. Rozbití buněk pomocí ultrazvukového homogenizátoru

Suspenze buněk byla rozdělena do dvou centrifugačních kyvet o objemu 40 ml, které byly umístěny do ledu. Pomocí ultrazvukového homogenizátoru UP200S byly buňky vystaveny působení ultrazvuku v režimu pulzování (1 s sonikace následovaná 1 s pauzou) s relativní amplitudou 0,75 po dobu 5 min, aby nedošlo k přehřívání roztoku. Tento postup byl pro každou kyvetu zopakován 3× pro celkovou dobu sonikace 15 min.

Buněčný lyzát byl centrifugován na centrifuze Avanti J-26 XP po dobu 20 min na 40 000× g při 4 °C. Supernatant byl oddělen a dále purifikován pomocí afinitní chromatografie.

B. Rozbití buněk pomocí ultrazvukového homogenizátoru a mražení

Ultrazvukovým homogenizátorem UP200S byly buňky rozbíjeny v režimu 15 s sonikace následovaných 15 s pauzou. Toto bylo zopakováno celkem 10×. Suspenze byla následně 1 h mrazena při teplotě -20 °C a poté byla sonikace se stejnými parametry zopakována (opět 10 cyklů).

Buněčný lyzát byl centrifugován na centrifuze Avanti J-26 XP po dobu 20 min na 40 000× g při 4 °C. Supernatant byl oddělen a dále purifikován pomocí afinitní chromatografie.

C. Rozbití buněk pomocí homogenizátoru EmulsiFlex

Pomocí automatické pipety se špičkou o objemu 1 ml byla opakovaným nasáváním a vypouštěním buněčná suspenze homogenizována. Homogenizátor EmulsiFlex C-3 byl 3× promyt deionizovanou vodou a následně ekvilibrován lyzačním puftrem. Buněčná suspenze byla homogenizována třemi průchody při tlaku 1 100 bar.

Po dokončení procesu rozbití buněk byla suspenze centrifugována na centrifuze Avanti J-26 XP po dobu 20 min na 40 000× g při 4 °C. Supernatant byl oddělen a filtrován přes filtry MiliPore o velikosti 0,45 μm a dále purifikován pomocí afinitní chromatografie.

3.3.2.3 Afinitní chromatografie

Díky tomu, že konstrukt TEAD4-DBD long obsahuje polyhistidinovou kotvu, je možné jako purifikační krok využít afinitní chromatografii.

Kolona naplněná nosičem TALON byla nejprve promyta 50 ml roztoku 0,2M EDTA, čímž došlo k uvolnění kobaltnatých iontů a tedy vyvázání možných nečistot po předchozím použití. Následovalo promytí 50 ml deionizované vody a opětovné nabití kolony 50 ml 0,20 M roztoku CoCl_2 . Závěrečných 50 ml deionizované vody zabezpečilo vymytí zbylých nenavázaných kobaltnatých iontů.

Nabitá kolona byla ekvilibrována příslušným lyzačním pufrem (podle jednotlivých variant postupu) o objemu cca 50 ml. Rozhodující zde bylo ustálení absorbance při 280 nm, která byla sledována po celou dobu afinitní chromatografie pomocí spektrofotometrického detektoru LCD 5000. Ustálená hodnota A_{280} po promytí pak byla použita jako referenční nula. Na takto připravenou kolonu byl nanášen buněčný lyzát (po dobu nanášky chlazen na ledu) a následovalo opět promývání lyzačním pufrem do opětovného ustálení A_{280} . Poté byla kolona promyta promývacím pufrem obsahujícím 30mM imidazol pro uvolnění proteinů, které se navázaly slabě či nespecificky, znovu až do ustálení absorbance. Elučním pufrem obsahujícím 0,2M imidazol pak byly vymyty nejsilněji navázané proteiny.

Jednotlivé frakce byly sbírány do předchlazených falkon umístěných na ledu. V případě varianty postupu využívající k rozbití buněk přístroj EmulsiFlex (viz kap. 3.3.2.2 – varianta C) byla po celou dobu afinitní chromatografie chlazená i celá kolona pomocí ledu.

Pro následnou analýzu jednotlivých kroků afinitní chromatografie byly odebrány 10 μl vzorky, ke kterým bylo přidáno 10 μl 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE (postup viz kap. 3.3.1.4).

3.3.2.4 Štěpení polyhistidinové kotvy

Pro eluované frakce byla pomocí absorbance při 280 nm (měřená na spektrofotometru DeNovix DS-11 FX+) stanovena koncentrace proteinu a následně k nim byl

přidán roztok thrombinu tak, aby byla jeho výsledná aktivita v roztoku 1 U/mg proteinu. Roztok byl poté 2× naředěn HEPES pufrům a ponechán štěpit 16 h při 4 °C. Respektive pro variantu C (viz kap. 3.3.2.2) byl roztok dialyzován v celulosové dialyzační membráně proti 5 l HEPES pufru po dobu 16 h při 4 °C.

Z roztoků po štěpení byl odebrán vzorek 10 µl, ke kterému bylo přidáno 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu (postup viz kap. 3.3.1.4).

3.3.2.5 Gelová permeační chromatografie

Finálním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, díky které byl protein TEAD4-DBD long od zbytků odštěpené polyhistidinové kotvy a ostatních kontaminačních proteinů.

Kolona ENrich SEC 70 10 x 300 mm byla ekvilibrována 50 ml HEPES pufru. Roztok proteinu TEAD4-DBD long po štěpení byl zakoncentrován pomocí koncentračních filtrů Amicon s filtrační mezí 3 000 Da. Koncentrování bylo provedeno při 3 500× g a 4 °C do finálního objemu roztoku 500 µl. Pomocí stříkačky byl vzorek nanesen a za konstantního průtoku 0,7 ml/min byla kolona promývána HEPES pufrům. Prvotní frakce byly sbírány po 5 ml a po překročení absorbance při 280 nm nad hodnotu 20 mAU po 1 ml.

Z vybraných frakcí (individuálně podle příslušného chromatogramu) byly odebrány vzorky 10 µl, ke kterým bylo přidáno 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu (postup viz kap. 3.3.1.4).

3.3.3 Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu

Vzorek purifikovaného proteinu TEAD4-DBD long byl analyzován pomocí hmotnostního spektrometru – ionizace byla provedena pomocí elektrospreje a analýza proběhla s využitím Fourierovy transformace ion cyklotronové resonance (ESI-FT-ICR MS).

Pro redukci pozadí a šumu pro hmotnostně spektrometrickou analýzu byl vzorek odsolen pomocí Protein MicroTrap kolony. Kolona byla nejprve promyta

250 μ l 50% MeOH, následně 250 μ l 80% AcN s 1% kys. octovou, poté 250 μ l 1% kys. octové, znovu 250 μ l AcN s 1% kys. octovou a na závěr 2 \times 250 μ l 1% kys. octové. Padesát μ l vzorku bylo smícháno s 50 μ l 1% kys. octové a poté naneseno na kolonu. Protein, zachycený na koloně byl pak zbaven soli promytím kolony 2 \times 250 μ l 1% kys. octové. Odsolený protein byl z kolony eluován 75 μ l 80% AcN s 1% kys. octovou do čisté mikrozkuhavky. Před měřením byl takto zpracovaný vzorek ještě naředěn v poměru 1 díl vzorku, 3 díly 1% kys. octové a 1 díl 80% AcN s 1% kys. octovou.

3.3.4 Ověření schopnosti proteinu TEAD4-DBD long vázat dvouřetězcovou DNA

Pro ověření schopnosti vyprodukovaného proteinu TEAD4-DBD long vázat dvouřetězcovou DNA byla použita nativní polyakrylamidová elektroforéza. K otestování byl zvolen regulační úsek lidského genu *CTGF* (z angl. „*connective tissue growth factor*“).

3.3.4.1 Příprava dvouřetězcové DNA

Ze zásobních roztoků přímého (*f*, z angl. „*forward*“) a zpětného (*r*, z angl. „*reverse*“) oligonukleotidu o koncentracích 1 mM byl připraven 100 μ M roztok dsDNA smísením 10 μ l *CTGF f*, 10 μ l *CTGF r* a 80 μ l deionizované vody. Směs byla zahřáta v termobloku na teplotu 95 $^{\circ}$ C po dobu 5 min a následně ponechána vychladnout při laboratorní teplotě.

3.3.4.2 Tvorba komplexů proteinu TEAD4-DBD long s DNA a příprava vzorků pro nativní elektroforézu

Roztok proteinu TEAD4-DBD long získaný po gelové permeační chromatografii byl pomocí 0,5 ml centrifugačních koncentrátorech s mezí filtrace 3 000 Da koncentrován ve stolní centrifuze na 4 000 \times g při 4 $^{\circ}$ C až na finální koncentraci 100 μ M. Koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru DeNovix pomocí A_{280} . Pro přepočítání mezi hmotnostní a molární koncentrací byla uvažována relativní molekulová hmotnost TEAD4-DBD long (nyní již bez polyhistidinové kotvy) 15 437,76 Da.

Ze 100 μ M roztoku dsDNA byl připraven druhý roztok o koncentraci 10 μ M smíšením 5 μ l 100 μ M dsDNA s 45 μ l deionizované vody. Takto připravené roztoky pak byly použity pro přípravu vzorků pro nativní gelovou elektroforézu. Rozpis objemů jednotlivých složek je uveden v Tab. 2.

