

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra Biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie

**Autoreferát disertační práce**



**Strukturní charakterizace interakce transkripčních faktorů s  
DNA**

Structural characterization of interaction between transcription  
factors and DNA

**Mgr. Růžena Filandrová**

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Praha 2021

## Abstrakt

Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují expresi genů skrze svou interakci s DNA a dalšími faktory. Tím buňce umožňují reagovat na různé vnitřní i vnější podněty a hrají proto důležitou roli v mnoha buněčných dějích jako je například regulace buněčného cyklu, diferenciaci buněk během vývoje organismu nebo imunitní reakce. K pochopení těchto dějů je nezbytná nejen znalost 3D struktury samotných transkripčních faktorů, ale i mechanismů jejich vazby na DNA. Nicméně, některé typické vlastnosti transkripčních faktorů, jako je například přítomnost nestrukturovaných oblastí, způsobují, že je velmi obtížné určovat jejich 3D strukturu klasickými metodami s vysokým rozlišením. Z těchto důvodů mohou být pro popis struktury komplexů transkripčních faktorů s DNA s výhodou využity metody s nižším rozlišením, jako je například strukturní hmotnostní spektrometrie, která byla použita v této práci.

V první části této práce byl nejprve optimalizován soubor metod strukturní hmotnostní spektrometrie se zaměřením hlavně na optimalizaci podmínek vodík/deuteriové výměny (HDX-MS) pro jejich využití k analýze komplexů transkripčních faktorů s DNA. Následně pak byly pomocí těchto metod charakterizovány dva komplexy transkripčních faktorů s jejich DNA vazebnými motivy, čímž byla potvrzena schopnost testovaných metod poskytnout informace nejen o oblastech proteinu nedostupných obvykle používanými metodami ale také o strukturní dynamice celého komplexu.

Ve druhé části disertační práce pak byly metody strukturní hmotnostní spektrometrie společně s dalšími technikami jako je smFRET, nativní gelová elektroforéza nebo fluorescenční anisotropie využity v rámci studie zabývající se vlivem sekvence v okolí M-CAT vazebného motivu a jeho orientace na interakci tohoto motivu s DNA vazebnou doménou transkripčního faktoru TEAD1 (TEAD1-DBD). Bylo zjištěno, že sekvence DNA v okolí vazebného motivu má vliv na jeho afinitu k TEAD1-DBD proteinu, a navíc je tento protein schopen, i když s nižší afinitou, se vázat i na invertovanou verzi svého vazebného M-CAT motivu (5'-CCTTA-3'). Schopnost tohoto transkripčního faktoru tvořit nízkoafinní interakce s jiným vazebným motivem může poukazovat na potenciální další způsob regulace jeho aktivity, a proto byla následně také popsána strukturní podstata této interakce. V závěru práce byla také zkoumána možnost kooperativní vazby transkripčních faktorů FOXO4 a TEAD1 za využití oligonukleotidů obsahujících sousedící DNA vazebné motivy obou proteinů.

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Transkripční faktory

Termín „transkripční faktor“ se běžně používá pro proteiny, které jsou schopné jak vazby na specifickou sekvenci DNA, tak zároveň aktivace, nebo inhibice iniciační, nebo elongační fáze syntézy RNA podle DNA templátu, neboli regulace transkripce<sup>1-3</sup>. Díky těmto vlastnostem umožňují transkripční faktory buňce reagovat na rozmanité stimuly ovlivněním exprese specifických sad genů. Hrají tak klíčovou roli v mnoha biologických procesech, jako jsou například kontrola buněčného cyklu, diferenciaci buněk během vývoje organismu, imunitní odpověď, nebo udržování intracelulární metabolické rovnováhy<sup>4-7</sup>. Mezi transkripční faktory patří rovněž proteiny, které tvoří jádro iniciačního komplexu s RNA Polymerázou II, což je nutný předpoklad pro začátek jakékoli genové exprese<sup>3</sup>.