Tab. 2 Složení vzorků pro nativní gelovou elektroforézu. Ke všem vzorkům byly přidány 2 μ l vzorkového pufru.

vzorek	objem jednotlivých složek (μ l)				
	1mM ssDNA <i>f/r</i>	10 μ M dsDNA	100 μ M dsDNA	100 μ M protein	HEPES pufr
ssDNA <i>f</i>	1,2 (<i>f</i>)	-	-	-	8,8
ssDNA <i>r</i>	1,2 (<i>r</i>)	-	-	-	8,8
dsDNA	-	-	-	-	-
protein	-	-	-	1	-
3 μ M dsDNA + protein	-	3	-	1	6
5 μ M dsDNA + protein	-	5	-	1	4
10 μ M dsDNA + protein	-	-	1	1	8
20 μ M dsDNA + protein	-	-	2	1	7
40 μ M dsDNA + protein	-	-	4	1	5

3.3.4.3 Nativní gelová elektroforéza

Byl připraven polyakrylamidový gel pro nativní gelovou elektroforézu, jehož složení je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3 Složení gelu pro nativní gelovou elektroforézu pro celkový objem gelu 10 ml

složka	objem (ml)
deionizovaná voda	5,0
30% akrylamidová směs	4,0
10 \times TBE (pH 8,3)	1,0
10% peroxosíran amonný (APS)	0,08
TEMED	0,008

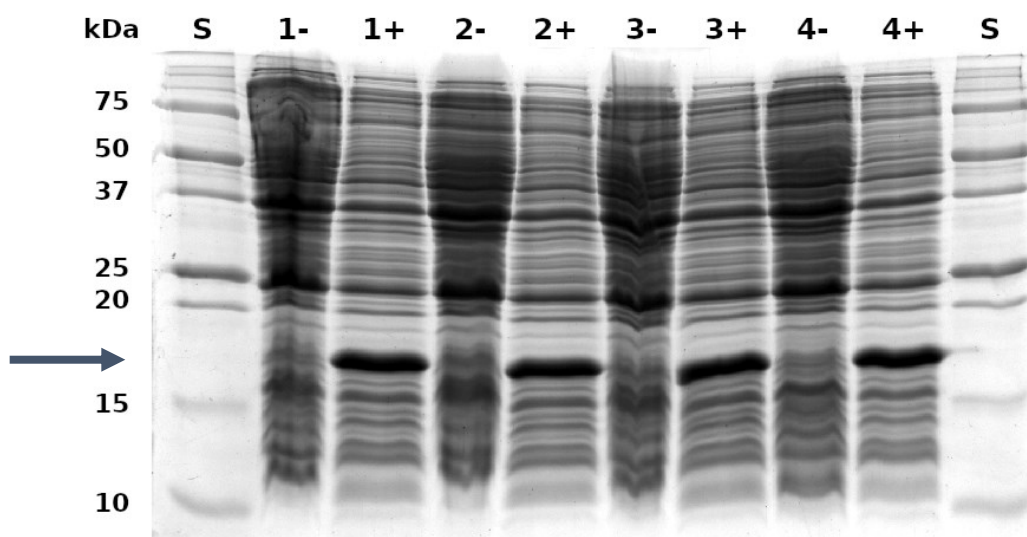
Do jamek gelu bylo nanášeno 12 μl od každého vzorku komplexů a DNA a 3 μl vzorku čistého proteinu. Nativní gelová elektroforéza probíhala v přítomnosti 1 \times koncentrovaného TBE pufru za konstantního napětí 50 V a současného chlazení pomocí lázně led–voda. Elektroforéza byla ukončena po 90 min, kdy barva obsažená ve vzorkovém pufru doputovala přibližně do poloviny gelu.

Následně bylo provedeno barvení pomocí barvy s obchodním názvem GelRed, která specificky barví nukleové kyseliny. Pracovní koncentrace barvy bylo dosaženo naředěním 15 μl této barvy v 50 ml deionizované vody. V této lázni byl gel bez přístupu světla barven 60 min. Ihned poté byl gel vyfotografován ve fotodokumentačním boxu s použitím UV záření o vlnové délce 312 nm. Na závěr byl gel obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue po dobu 15 min. Po odbarvení pozadí v odbarvovacím roztoku byl gel znovu vyfocen ve fotodokumentačním boxu.

4 Výsledky

4.1 Test produkce TEAD4-DBD long

Pro ověření správné funkce vektoru pET 28(a)-TEAD4-DBD long a jeho schopnosti produkovat studovaný protein ve zvoleném bakteriálním systému *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus – RIPL, byl proveden test produkce. Osm vybraných kolonií buněk (vypěstovaných po transformaci plazmidem) bylo kultivováno v párových kulturách, z nichž vždy jedna byla indukována IPTG (výsledná koncentrace 0,05 mM). Na Obr. 15 je zobrazen gel z SDS-PAGE analýzy jednotlivých vzorků. Ukázána jsou data pro první 4 páry vzorků – výsledky pro zbylé 4 páry jsou shodné.



Obr. 15 Test produkce TEAD4-DBD long – gel z SDS-PAGE. S označuje proteinový standard, čísla 1–4 jsou označeny vzorky z jednotlivých kolonií, symbolem + jsou označeny kolonie indukované IPTG, symbolem – kolonie, které indukovány nebyly. Relativní molekulová hmotnost proteinu TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou je přibližně 17,3 kDa. Poloha proužku, který této hmotnosti odpovídá, je znázorněna šipkou.

Předpokládána relativní molekulová hmotnost proteinu TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou je cca 17,3 kDa. Proužek zhruba odpovídající této hmotnosti je na gelu (viz šipka na Obr. 15) dobře patrný u všech vzorků, u kterých byla provedena indukce. Naopak u neindukovaných kultur tento proužek vidět není.

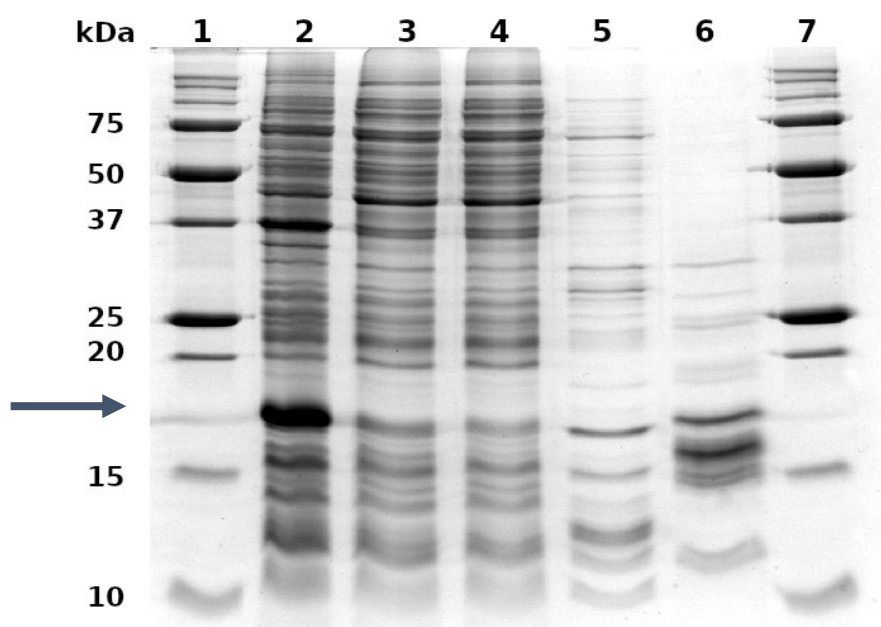
4.2 Purifikace

4.2.1 Izolace proteinů z bakteriální kultury

Protein TEAD4-DBD long byl produkován ve 2 l LB média při koncentraci IPTG jako induktoru 0,05 mM, teplotě 30 °C za stálého třepání 200 ot./min po dobu 1 h.

A. Rozbití buněk pomocí ultrazvukového homogenizátoru

Při prvních pokusech byl následován zavedený protokol, kdy byl k rozbití buněk použit ultrazvukový homogenizátor a lyzační pufr 1 (viz kap. 3.3.2.2, str. 41). Na Obr. 16 je reprezentativní gel z SDS-PAGE analýzy tohoto typu postupu.

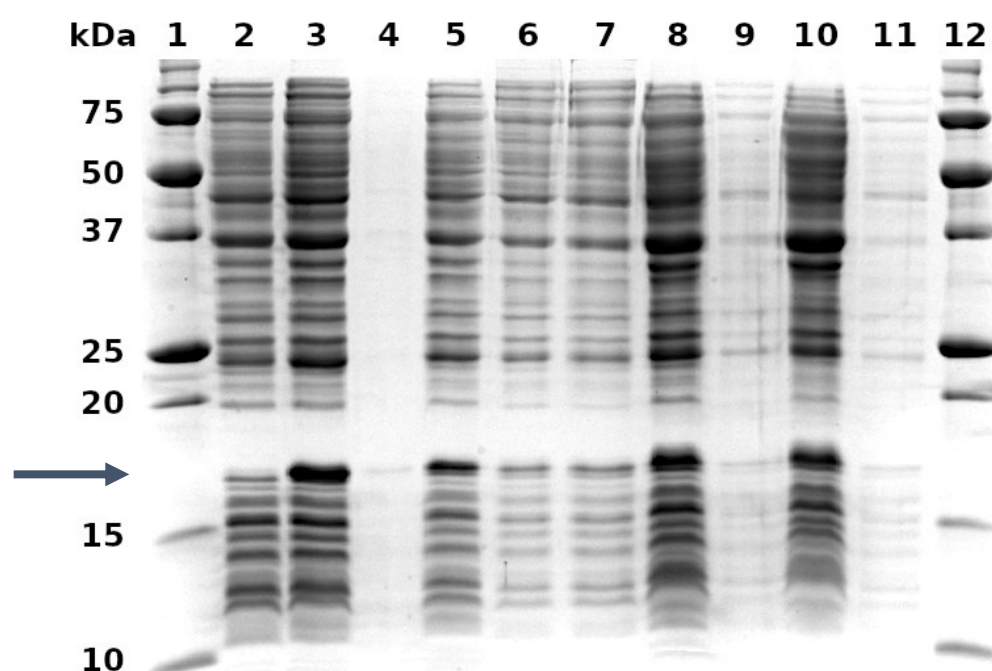


Obr. 16 Rozbítí buněk sonikací (varianta A1) – gel z SDS-PAGE. 1 – proteinový standard; 2 – peleta po 1 h expresi; 3 – buněčný lyzát nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii; 4 – frakce nezachycená na koloně; 5 – frakce vymytá promývacím pufrem; 6 – eluovaná frakce; 7 – proteinový standard. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

Z Obr. 16 je patrné, že ačkoli k produkci proteinu TEAD4-DBD long v bakteriálních buňkách dochází (dráha 2), po rozbití buněk ho do supernatantu nanášeného na kolonu (dráha 3) přechází jen velmi malé množství. V samotném vzorku buněčného lyzátu nanášeného na kolonu pro afinitní chromatografii je na gelu z SDS-PAGE obtížně detekovatelný, jeho přítomnost je snadné vidět až ve vzorku po eluci (dráha 6), kdy byl protein koncentrován díky afinitní chromatografii. V této

dráze jsou též patrné další proteiny o nižší relativní molekulové hmotnosti, než je očekávaná pro konstrukt TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou (cca 17,3 kDa).