Do roku 2018 bylo jako transkripční faktor identifikováno celkem 1639 lidských proteinů<sup>2</sup>. Přestože se jejich číslo zdá vysoké, proces, který regulují je tak komplexní, že by jednotlivé transkripční faktory samy o sobě nebyly nikdy dostačující pro jeho regulaci, a také v podstatě nikdy osamoceně nefungují. Transkripční faktory se mohou vázat na DNA ve spolupráci mezi sebou a také společně s mnoha kofaktory, které moduluji jejich vliv na regulaci genové exprese tak, aby byla buňka schopna v přesně daný čas vyprodukovat proteiny, které právě potřebuje<sup>2,8</sup>.

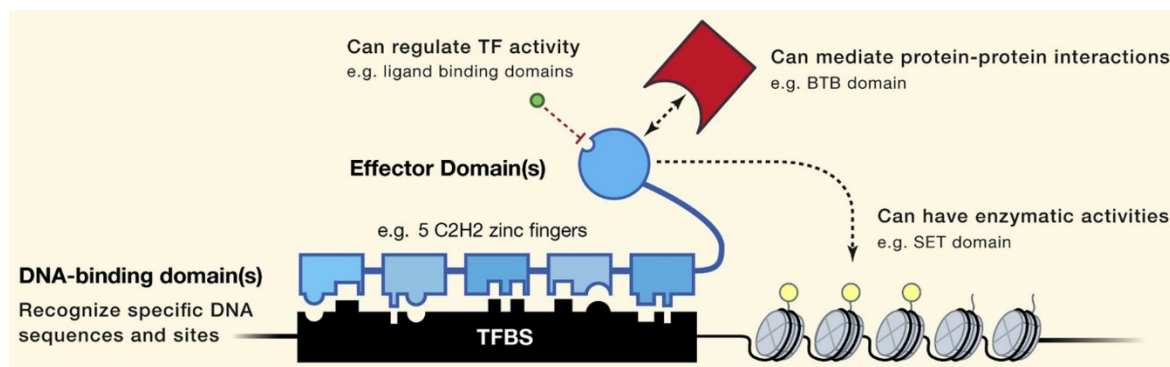
Jelikož je regulace transkripce tak komplikovaný proces, není překvapením, že mutace v genech transkripčních faktorů, v jejich vazebných místech, nebo chyby v jejich regulaci pomocí kofaktorů mohou vést k řadě onemocnění. Transkripční regulátory a obecně proteiny vázající se na nukleové kyseliny jsou například výrazně zastoupeny mezi onkogeny a přibližně třetina lidských vývojových poruch může být připsaná na vrub mutacím v genech kódujících transkripční faktory<sup>2,9,10</sup>.

Přesný způsob, jak síť transkripčních faktorů a jejich kofaktorů funguje a jak jejich interakce ovlivňují jejich vazbu na DNA, nicméně zatím není důkladně prozkoumán. Z toho důvodu je objasnění interakce transkripčních faktorů s DNA, zkoumané v této práci, aktuálně důležitým a často studovaným tématem.

### 1.1.1. Struktura transkripčních faktorů

Pro transkripční faktory je typická modulární struktura, tzn. skládají se z několika

strukturních domén se specializovanými funkcemi. Typický transkripční faktor se skládá z jedné, nebo více DNA vazebných domén (DBD), které mu umožňují vázat se na specifickou sekvenci DNA, a jedné, nebo více efektorových domén, jež mohou buďto několika různými mechanismy zprostředkovávat regulaci transkripce nebo sloužit k regulaci aktivity samotného transkripčního faktoru (Obr. 1)<sup>2</sup>.



**Obrázek 1: Struktura typického transkripčního faktoru.** DNA vazebná doména rozpoznává a váže specifickou DNA sekvenci, zatímco efektorová doména různými mechanismy ovlivňuje transkripci<sup>2</sup>.