Jako další postup byly srovnány dva různé lyzační pufrы – fosfátový o pH 7,4 (lyzační pufr 1) a HEPES o pH 8,0 (lyzační pufr 2). Gel z SDS-PAGE analýzy pro tento typ postupu je uveden na Obr. 17. Pro tyto pokusy bylo postupováno pouze po druhé centrifugaci, která předchází afinitní chromatografii (ta už v tomto případě prováděna nebyla), jelikož v této fázi bylo cílem nalezení vhodných podmínek pro rozbití buněk, aby byl zajištěn přechod co největšího množství vyprodukovaného proteinu po rozbití buněk do volného roztoku.



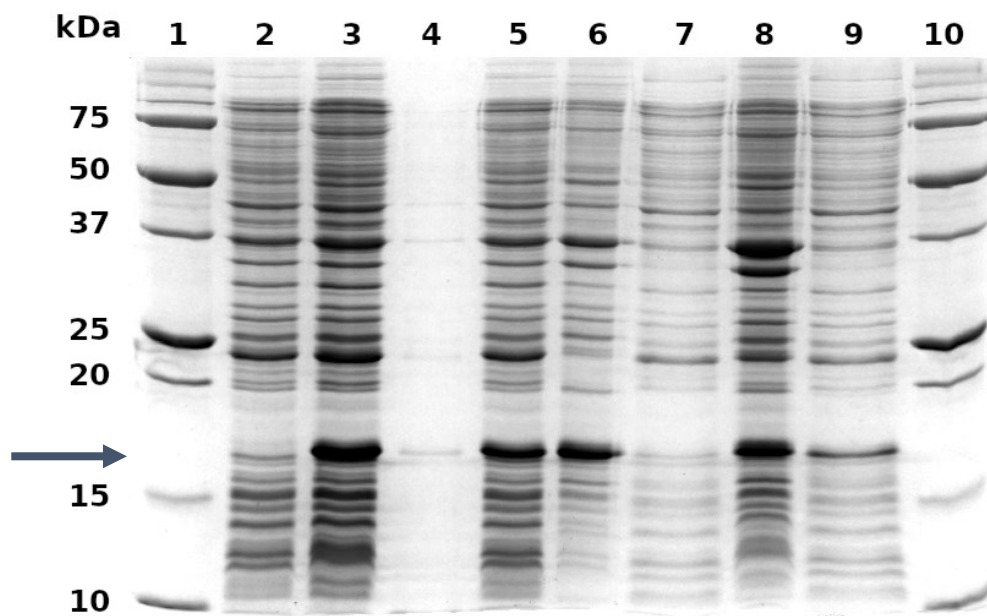
Obr. 17 Srovnání rozbití buněk ve fosfátovém vs. HEPES pufru (varianta A2) – gel z SDS-PAGE. 1 – proteinový standard; 2 – bakteriální peleta před indukci IPTG; 3 – peleta po 1 h expresi; 4 – LB médium 1 h po expresi; 5 – bakteriální peleta z první centrifugace; 6 – buněčný lyzát po sonikaci v přítomnosti fosfátového pufru; 7 – buněčný lyzát po sonikaci v přítomnosti HEPES pufru; 8 – peleta po druhé centrifugaci pro fosfátový pufr; 9 – supernatant z druhé centrifugace nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii (fosfátový pufr); 10 – peleta po druhé centrifugaci pro HEPES pufr; 11 – supernatant z druhé centrifugace nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii (HEPES pufr); 12 – proteinový standard. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

Ani u jedné z drah se vzorky z nánosu buněčného lyzátu na kolonu pro afinitní chromatografii není nijak výrazně viditelný (dráha 9 pro fosfátový pufr a dráha 11 pro HEPES pufr). Proužek odpovídající relativní molekulové hmotnosti

konstruktu TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou je možné pozorovat u vzorků z druhé centrifugace pro oba testované pufrы (dráha 8 pro fosfátový pufr a dráha 10 pro HEPES pufr).

B. Rozbití buněk pomocí ultrazvukového homogenizátoru a mražení

Pro tuto variantu postupu byla po homogenizaci ultrazvukem bakteriální suspenze na 1 h mrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté ještě jednou sonikována. Na Obr. 18 je gel z SDS-PAGE analýzy srovnávající rozbití buněk s použitím pouze sonikace versus sonikace, mražení a druhé sonikace. V obou případech byl použit lyzační pufr 1 (fosfátový pufr o pH 7,4).

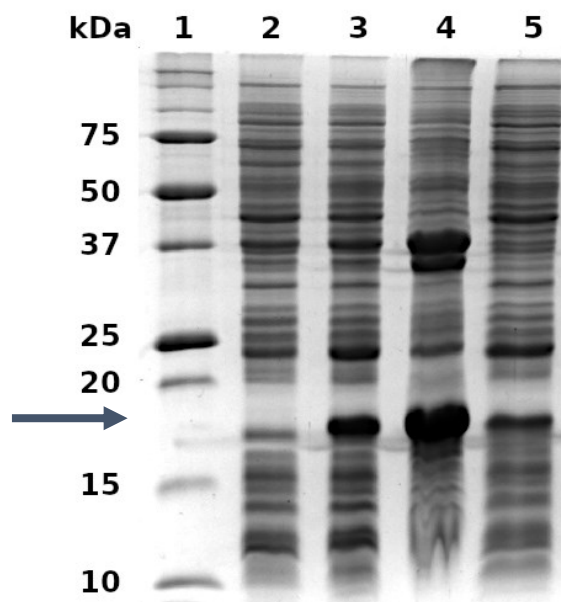


Obr. 18 Rozbití buněk pouze sonikací vs. sonikací + mražením (varianta B) – gel z SDS-PAGE. 1 – proteinový standard; 2 – bakteriální peleta před indukcí IPTG; 3 – peleta po 1 h expresi; 4 – supernatant z první centrifugace; 5 – peleta z první centrifugace; 6 – peleta po druhé centrifugaci (sonikace); 7 – supernatant z druhé centrifugace nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii (sonikace); 8 – peleta po druhé centrifugaci (sonikace + mražení + sonikace); 9 – supernatant z druhé centrifugace nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii (sonikace + mražení + sonikace); 10 – proteinový standard. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

V dráze 7 (nános na afinitní chromatografii – pouze sonikace) je proužek odpovídající konstruktu TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou jen velmi málo viditelný. V dráze 9 (nános na afinitní chromatografii – sonikace, mražení, druhá sonikace) je tento proužek více patrný.

C. Rozbití buněk pomocí homogenizátoru EmulsiFlex

Jako poslední varianta postupu rozbití bakteriálních buněk bylo testováno použití homogenizátoru EmulsiFlex. Gel z SDS-PAGE analýzy pro tento postup je na Obr. 19.



Obr. 19 Rozbití buněk pomocí homogenizátoru EmulsiFlex (varianta C) – gel z SDS-PAGE. 1 – proteinový standard; 2 – bakteriální peleta před indukcí IPTG; 3 – peleta po 1 h expresi; 4 – peleta po druhé centrifugaci; 5 – supernatant z druhé centrifugace nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

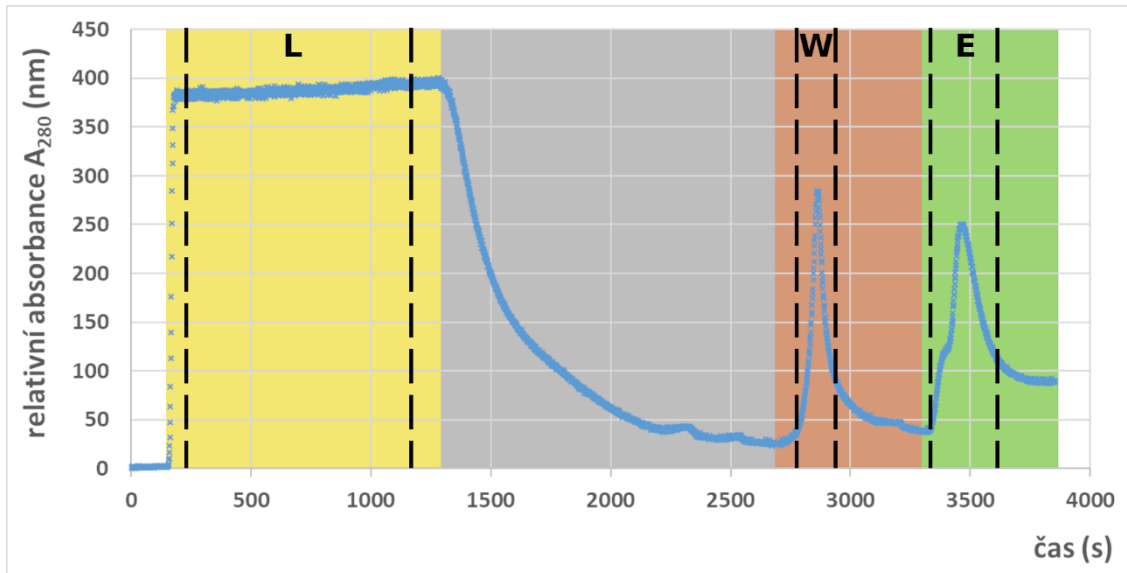
Proužek odpovídající relativní molekulové hmotnosti konstruktu TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou byl detekován u vzorku z pelety po druhé centrifugaci (dráha 4) i u vzorku z nánosu na kolonu pro afinitní chromatografii (dráha 5).

Pro další pokusy byla zvolena metoda rozbití buněk pomocí homogenizátoru EmulsiFlex.

4.2.2 Afinitní chromatografie a odštěpení polyhistidinové kotvy

Polyhistidinová kotva na produkovaném konstruktu TEAD4-DBD long se specificky váže na Co^{2+} ionty. Na nosiči TALON nabitém těmito ionty je možné takový konstrukt zachytit a poté eluovat pomocí roztoku obsahujícím imidazol.

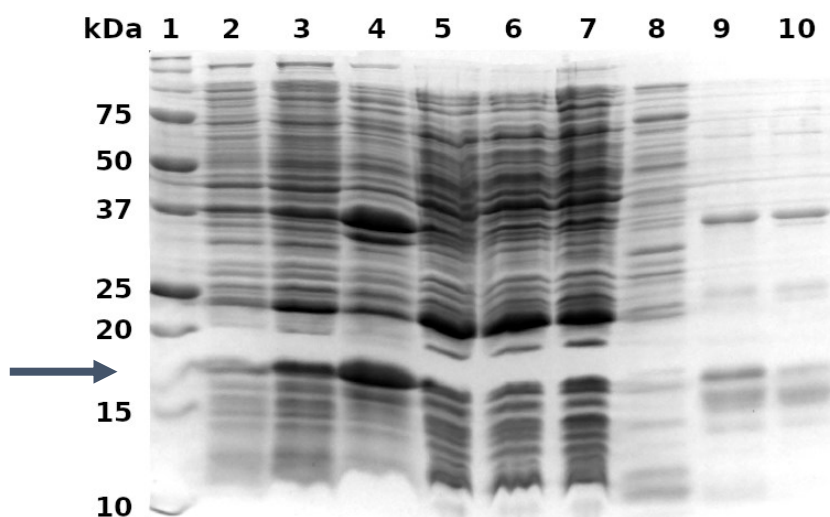
Buněčný lyzát získaný po rozbití buněk homogenizátorem EmulsiFlex byl centrifugován a získaný supernatant byl nanášen na kolonu za stálého chlazení na ledu. Průběh afinitní chromatografie byl sledován pomocí absorbance při 280 nm. Záznam reprezentativní afinitní chromatografie je uveden na Obr. 20.



Obr. 20 Záznam průběhu afinitní chromatografie na koloně s nosičem TALON

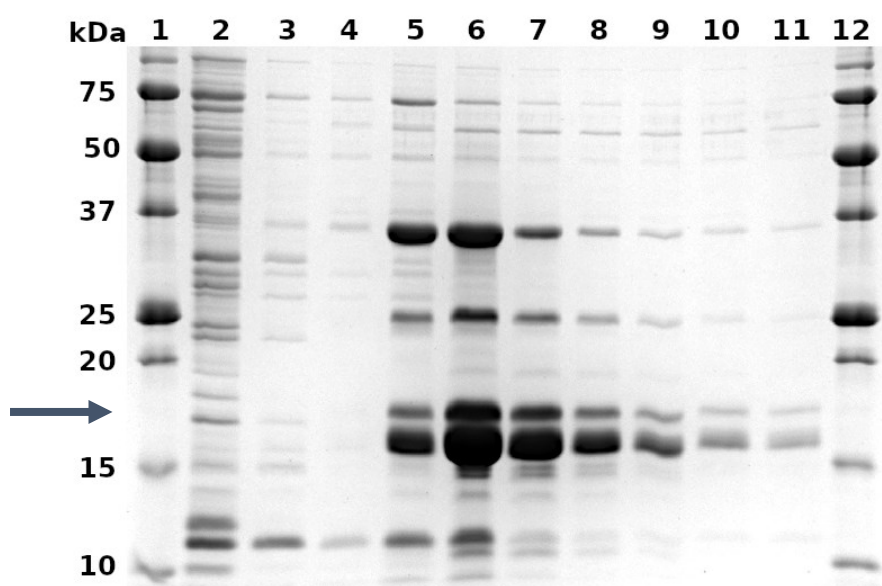
– kolona nabitá Co^{2+} ionty, chlazená ledem, průtok 1 ml/min. Na grafu je vynesena závislost relativní hodnoty absorbance při 280 nm na čase. Žlutě je podbarvena fáze nanášení buněčného lyzátu na kolonu, písmenem „L“ je pak označena jímaná frakce, ze které byl odebrán vzorek na SDS-PAGE; šedě je znázorněno promývání kolony lyzačním pufrem.; červeně vymytí kolony promývacím pufrem s 30mM imidazolem, písmenem „W“ je označena jímaná frakce; zeleně eluce 0,2M imidazolem, písmenem „E“ jímaná frakce.

Na Obr. 21, str. 54 je zobrazen gel z SDS-PAGE analýzy celé velkoobjemové produkce TEAD4-DBD long od indukce bakteriální kultury IPTG až po štěpení thrombinem.



Obr. 21 Velkoobjemová produkce TEAD4-DBD long, gel z SDS-PAGE. 1 – proteinový standard; 2 – bakteriální peleta před indukcí IPTG; 3 – peleta po 1 h expresi; 4 – peleta po druhé centrifugaci; 5 – supernatant z druhé centrifugace; 6 – supernatant po filtraci (nanášený na kolonu pro afinitní chromatografii); 7 – frakce nezachycená na koloně („L“); 8 – frakce vymytá promývacím pufrem („W“) – směsný vzorek, viz Obr. 22; 9 – eluovaná frakce („E“) – směsný vzorek, viz Obr. 22; 10 – frakce po dialýze a štěpení thrombinem. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

Frakce vymyté promývacím pufrem byly zachyceny po 2×10 ml, během eluce byly zachytávány frakce po 2 ml. Z frakcí eluovaných promývacím pufrem a z vybraných elučních frakcí byly odebrány vzorky na SDS-PAGE analýzu (Obr. 22).



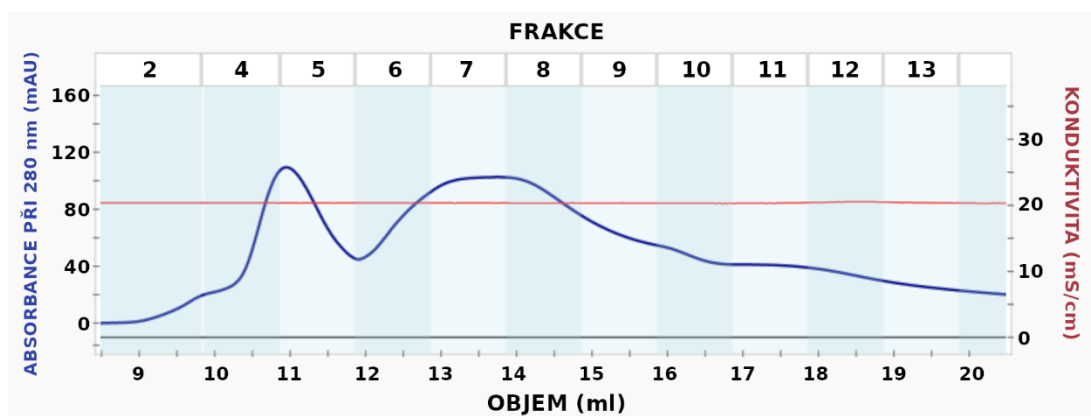
Obr. 22 SDS-PAGE analýza jednotlivých eluovaných frakcí. 1 – proteinový standard; 2 – nános na kolonu; 3–4 – frakce získané pomocí promývacího pufru; 5–11 – frakce získané pomocí elučního pufru. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

Z gelu je patrné, že určitá část nespecificky navázaných proteinů byla z kolony uvolněna při použití promývacího pufru (dráhy 3 a 4), ale velká část kontaminujících proteinů je přítomna i v eluci. Pro další zpracování byly spojeny frakce z drah 5–8, byl k nim přidán thrombin pro odštěpení polyhistidinové kotvy a roztok byl přes noc dialyzován proti 5 l HEPES pufru. Následně byl protein purifikován s použitím gelové permeační chromatografie.

4.2.3 Gelová permeační chromatografie

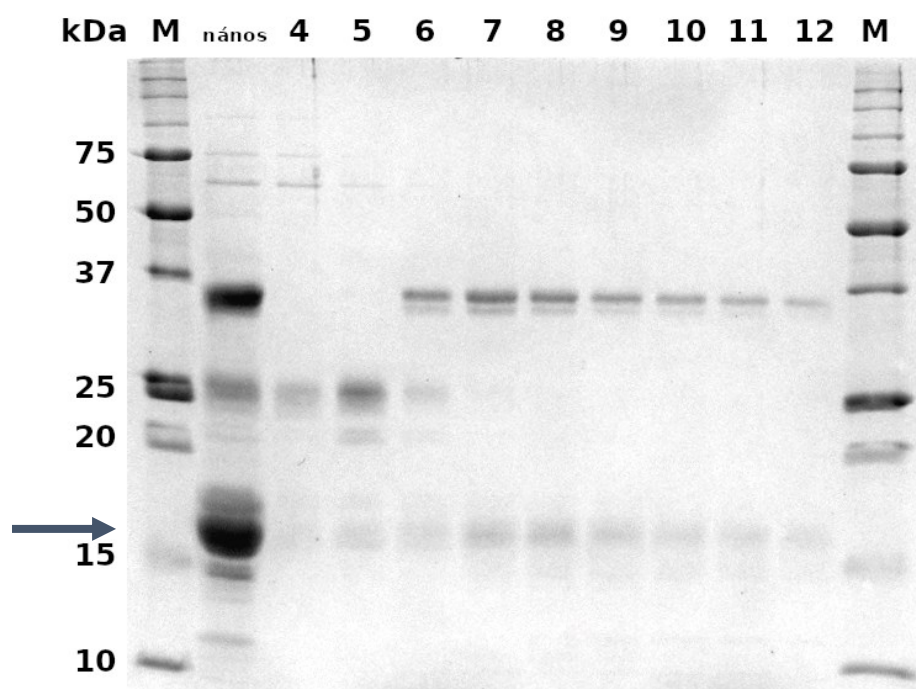
Poslední purifikační krok spočíval v gelové permeační chromatografii, kterou byl oddělen protein TEAD4-DBD long od thrombinu, zbytků odštěpené polyhistidinové kotvy a ostatních kontaminačních proteinů.

Před nánosem na kolonu byl vzorek za stálého chlazení koncentrován. Průběh gelové permeační chromatografie byl sledován pomocí absorbance při 280 nm. Na Obr. 23 je zobrazen záznam průběhu chromatografie.



Obr. 23 Průběh gelové permeační chromatografie – kolona ENrich SEC 70 10 × 300 mm, teplota 25 °C, HEPES pufr, průtok 0,7 ml/min, koncentrace vzorku 9,8 mg/ml. Absorbance při 280 nm je znázorněna modře. V horní části je vidět rozdělení frakcí – frakce 2 o objemu 5 ml, další pak byly sbírány po 1 ml.

Na průběhu gelové permeační chromatografie je vidět několik lokálních maxim, spadajících do frakcí 4 až 5, který náleží proteinu či proteinům o vyšší molekulové hmotnosti. Po něm následuje lokální maximum, které nemá jasně danou špičku a spadá do frakcí 6 až 9. Za účelem zjištění, jak se podařilo proteiny ve vzorku rozdělit, byly z frakcí 4 až 12 odebrány vzorky na SDS-PAGE analýzu, jejíž gel je zobrazen na Obr. 24, str. 56.