DNA vazebná doména slouží převážně k navázání kontaktu se specifickou sekvencí DNA, ale některé domény jsou schopné rovněž interagovat s jinými proteiny a vázat se na DNA jako homo- nebo heteromultimery<sup>11</sup>. Struktura DNA vazebné domény je také parametrem, podle kterého je možné transkripční faktory rozdělit do rodin uplatňujících stejný DNA vazebný mechanismus. Každá rodina transkripčních faktorů má vlastní strukturní motiv, který využívá k vazbě na DNA. Vazba je obvykle zprostředkována kombinací nekovalentních interakcí mezi specifickými (obvykle evolučně konzervovanými) aminokyselinami, často tvořícími  $\alpha$ -helix vmezeřený do velkého žlábků DNA, a bázemi či páteří odpovídajícího DNA vazebného motivu. K vazbě mohou nicméně přispívat i nekovalentní interakce nezávislé na sekvenci proteinu nebo DNA<sup>3</sup>.

Skrze efektorovou doménu je poté aktivována či inhibována transkripce pomocí různých mechanismů, zahrnujících remodelaci chromatinu, rekrutování základních stavebních prvků transkripčního komplexu, nebo uvolnění pozastavené RNA Polymerasy II. Specifické efektorové domény, které interagují s částmi preiniciačního komplexu se nazývají transaktivační domény. Z hlediska trojrozměrné struktury obsahují transaktivační domény často nestrukturované části, které získávají definovanou sekundární strukturu teprve při jejich vazbě s interakčním partnerem (obecným transkripčním faktorem, jiným proteinem,

DNA nebo menším ligandem), který slouží jako předloha pro jejich tvarování. Vzhledem k tomuto mechanismu se mohou nestrukturované regiony skládat několika různými způsoby, v závislosti na typu ligandu nebo na jejich post-translační modifikaci<sup>12,13</sup>. Kromě interakce se základní transkripční mašinérií mohou některé efektorové domény rovněž interagovat skrze specifické interakční rozhraní s enzymy modifikujícími histony a tím umožnit, nebo blokovat přístup k místům iniciace transkripce<sup>14,15</sup>.

### 1.1.2. Nízkoafinní vazebná místa

Za nízkoafinní vazebné místo je obvykle považována sekvence, které váže transkripční faktor až 1000 krát slaběji, než optimální vazebný motiv daného transkripčního faktoru, avšak stále silněji, než náhodná sekvence DNA<sup>16</sup>. Přítomnost nízkoafinních vazebných míst v genomu nebyla dlouho považována za funkčně relevantní, nicméně řada studií v posledních deseti letech prokázala, že mohou hrát velmi důležitou roli při vysvětlení takzvaného „paradoxu specifity transkripčních faktorů“<sup>16–19</sup>. Tento paradox popisuje fakt, že rodiny transkripčních faktorů většinou obsahují paralogy s velmi podobnými DNA vazebnými preferencemi, avšak ty přesto ovlivňují jiné sady genů. Tento jev může být částečně vysvětlen specifickou expresí jednotlivých paralogů v různých buňkách organismu, ale nezdědka jsou rozdílné paralogy exprimovány ve stejných buňkách, přičemž je zachována jejich schopnost odlišit cílové geny<sup>16,17</sup>.

Existuje několik způsobů, kterými se mohou transkripční faktory vázat k nízkoafinním vazebným místům, nebo díky kterým je mohou dokonce preferovat před místy optimálními. Jedním z nich je vazba na DNA v komplexu s interakčním partnerem, která může vyvolat změnu struktury transkripčního faktoru a pozměnit tak jeho vazebnou specifitu směrem k předtím nepreferovaným sekvenčním motivům<sup>17,20</sup>. Kombinace vazebných míst interakčních partnerů může také kompenzovat nízkou vazebnou afinitu jednoho z nich<sup>21</sup>. Dalším způsobem jak upravit afinitu transkripčního faktoru k DNA je epigenetická modifikace DNA, zejména CpG methylace, která může pozměnit vazebnou afinitu i v závislosti na specifickém paralogu<sup>22</sup>. Vlastní tvar DNA ve vazebném místě pak může být také zdrojem rozdílné specifity různých paralogů transkripčních faktorů navzdory tomu, že struktura finálního komplexu je totožná<sup>23</sup>. Posledním faktorem je pak lokální koncentrace transkripčního faktoru. Obsazenost vazebného místa je výsledkem dvou jevů – afinity k vazebnému místu (popsané disociační konstantou protein-DNA komplexu) a lokální