Obr. 24 Gel z SDS-PAGE analýzy jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie. S – proteinový standard; nános – nános na kolonu; 4–12 – jednotlivé eluované frakce. Šipka označuje polohu produkovaného proteinu TEAD4-DBD long.

Z gelu na Obr. 24 je vidět, že gelovou permeační chromatografií byly odděleny neznámé kontaminační proteiny o relativní molekulové hmotnosti cca 75, 65 a 25 kDa (frakce 4 a 5) od proteinu TEAD4-DBD long (frakce 7 až 12). Spolu s proužkem odpovídajícím produkovanému proteinu se v těchto drahách na gelu objevuje i výraznější proužek odpovídající relativní molekulové hmotnosti zhruba 34 kDa. Ten se nachází již ve vzorku z nánosu na kolonu.

Před dalšími experimenty byla frakce 7 analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie o vysokém rozlišení.

4.3 Hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného proteinu

Vzorek frakce 7 z gelové permeační chromatografie byl odsolen, okyselen a následně analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením v uspořádání ESI-FT-ICR. Získané hmotnostní spektrum je uvedeno v Příloze 1.

Analýzou bylo získáno velké množství překrývajících se signálů, pomocí softwarového vyhodnocení byly identifikovány jednotlivé formy proteinu TEAD4-DBD long (viz Tab. 4).

Tab. 4 Zpracované signály z hmotnostně spektrometrické analýzy. Dekonvulované hodnoty relativní molekulové hmotnosti byly seřazeny dle intenzity signálu v naměřeném spektru (podíl v %) a přiřazeny k fragmentům konstruktů TEAD4-DBD long.

podíl (%)	naměřená rel. mol. hm. (Da)	rel. mol. hm. fragmentu (Da)	chyba (ppm)	sekvence fragmentu
55	12000,39	11999,38	0	GSHMALDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEAL AIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYI KLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQ A KLKDQAAKDKALQSMA
18	13131,95	13130,94	0	GSHMALDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEAL AIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYI KLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQ A KLKDQAAKDKALQSMAAMSSAQIISATA
16	6273,09	6272,08	0	GSHMALDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEAL AIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELI
6	6344,12	6343,11	0	GSHMALDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEAL AIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIA
4	12959,87	12958,85	-1	GSHMALDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEAL AIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYI KLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQ A KLKDQAAKDKALQSMAAMSSAQIISA
1	13060,91	13059,90	0	GSHMALDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEAL AIYPPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYI KLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQ A KLKDQAAKDKALQSMAAMSSAQIISAT

Pomocí získaných relativních molekulových hmotností jednotlivých forem byly určeny jejich sekvence. Níže jsou uvedeny první tři identifikované formy, které dohromady tvoří 89 % zastoupení v naměřeném spektru.

Nejzastoupenější forma proteinu TEAD4-DBD long (55 %) měla relativní molekulovou hmotnost 11 999,38 Da. Část proteinu odpovídající této hmotnosti je v sekvenci konstruktů TEAD4-DBD long vyznačena na Obr. 25, str. 58.

-22 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMA₃₀LDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAIYPPCGRRKI 66
 67 ILSDEGKMYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQAKLKDQAAKDKAL 128
 129 QSMAAMSSAQIISATAFHSSMALARGPGRPAVSGFWQG 166

Obr. 25 Primární sekvence konstruktů TEAD4-DBD long s vyznačením nejzastoupenějšího fragmentu (podtržení). Žlutá – polyhistidinová kotva; modrá – štěpné místo pro thrombin; šedé podbravení – DNA vazebná doména. Dolní číselný index značí počátek TEAD4-DBD long, dle pořadí aminokyseliny v sekvenci TEAD4. Přidaná polyhistidinová kotva se štěpným místem pro thrombin je číslována záporně.

Jak je z vyznačené sekvence patrné, štěpení thrombinem vedlo k úspěšnému oddělení polyhistidinové kotvy. Této formě proteinu TEAD4-DBD long ale schází 34 aminokyselin z C-konce, DNA vazebná doména však zůstává kompletní.

Druhá nejzastoupenější forma (18 %) odpovídá relativní molekulové hmotnosti 13 130,94 Da. Sekvence této formy je vyznačena na Obr. 26.

-22 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMA₃₀LDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAIYPPCGRRKI 66
 67 ILSDEGKMYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQAKLKDQAAKDKAL 128
 129 QSMAAMSSAQIISATAFHSSMALARGPGRPAVSGFWQG 166

Obr. 26 Primární sekvence konstruktů TEAD4-DBD long s vyznačením druhého nejzastoupenějšího fragmentu (podtržení). Žlutá – polyhistidinová kotva; modrá – štěpné místo pro thrombin; šedé podbravení – DNA vazebná doména. Dolní číselný index značí počátek TEAD4-DBD long, dle pořadí aminokyseliny v sekvenci TEAD4. Přidaná polyhistidinová kotva se štěpným místem pro thrombin je číslována záporně.

I u této formy proběhlo štěpení thrombinem v pořádku, z C-konce ovšem schází 22 aminokyselin, DNA vazebná doména je i v případě tohoto fragmentu nedotčená.

Třetí nejzastoupenější forma (16 %) odpovídá fragmentu s relativní molekulovou hmotností 6 272,08 Da. Příslušná část je vyznačena v sekvenci konstruktů na Obr. 27, str. 59.

-22 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMA₃₀LDKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAIYPPCGRRKI 66
 67 ILSDEGKMYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARRKAREIQAKLKDQAAKDKAL 128
 129 QSMAAMSSAQIISATAFHSSMALARGPGRPAVSGFWQG 166

Obr. 27 Primární sekvence konstruktů TEAD4-DBD long s vyznačením třetího nejzastoupenějšího fragmentu (podtržení). Žlutá – polyhistidinová kotva; modrá – štěpné místo pro thrombin; šedé podbravení – DNA vazebná doména. Dolní číselný index značí počátek TEAD4-DBD long, dle pořadí aminokyseliny v sekvenci TEAD4. Přidaná polyhistidinová kotva se štěpným místem pro thrombin je číslována záporně.

Tento fragment je tvořen pouhými 56 aminokyselinami nacházejícími se na N-konci a větší část konstruktů chybí. Z vyznačené sekvence je také zřejmé, že tento fragment obsahuje pouze zhruba polovinu DNA vazebné domény.

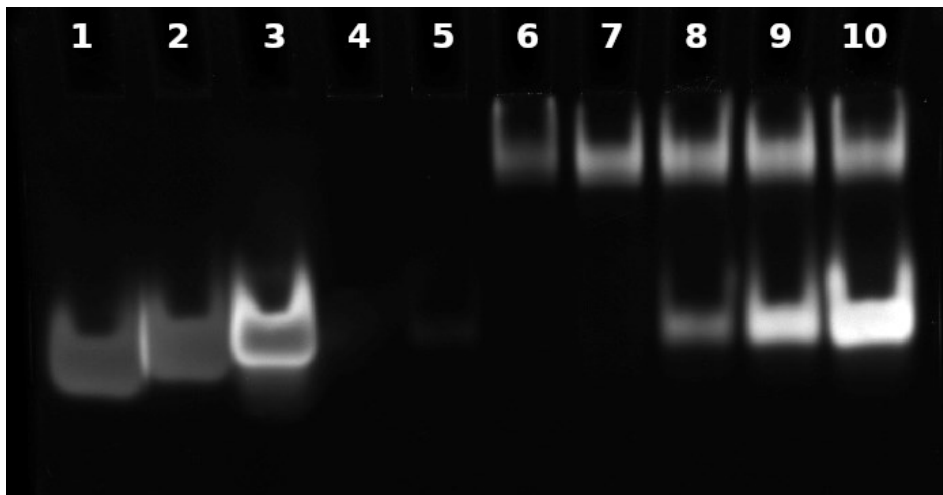
Zbylé identifikované signály náležely dalším fragmentům proteinu TEAD4-DBD long, jejich signály však měly již výrazně nižší intenzitu. Žádný z identifikovaných signálů neodpovídal plnodélkovému konstruktů (relativní molekulová hmotnost 15 428,07 Da).

4.4 Ověření schopnosti TEAD4-DBD long vázat dvouřetězcovou DNA

Schopnost vazby dvouřetězcové DNA byla ověřena pomocí nativní gelové elektroforézy. Tato metoda využívá předpokladu, že nativní protein gelem putuje pouze po navázání na záporně nabitou molekulu DNA. Komplex protein–DNA pak díky své vyšší molekulové hmotnosti gelem putuje pomaleji než samotná DNA.

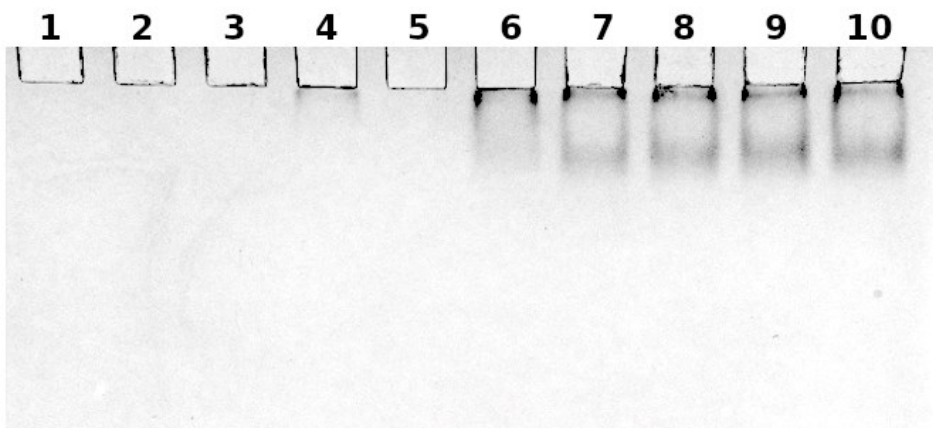
Pro ověření vazby byl zvolen oligonukleotid pocházející z regulačního úseku lidského genu *CTGF* (z angl. „*connective tissue growth factor*“).

Výsledný gel, na kterém byla specificky obarvena DNA pomocí barvy GelRed, je zobrazen na Obr. 28, str. 60. Komplex dsDNA–protein je možné pozorovat již od nejnižší koncentrace DNA (dráha 6). Od koncentrace DNA 10 μ M výše (dráhy 8 až 10) není protein schopen vázat veškerou přítomnou DNA a ta tak putuje gelem dále než komplex.



Obr. 28 Gel z nativní elektroforézy barvení pomocí GelRed. 1 – ssDNA *f*; 2 – ssDNA *r*; 3 – dsDNA; 4 – protein kontrola; 5 – prázdná dráha; 6 – 3 μ M DNA + 10 μ M protein; 7 – 5 μ M DNA + 10 μ M protein; 8 – 10 μ M DNA + 10 μ M protein; 9 – 20 μ M DNA + 10 μ M protein; 10 – 40 μ M DNA + 10 μ M protein.

Na závěr byl gel obarven barvou Coomassie Brilliant Blue pro vizualizaci proteinu (Obr. 29). Na gelu je tak vidět protein, který se nacházel v komplexu s DNA, a proto zaputoval do gelu. Jeho mobilita odpovídá signálům komplexu barveného na přítomnost DNA.



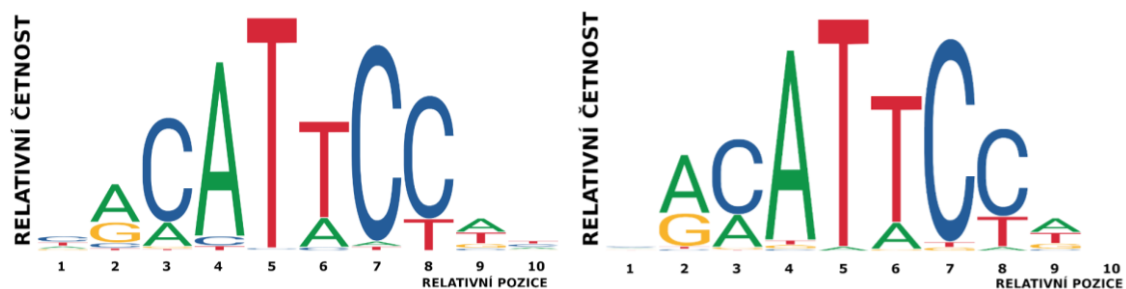
Obr. 29 Gel z nativní elektroforézy barvený pomocí Coomassie Brilliant Blue. 1 – ssDNA *f*; 2 – ssDNA *r*; 3 – dsDNA; 4 – protein kontrola; 5 – prázdná dráha; 6 – 3 μ M DNA + 10 μ M protein; 7 – 5 μ M DNA + 10 μ M protein; 8 – 10 μ M DNA + 10 μ M protein; 9 – 20 μ M DNA + 10 μ M protein; 10 – 40 μ M DNA + 10 μ M protein.

5 Diskuze

Transkripční faktory hrají klíčovou úlohu v zajišťování buněčných pochodů, udržování stálosti vnitřního prostředí, reakcích na okolní podněty a řízení osudu buňky [1,4]. Tento systém se svou nezbytnou komplexností ale také může stát zdrojem řady závažných komplikací, pokud je například porušena signalizace, která zmíněné procesy spravuje. Z tohoto důvodu jsou transkripční faktory předmětem zkoumání biochemie a strukturní biologie, kdy je pochopení jejich fungování základním předpokladem pro případný terapeutický zásah na této úrovni.

Rodina transkripčních faktorů TEAD se podílí na expresi genů zodpovědných za růst, dělení a diferenciaci buněk či bránění apoptose [1,73]. Funkce faktorů TEAD je regulována na úrovni interakce s jejich koaktivátory pomocí konzervované signalizační dráhy Hippo [3,67]. Porušení regulace těchto transkripčních faktorů má přímou souvislost s řadou nádorových onemocnění [67]. Jedna ze strategií regulace aktivity transkripčních faktorů TEAD je v ovlivnění interakce s jejich koaktivátory [64]. Alternativně je možné se zaměřit na vazbu transkripčních faktorů TEAD na DNA. Struktura DNA vazebné domény byla již odhalena s pomocí nukleární magnetické resonance a rentgenové krystalografie, konkrétní strukturní dynamika interakce této domény s DNA nebyla doposud zcela objasněna [5,6].

V rámci této diplomové práce byla připravována DNA vazebná doména lidského transkripčního faktoru TEAD4 prodloužená o úsek propojující tuto doménu s transkripční doménou, viz sekvence na Obr. 4, str. 19. Ačkoli je DNA vazebná doména v rámci rodiny transkripčních faktorů TEAD téměř identická, jednotliví zástupci se mírně liší ve svém DNA vazebném profilu (viz Obr. 30).



Obr. 30 Porovnání preferovaných vazebných DNA sekvencí pro TEA1 (vlevo) a TEAD4 (vpravo). Převzato a upraveno [54].

Tato mírná variabilita mezi zástupci rodiny faktorů TEAD by mohla být dána aminokyselinovou sekvencí úseků, které spojují DNA vazebnou doménu s transaktivací doménou, což už bylo dříve pozorováno (Lee, 2014). U proteinu TEAD4-DBD long by pak návazně měly být zkoumány interakce s různými motivy DNA a porovnány rozdíly mezi jednotlivými transkripčními faktory rodiny TEAD.

Protein TEAD4-DBD long byl produkován v bakteriálním expresním kmenu *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Tento bakteriální kmen byl použit autory NMR strukturní analýzy DNA vazebné domény a jeho vhodnost byla potvrzena i naší laboratoří [5].

Testem produkce byla potvrzena exprese proteinu TEAD4-DBD long u cíleně indukovaných buněk pomocí IPTG. Z porovnání indukovaných a neindukovaných frakcí je patrný úbytek ostatních bakteriálních proteinů na úkor produkovaného TEAD4-DBD long. Lze tak usuzovat, že expresní aparát buněk byl zaměstnán produkcí cílového proteinu a samotný růst a dělení buněk bylo upozaděno.

Během velkoobjemové produkce nastala komplikace při rozbíjení bakteriálních buněk, kdy po použití ultrazvukového homogenizátoru zůstával protein TEAD4-DBD long z velké části v bakteriální peletě (viz Obr. 16, str. 49) a jeho výtěžky tak nebyly dostačující pro další purifikační kroky a následné experimenty. V gelu z SDS-PAGE analýzy bylo zároveň u frakce eluované z kolony pro afinitní chromatografii pozorováno větší množství proužků odpovídajících nižším relativním molekulovým hmotnostem, než jaká přísluší produkovanému konstruktu. S největší pravděpodobností se jedná o produkty částečné degradace proteinu TEAD4-DBD long.

Za účelem zvýšení výtěžku produkovaného proteinu bylo testováno rozbití buněk ultrazvukovým homogenizátorem v prostředí odlišného pufru – fosfátový pufr vs. HEPES pufr. Mezi těmito pufrů ovšem nebyl pozorován žádný rozdíl (viz Obr. 17, str. 50) a většina produkovaného proteinu po centrifugaci bakteriální suspenze vzniklé rozbitím buněk zůstává v peletě. Je tak možné, že rozbití buněk pomocí ultrazvukového homogenizátoru není optimální metoda pro získání proteinu TEAD4-DBD long.

V další variantě byl testován jiný režim ultrazvukové homogenizace v kombinaci s mražením bakteriální suspenze na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při porovnání tohoto přístupu s použitím pouze ultrazvukového homogenizátoru (viz Obr. 18, str. 51) je patrné, že při použití mražení je do supernatantu uvolněno větší množství produkovaného proteinu než při použití pouze ultrazvukového homogenizátoru. Ani tento výtěžek však není dostačující.

Třetím přístupem při rozbití buněk bylo využití homogenizátoru EmulsiFlex, který využívá prudké změny tlaku k disrupci membrán. Výhoda této metody spočívá v lepší reprodukovatelnosti, kdy jediným regulovatelným parametrem je homogenizační tlak. Ačkoli i při použití této metody zůstává nezanedbatelná část proteinu TEAD4-DBD long v bakteriální peletě, bylo zároveň docíleno nejvyššího podílu produkovaného proteinu v supernatantu, který byl dále purifikován s použitím afinitní chromatografie.

Ačkoli byly vyzkoušeny různé způsoby rozbití buněk za účelem co největšího výtěžku proteinu, jeho velká část po následné centrifugaci zůstávala v peletě. Je pravděpodobné, že produkovaný protein je v *E. coli* agregován do buněčných inkluzí. Možným řešením by mohlo být snížení teploty, za které je protein exprimován (např. 16 až $24\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Při afinitní chromatografii byla využita přítomnost polyhistidinové kotvy na produkovaném konstruktu TEAD4-DBD long k jeho zachycení na koloně pomocí Co^{2+} iontů. Jak je patrné z Obr. 22, str. 54 použitím promývacího pufru s 30mM imidazolem byly z kolony uvolněny slabě navázané bakteriální proteiny. Elučním puftrem s 0,2M imidazolem pak byl uvolněn z větší části především TEAD4-DBD long, spolu s ním, ale také některé další bakteriální proteiny, které nejspíš přirozeně obsahují několik histidinů za sebou. V drahách 5 až 11 je pak možné kromě proužku odpovídajícímu relativní molekulové hmotnosti konstruktu TEAD4-DBD long s polyhistidinovou kotvou pozorovat další výrazné proužky, jejichž pozice na gelu odpovídá částečně rozpadlým formám produkovaného proteinu. Z porovnání velikostí těchto proužků je možné usuzovat, že již po eluci z kolony při afinitní chromatografii je větší část produkovaného proteinu rozpadlá.

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, při které byl oddělen TEAD4-DBD long (s již odštěpenou polyhistidinovou kotvou) od zbylých kontaminačních proteinů. Průběh gelové permeační chromatografie sledovaný pomocí absorbance při 280 nm (Obr. 23, str. 55) vykazuje dva vrcholky. První relativně souměrný, s jasným maximem, spadající do frakcí 4 a 5 a druhý rozkládající se přes frakce 6 až 9, který nemá jasně dané maximum. Chromatogram tak naznačuje, že došlo k rozdělení minimálně dvou proteinů o různých velikostech. Z SDS-PAGE gelu jednotlivých frakcí (Obr. 24, str. 56) je zřejmé, že se podařilo oddělit neznámé kontaminační proteiny o relativní molekulové hmotnosti cca 75, 65 a 25 kDa (dráhy 4 a 5). V dalších drahách se kromě očekávaného proužku okolo 15 kDa objevuje i proužek jehož poloha na gelu odpovídá zhruba 34 kDa. Je nepravděpodobné, aby po gelové permeační chromatografii došlo k eluci dvou proteinů s takto rozdílnou velikostí ve stejný čas, obzvláště pokud byl z kolony v dřívějších frakcích eluován protein o velikosti 25 kDa. S přihlédnutím k faktu, že se tento pruh odpovídající zhruba 34 kDa objevuje až ve frakcích, které zároveň obsahují i protein TEAD4-DBD long, jedná se s největší pravděpodobností o určitou formu dimerů, které v jednotlivých frakcích vznikly až po eluci z kolony, či během přípravy vzorků na SDS-PAGE.