koncentrace transkripčního faktoru<sup>16</sup>. To poskytuje výhodný mechanismus pro regulaci transkripce v závislosti na koncentraci transkripčního faktoru, kdy jsou při nízké koncentraci zaplněny jen vysokoafinní vazebná místa a při zvýšení lokální koncentrace se transkripční faktor váže i do míst nízkoafinních<sup>24,25</sup>.

## 1.2. TEAD rodina transkripčních faktorů

„Transcriptional enhancer associated (nebo „activator“, obě varianty jsou v literatuře zastoupené) domain“ (TEAD) je rodina transkripčních faktorů, která sdílí evolučně konzervovanou DNA vazebnou doménu TEA<sup>26</sup>. U savců se TEAD rodina skládá ze čtyř členů pojmenovaných Tead1 až Tead4<sup>27</sup>. Všichni čtyři členové sdílejí stejnou doménovou strukturu a vykazují vysokou míru homologie, zejména v DNA vazebné doméně a v oblasti YAP vazebné domény<sup>28</sup>. Míra exprese jednotlivých TEAD isoform se nicméně liší v různých tkáních a během různých fází vývoje organismu<sup>29,30</sup>.

Studie sledující vliv inaktivace genů jednotlivých TEAD isoform u myši poskytla určitý vhled do jejich specifických funkcí. Bylo zjištěno, že Tead1 je klíčový regulátor diferenciaci a růstu myokardu a je také důležitý pro zachování normální funkce dospělého srdce<sup>31-33</sup> a že Tead2 je zodpovědný za správný vývoj nervové soustavy<sup>34</sup> a v kooperaci s Tead1 a Tead4 také za vývoj srdce<sup>32,33</sup>. Inaktivace Tead4 pak prokázala jeho aktivitu při diferenciaci primárních myoblastů<sup>35</sup>. Pro Tead3 doposud nebyla žádná inaktivační studie provedena.

Vzhledem k tomu, že deregulace buněčné proliferace, růstu, diferenciaci nebo apoptosy jsou dobře známé vlastnosti nádorových buněk a TEAD proteiny se účastní regulace všech těchto procesů, není překvapením, že TEAD proteiny byly v tomto kontextu důkladně studovány<sup>27,29</sup>. Bylo zjištěno, že TEAD proteiny zvyšují expresi řady genů spojených s proliferací, jako jsou *CYT61* a *CTGF*<sup>36,37</sup>, anti-apoptotických genů jako je *AXL*, *Livin* nebo *Survivin*<sup>38,39</sup>, onkogenů nebo dokonce tumor markerů jako například *MYC* a *Mesothelin*<sup>40,41</sup>, nebo genů kódujících glukosové transportéry GLUT1 a GLUT3, které jsou důležité pro rychle proliferující buňky<sup>42,43</sup>. Zvýšená aktivita TEAD proteinů byla přímo pozorována v několika typech nádorů<sup>44-47</sup> a v některých z nich byla jejich aktivita identifikována jako znak špatné prognózy<sup>27,44</sup>. Vzhledem k tomuto vlivu TEAD proteinů na vznik nádorového bujení není překvapením, že jejich aktivita musí být v organismu striktně regulována, aby nedošlo k nekontrolovanému růstu.