Vzorek proteinu získaný po gelové permeační chromatografii byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, která potvrdila přítomnost proteinu TEAD4-DBD long. Zároveň však ukázala značnou míru degradace proteinu, jelikož více než polovinu signálu identifikovaných forem tvořil fragment o relativní molekulové hmotnosti 11 999,38 Da, který postrádá 34 aminokyselin z C-konce. Druhý nejsilnější signál (18 %) náležel formě o hmotnosti 13 130,94 Da – ta postrádá 22 aminokyselin z C-konce. U obou těchto forem jejich zkrácení nezasahovalo do DNA vazebné domény. Třetí nejsilnější signál (15 %) odhalil přítomnost fragmentu velkého pouhých 6 272,08 Da, jenž byl tvořen pouhými 56 aminokyselinami z N-konce proteinu a jeho DNA vazebná doména tak nebyla kompletní. Další identifikované signály náležely dalším fragmentům proteinu TEAD4-DBD long. Signál odpovídající plnodélkovému konstruktu se nepodařilo detekovat vůbec.

Tyto výsledky tak potvrzují nestabilitu proteinu, která byla pozorována již na SDS-PAGE gelech. Tato zkrácení je možné přisuzovat faktu, že degradace probíhá

zejména na C-konci, který je nestrukturovaný a může tak být termodynamicky méně stabilní. Třetí identifikovaný fragment má výrazně nižší hmotnost než předchozí dva – nabízí se tedy znovu otázka, jak je možné, že byl z kolony během gelové permeační chromatografie eluován ve stejný čas. Je možné, že protein je natolik nestabilní, že proces degradace probíhá samovolně i po gelové permeační chromatografii, kdy už je vysoce nepravděpodobné, že by tato degradace mohla být způsobena např. přítomností proteolytických enzymů v roztoku. Na stabilitu proteinu může mít vliv i použití acetonitrilu o vysoké koncentraci při odsolování během přípravy vzorku na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Stabilita C-koncové oblasti proteinu by mohla být zvýšena změnou délky variabilní části v konstruktu. Případným zkrácením by ovšem byla snížena relevantnost experimentů, které by s takovou formou byly prováděny. Prodloužení této sekvence by bylo možné o dalších 50–60 aminokyselin, poté již nastupují beta struktury transaktivační domény.

K ověření schopnosti vázat dsDNA byla využita nativní gelová elektroforéza. Experiment byl proveden s M-CAT motivem pocházejícím z genu *CTGF*. Na gelu barveném pomocí barvy GelRed (Obr. 28, str. 60) je jasně vidět zadržení DNA v kombinaci s proteinem oproti volné DNA. S rostoucí koncentrací DNA se i v drahách s proteinem objevují proužky odpovídající volné DNA, což značí, že protein již nebyl schopen vázat veškerou přítomnou DNA. Toto je možné pozorovat i v dráze 8, kde je koncentrace DNA i TEAD4-DBD long shodně 10 μ M. Jak bylo ale zjištěno pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokou účinností, protein TEAD4-DBD long se během své degradace způsobené nestabilitou rozpadá i na formy, které nemají DNA vazebnou doménu kompletní. Tyto formy pak nejsou schopné vázat DNA, což se projeví saturací vzorku proteinu TEAD4-DBD long již při ekvimolární koncentraci.

6 Závěr

V bakteriálním kmenu buněk *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL byla produkována prodloužená DNA vazebná doména transkripčního faktoru TEAD4.

Protein byl dále purifikován pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie. Získaný protein byl charakterizován pomocí hmotnostní spektrometrie a byly popsány tři nejzastoupenější formy. Ve všech případech byl N-konec (včetně zbytku místa pro štěpení thrombinem) nedotčen a protein byl degradován od C-konce produkovaného konstruktů. První z forem (55 %) obsahovala aminokyseliny 30–131 TEAD4, druhá nejzastoupenější forma (18 %) obsahovala aminokyseliny 30–144 a třetí forma (16 %) obsahovala aminokyseliny 30–81.

U produkovaného proteinu byla ověřena schopnost vázat dvouřetězcovou DNA. Schopnost vazby byla nižší než předpokládaná, což odpovídá degradaci proteinu, která byla zjištěna pomocí hmotnostní spektrometrie, kdy třetí nejzastoupenější forma byla degradována do té míry, že neobsahovala celou DNA vazebnou doménu.

Seznam použité literatury

- [1] Pobbati, A. V., Hong, W.: Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 390–398 (2013).
- [2] Lin, K. C., Park, H. W., Guan, K. L.: Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 862–872 (2017).
- [3] Holden, J. K., Cunningham, C. N.: Targeting the hippo pathway and cancer through the TEAD family of transcription factors. *Cancers* **10**, (2018).
- [4] Zhou, Y., Huang, T., Cheng, A., Yu, J., Kang, W., To, K.: The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 138 (2016).
- [5] Anbanandam, A., Albarado, D. C., Nguyen, C. T., Halder, G., Gao, X., Veeraraghavan, S.: Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17225–17230 (2006).
- [6] Lee, D. S., Vonnrhein, C., Albarado, D., Raman, C. S., Veeraraghavan, S.: A Potential Structural Switch for Regulating DNA-Binding by TEAD Transcription Factors. *J. Mol. Biol.* **428**, 2557–2568 (2016).
- [7] Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., Weirauch, M. T.: The Human Transcription Factors. *Cell* **172**, 650–665 (2018).
- [8] Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., Luscombe, N. M.: A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 252–263 (2009).
- [9] Engelkamp, D., Van Heyningen, V.: Transcription factors in disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 334–342 (1996).
- [10] Crick, F.: Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
- [11] Fushan, A. A., Turanov, A. A., Lee, S. G., Kim, E. B., Lobanov, A. V., Yim, S. H., Buffenstein, R., Lee, S. R., Chang, K. T., Rhee, H., Kim, J. S., Yang, K. S., Gladyshev, V. N.: Gene expression defines natural changes in mammalian lifespan. *Aging Cell* **14**, 352–365 (2015).
- [12] Lee, B. P., Pilling, L. C., Emond, F., Flurkey, K., Harrison, D. E., Yuan, R., Peters, L. L., Kuchel, G. A., Ferrucci, L., Melzer, D., Harries, L. W.: Changes in the expression of splicing factor transcripts and variations in alternative splicing are associated with lifespan in mice and humans. *Aging Cell* **15**, 903–913 (2016).
- [13] Lee, T. I., Young, R. A.: Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell* **152**, 1237–1251 (2013).
- [14] Frietze, S., Farnham, P. J.: Transcription factor effector domains. *Subcell. Biochem.* **52**, 261–277 (2011).
- [15] Jimenez-Sanchez, G., Childs, B., Valle, D.: Human disease genes. *Nature* **409**, 853–855 (2001).

- [16] Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Sobolev, A. S.: Transcription factors: Time to deliver. *J. Control. Release* **269**, 24–35 (2018).
- [17] Johnston, S. J., Carroll, J. S.: Transcription factors and chromatin proteins as therapeutic targets in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1855**, 183–192 (2015).
- [18] Heinrich, C., Spagnoli, F. M., Berninger, B.: In vivo reprogramming for tissue repair. *Nat. Cell Biol.* **17**, 204–211 (2015).
- [19] Takahashi, K., Yamanaka, S.: A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol.* **17**, 183–193 (2016).
- [20] Pan, Y., Tsai, C. J., Ma, B., Nussinov, R.: Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends Genet.* **26**, 75–83 (2010).
- [21] Krivega, I., Dean, A.: Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 79–85 (2012).
- [22] Lenhard, B., Sandelin, A., Carninci, P.: Metazoan promoters: Emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 233–245 (2012).
- [23] Wittkopp, P. J., Kalay, G.: Cis-regulatory elements: Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 59–69 (2012).
- [24] Spitz, F., Furlong, E. E. M.: Transcription factors: From enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 613–626 (2012).
- [25] Hwang, J. J., Chambon, P., Davidson, I.: Characterization of the transcription activation function and the DNA binding domain of transcriptional enhancer factor-1. *EMBO J.* **12**, 2337–2348 (1993).
- [26] Casamassimi, A., Ciccodicola, A.: Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1281–1286 (2019).
- [27] Georges, A. B., Benayoun, B. A., Caburet, S., Veitia, R. A.: Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from? *FASEB J.* **24**, 346–356 (2010).
- [28] Zhang, H., Liu, C. Y., Zha, Z. Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q. Y., Guan, K. L.: TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **284**, 13355–13362 (2009).
- [29] Kaneko, K. J., Cullinan, E. B., Latham, K. E., DePamphilis, M. L.: Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development* **124**, 1963–1973 (1997).
- [30] Kaneko, K. J., Depamphilis, M. L.: Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev. Genet.* **22**, 43–55 (1998).
- [31] UniProt Consortium, T.: UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2699–2699 (2018).

- [32] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
- [33] Chen, Z., Friedrich, G. A., Soriano, P.: Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev.* **8**, 2293–2301 (1994).
- [34] Jacquemin, P., Hwang, J. J., Martial, J. A., Dollé, P., Davidson, I.: A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 21775–21785 (1996).
- [35] Kaneko, K. J., Kohn, M. J., Liu, C., DePamphilis, M. L.: Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis* **45**, 577–587 (2007).
- [36] Milewski, R. C., Chi, N. C., Li, J., Brown, C., Lu, M. M., Epstein, J. A.: Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* **131**, 829–837 (2004).
- [37] Sawada, A., Nishizaki, Y., Sato, H., Yada, Y., Nakayama, R., Yamamoto, S., Nishioka, N., Kondoh, H., Sasaki, H.: Tead proteins activate the Foxa2 enhancer in the node in cooperation with a second factor. *Development* **132**, 4719–4729 (2005).
- [38] Jacquemin, P., Sapin, V., Alsat, E., Evain-Brion, D., Dollé, P., Davidson, I., Evain-Brion, D., Dollé, P., Davidson, I.: Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev. Dyn.* **212**, 423–436 (1998).
- [39] Yagi, R., Kohn, M. J., Karavanova, I., Kaneko, K. J., Vullhorst, D., DePamphilis, M. L., Buonanno, A.: Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* **134**, 3827–3836 (2007).
- [40] Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., Sasaki, H.: Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* **125**, 270–283 (2008).
- [41] Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., Rossant, J.: Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093–2102 (2005).
- [42] Klaffky, E., Williams, R., Yao, C. C., Ziober, B., Kramer, R., Sutherland, A.: Trophectoderm-specific expression and function of the integrin $\alpha 7$ subunit in the peri-implantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **239**, 161–175 (2001).
- [43] Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., Heath, J. K., Lonai, P.: Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5082–5087 (1998).
- [44] Kaneko, K. J., De Pamphilis, M. L.: TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. *Development* **140**, 3680–3690 (2013).

- [45] Johnson, M. T., Mahmood, S., Patel, M. S.: Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J. Biol. Chem* **278**, 31457–31460 (2003).
- [46] Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G., Sturmey, R. G.: Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 667 (2008).
- [47] Finkel, T., Holbrook, N. J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
- [48] Andrianopoulos, A., Timberlake, W. E.: ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *The Plant cell* **3**, 747–748 (1991).
- [49] Shi, Z., He, F., Chen, M., Hua, L., Wang, W., Jiao, S., Zhou, Z.: DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4. *Oncogene* **36**, 4362–4369 (2017).
- [50] Xiao, J. H., Davidson, I., Ferrandon, D., Rosales, R., Vigneron, M., Macchi, M., Ruffenach, F., Chambon, P.: One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind in vitro to overlapping motifs in the domain B1 of the SV40 enhancer. *EMBO J.* **6**, 3005–3013 (1987).
- [51] Yoshida, T.: MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 8–17 (2008).
- [52] Farrance, I. K. G., Mar, J. H., Ordahl, C. P.: M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1. *J. Biol. Chem.* **267**, 17234–17240 (1992).
- [53] Carlini, L. E., Getz, M. J., Strauch, A. R., Kelm, R. J.: Cryptic MCAT enhancer regulation in fibroblasts and smooth muscle cells: Suppression of TEF-1 mediated activation by the single-stranded DNA-binding proteins, Pur α , Pur β , and MSY1. *J. Biol. Chem.* **277**, 8682–8692 (2002).
- [54] Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranasic, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Cheneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W. W., Mathelier, A.: JASPAR 2020: Update of the open-Access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* **48**, D87–D92 (2020).
- [55] Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y., DePamphilis, M. L.: TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* **15**, 1229–1241 (2001).
- [56] Tian, W., Yu, J., Tomchick, D. R., Pan, D., Luo, X.: Structural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7293–7298 (2010).
- [57] Li, Z., Zhao, B., Wang, P., Chen, F., Dong, Z., Yang, H., Guan, K. L., Xu, Y.: Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev.* **24**, 235–240 (2010).

- [58] Chen, L., Chan, S. W., Zhang, X. Q., Walsh, M., Lim, C. J., Hong, W., Song, H.: Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the Hippo pathway. *Genes Dev.* **24**, 290–300 (2010).
- [59] Noland, C. L., Gierke, S., Schnier, P. D., Murray, J., Sandoval, W. N., Sagolla, M., Dey, A., Hannoush, R. N., Fairbrother, W. J., Cunningham, C. N.: Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure* **24**, 179–186 (2016).
- [60] Chan, P., Han, X., Zheng, B., Deran, M., Yu, J., Jarugumilli, G. K., Deng, H., Pan, D., Luo, X., Wu, X.: Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 282–289 (2016).
- [61] Hilman, D., Gat, U.: The evolutionary history of YAP and the Hippo/YAP pathway. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2403–2417 (2011).
- [62] Yagi, R., Chen, L.-F., Shigesada, K., Murakami, Y., Ito, Y.: A WW domain-containing Yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J.* **18**, 2551–2562 (1999).
- [63] Komuro, A., Nagai, M., Navin, N. E., Sudol, M.: WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **278**, 33334–33341 (2003).
- [64] Sudol, M., Shields, D. C., Farooq, A.: Structures of YAP protein domains reveal promising targets for development of new cancer drugs. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 827–833 (2012).
- [65] Varelas, X.: The hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* **141**, 1614–1626 (2014).
- [66] Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J. D., Wang, C. Y., Chinnaiyan, A. M., Lai, Z. C., Guan, K. L.: TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* **22**, 1962–1971 (2008).
- [67] Zhu, C., Li, L., Zhao, B.: The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **47**, 16–28 (2014).
- [68] Kanai, F., Marignani, P. A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R. A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L. C., Yaffe, M. B.: TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* **19**, 6778–6791 (2000).
- [69] Mahoney, W. M., Hong, J. H., Yaffe, M. B., Farrance, I. K. G.: The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem. J.* **388**, 217–225 (2005).
- [70] Plouffe, S. W., Lin, K. C., Moore, J. L., Tan, F. E., Ma, S., Ye, Z., Qiu, Y., Ren, B., Guan, K. L.: The Hippo pathway effector proteins YAP and TAZ have both distinct and overlapping functions in the cell. *J. Biol. Chem.* **293**, 11230–11240 (2018).
- [71] Kim, M. K., Jang, J. W., Bae, S. C.: DNA binding partners of YAP/TAZ. *BMB Rep.* **51**, 126–133 (2018).

- [72] Figeac, N., Mohamed, A. D., Sun, C., Schönfelder, M., Matallanas, D., Garcia-Munoz, A., Missiaglia, E., Collie-Duguid, E., De Mello, V., Pobbati, A. V., Pruller, J., Jaka, O., Harridge, S. D. R., Hong, W., Shipley, J., Vargesson, N., Zammit, P. S., Wackerhage, H.: VGLL3 operates via TEAD1, TEAD3 and TEAD4 to influence myogenesis in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **132**, jcs225946 (2019).
- [73] Huh, H., Kim, D., Jeong, H.-S., Park, H.: Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells* **8**, 600–621 (2019).
- [74] Schütte, U., Bisht, S., Heukamp, L. C., Kebschull, M., Florin, A., Haarmann, J., Hoffmann, P., Bendas, G., Buettner, R., Brossart, P., Feldmann, G.: Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. *Transl. Oncol.* **7**, 309–321 (2014).
- [75] Tsai, C. C., Wu, S. B., Kau, H. C., Wei, Y. H.: Essential role of connective tissue growth factor (CTGF) in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced myofibroblast transdifferentiation from Graves' orbital fibroblasts. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
- [76] Zhang, H., Pasolli, H. A., Fuchs, E.: Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2270–2275 (2011).
- [77] Lipson, K. E., Wong, C., Teng, Y., Spong, S.: CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 1–8 (2012).
- [78] Lai, D., Ho, K. C., Hao, Y., Yang, X.: Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res.* **71**, 2728–2738 (2011).
- [79] Yeung, Y. T., Guerrero-Castilla, A., Cano, M., Muñoz, M. F., Ayala, A., Argüelles, S.: Dysregulation of the Hippo pathway signaling in aging and cancer. *Pharmacol. Res.* **143**, 151–165 (2019).
- [80] Jacobson, A., Cunningham, J. L.: Connective tissue growth factor in tumor pathogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, S8–S14 (2012).
- [81] Shi, J., Huo, R., Li, N., Li, H., Zhai, T., Li, H., Shen, B., Ye, J., Fu, R., Di, W.: CYR61, a potential biomarker of tumor inflammatory response in epithelial ovarian cancer microenvironment of tumor progress. *BMC Cancer* **19**, 1140–1147 (2019).
- [82] Tsai, M. S., Bogart, D. F., Castañeda, J. M., Li, P., Lupu, R.: Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene* **21**, 8178–8185 (2002).
- [83] Xu, M. Z., Chan, S. W., Liu, A. M., Wong, K. F., Fan, S. T., Chen, J., Poon, R. T., Zender, L., Lowe, S. W., Hong, W., Luk, J. M.: AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **30**, 1229–1240 (2011).
- [84] Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F. F., Anders, R. A., Maitra, A., Pan, D.: Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals. *Cell* **130**, 1120–1133 (2007).

- [85] Wang, Z., Wu, Y., Wang, H., Zhang, Y., Mei, L., Fang, X., Zhang, X., Zhang, F., Chen, H., Liu, Y., Jiang, Y., Sun, S., Zheng, Y., Li, N., Huang, L.: Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E89–E98 (2014).
- [86] Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M. A., Goldstein, L. S. B., Abujarour, R., Ding, S., Guan, K. L.: The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* **24**, 1106–1118 (2010).
- [87] Tamm, C., Böwer, N., Annerén, C.: Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J. Cell Sci.* **124**, 1136–1144 (2011).
- [88] Song, S., Ajani, J. A., Honjo, S., Maru, D. M., Chen, Q., Scott, A. W., Heallen, T. R., Xiao, L., Hofstetter, W. L., Weston, B., Lee, J. H., Wadhwa, R., Sudo, K., Stroehlein, J. R., Martin, J. F., Hung, M. C., Johnson, R. L.: Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal Cancer cells with stem-like properties. *Cancer Res.* **74**, 4170–4182 (2014).
- [89] Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J. S., Rossant, J.: Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137**, 395–403 (2010).
- [90] Nishioka, N., Inoue, K. ichi, Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., Sasaki, H.: The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Dev. Cell* **16**, 398–410 (2009).
- [91] Xie, Q., Chen, J., Feng, H., Peng, S., Adams, U., Bai, Y., Huang, L., Li, J., Huang, J., Meng, S., Yuan, Z.: YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence. *Cancer Res.* **73**, 3615–3624 (2013).
- [92] Gao, Y., Zhang, W., Han, X., Li, F., Wang, X., Wang, R., Fang, Z., Tong, X., Yao, S., Li, F., Feng, Y., Sun, Y., Hou, Y., Yang, Z., Guan, K., Chen, H., Zhang, L., Ji, H.: YAP inhibits squamous transdifferentiation of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through ZEB2-dependent DNp63 repression. *Nat. Commun.* **5**, 4629–4643 (2014).
- [93] Zheng, Y., Pan, D.: The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Dev. Cell* **50**, 264–282 (2019).

Příloha 1

Hmotnostní spektrum proteinů z frakce 7 z gelové permeační chromatografie. Vyznačeny jsou majoritní nábojové stavy pro tři nejzastoupenější fragmenty proteinu TEAD4-DBD long. Pro první nejzastoupenější formu (11 999,38 Da) symbolem ● zeleně, pro druhou (13 130,94 Da) symbolem @ černě a pro třetí (6 272,08 Da) symbolem # modře.