Brzy po prvotním objevení TEAD proteinů byla odhalena neobvyklá vlastnost typická

pro tuto rodinu transkripčních faktorů. Přestože mají TEAD proteiny schopnost vázat se na DNA, nejsou schopné samostatně aktivovat transkripci a mohou tak učinit jen v interakci s jinými proteiny – jejich koaktivátory<sup>48,49</sup>. To představuje užitečný mechanismus, kterým může být aktivita TEAD proteinů regulována v závislosti na různých signálech a podmínkách. YAP (YES-associated protein) a jeho paralog TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) jsou z koaktivátorů TEAD proteinů ty nejvíce prozkoumané<sup>50,51</sup>. Oba tvoří v jádře komplexy se všemi známými TEAD proteiny a jsou hlavními efektory Hippo signální dráhy regulující růst orgánů, buněčnou proliferaci a tumorigenese<sup>37,52</sup>. Kromě Hippo signalizace mohou být TEAD proteiny také regulovány jinými (Hippo nezávislými) koaktivátory, nebo posttranslačními modifikacemi<sup>53–55</sup>.

### 1.2.1. Struktura TEAD proteinů

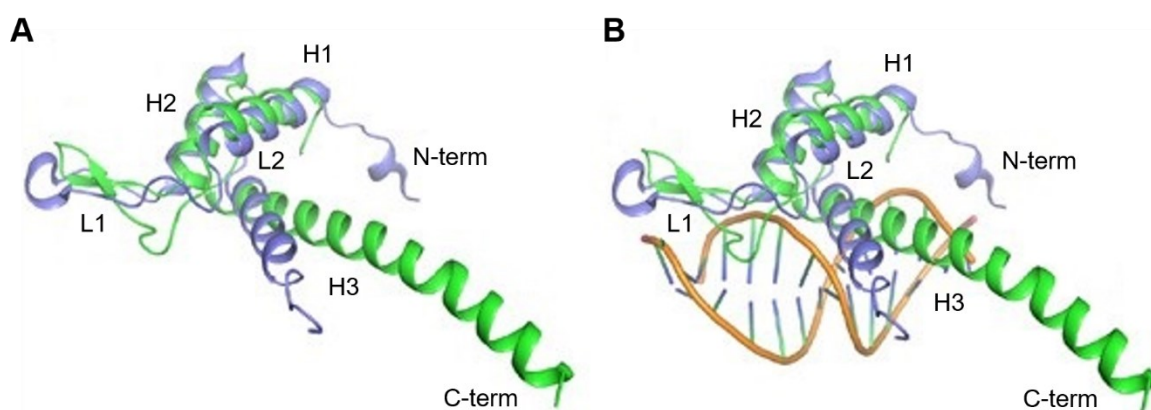
Jak již bylo zmíněno, všechny čtyři savčí TEAD proteiny sdílejí stejnou doménovou architekturu. Skládají se ze dvou hlavních strukturních domén (DNA vazebné a YAP vazebné), které jsou evolučně konzervované, a ze dvou více variabilních nestrukturovaných oblastí. Jeden z variabilních regionů se nachází na N-konci proteinu a je následován DNA vazebnou doménou, které je následně spojena hydrofobním regionem bohatým na prolin s C-terminální transaktivační (YAP/TAZ vazebnou) doménou. Přestože zatím neexistuje přesný model celého proteinu, struktury individuálních domény již byly separátně vyřešeny pro některé členy této rodiny<sup>38,56</sup>.

#### 1.2.1.1. DNA vazebná (TEA) doména

První přesná struktura TEA domény v roztoku bez vazby na DNA byla vyřešena pro lidský TEAD1 za použití NMR. Ukázalo se, že je za těchto podmínek doména globulární protein skládající se ze tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2, and H3) spojených dvěma smyčkami (dlouhou L1 a kratší L2) (Obrázek 2A)<sup>57</sup>. Tato NMR studie rovněž poskytla první údaje o pozici protein-DNA interakčního rozhraní. Helix H3 a smyčka L2, která hned následuje byly identifikovány jako DNA rozpoznávající oblast<sup>57</sup>. Tento fakt byl potvrzen a dále rozšířen dvěma studiemi, které k vyřešení struktury vazebné domény využily rentgenovou strukturní analýzu. První studie za použití TEAD1-DBD bez delší L1 smyčky prokázala zapojení této smyčky do vazby proteinu na DNA<sup>58</sup>. Druhá studie poté vyřešila strukturu celé TEAD4-DBD v komplexu s DNA a potvrdila, že oba dříve identifikované regiony (helix H3 a

smyčka L1) tvoří DNA vazebné rozhraní.

V komplexu TEAD4-DBD s DNA je helix H3 vložený do velkého žlábků DNA, kde je držen specifickými nekovalentními interakcemi (převážně vodíkovými a solnými můstky) mezi aminokyselinami helixu H3 a bázemi vazebného motivu DNA, zatímco smyčka L1 tvoří na sekvenci nezávislý kontakt s malým žlábkem, kde stabilizuje komplex převážně hydrofobní interakcí. Hlavní strukturální rozdíl mezi volnou a vázanou formou TEAD-DBD se nachází na helixu H3, který je v navázané formě protažený a otočený o 30° relativně k helixu H1 a H2 a lépe tak zapadá do velkého žlábků (Obrázek 2B)<sup>59</sup>.



**Obrázek 2:** Překryv struktur TEAD-DBD v apo formě (A) a v komplexu s DNA (B). Porovnání apo formy TEAD1-DBD vyřešené pomocí NMR (modrá) a komplexu (zelená) získaného pomocí krystalografie. Helix H3 a smyčka L1 byly identifikovány jako DNA rozpoznávající oblast. Helix H3 je v navázané formě protažený a otočený o 30°. Upraveno podle<sup>59</sup>.

### 1.3. Metody strukturální charakterizace transkripčních faktorů

Pro strukturální charakterizaci komplexu mezi transkripčním faktorem a jeho DNA vazebným motivem je možné využít řadu biofyzikálních metod. Mezi nejčastěji používané patří rentgenová strukturální analýza, nukleární magnetická rezonance (NMR) a nejnověji kryoelektronová mikroskopie (cryo-EM). Přestože zjevná výhoda těchto technik je velmi vysoké prostorové rozlišení na úrovni atomů, všechny mají určité limitace, které omezují jejich využití. Tato omezení mohou být částečně překonána kombinováním těchto metod, nebo využitím strukturálních metod s nižším rozlišením, jako jsou SAXS (small-angle X-ray scattering), FRET (fluorescence resonance energy transfer) nebo metody strukturální hmotnostní spektrometrie, které jsou využity v této práci<sup>60</sup>.



## 2. Cíle disertační práce

Cílem této práce bylo přispět k vývoji souboru metod pro studium struktury komplexů transkripčních faktorů s jejich DNA vazebnými motivy založených na hmotnostní spektrometrii a dále pak využít tyto metody ke strukturní charakterizaci interakce mezi DNA vazebnými doménami proteinů FOXO4 a TEAD1 s jejich DNA vazebnými motivy.

Mezi konkrétní cíle potom patřilo:

- Připravit a charakterizovat soubor proteas kompatibilních s podmínkami HDX-MS analýzy, aby mohly být následně využity pro zlepšení sekvenčního pokrytí dvou složitějších proteinových systémů, a to konkrétně integrálních membránových proteinů a protein-DNA komplexů
- Ověřit možnost využití nativní hmotnostní spektrometrie pro rychlé testování vzniku komplexů transkripčních faktorů s DNA a jejich rozřídění dle vazebné afinity
- Zjistit jestli, a případně jak, ovlivňuje sekvence DNA v okolí M-CAT vazebného motivu jeho interakci s DNA vazebnou doménou proteinu TEAD1 (TEAD1-DBD)
- Vysvětlit, proč mají M-CAT motiv a jeho invertovaná varianta rozdílnou afinitu k TEAD1-DBD proteinu

### 3. Výsledky a Diskuse

Cílem první části této práce bylo optimalizovat sadu strukturně analytických metod založených na hmotnostní spektrometrii pro jejich využití ke strukturní charakterizaci komplexů transkripčních faktorů s DNA a následně je otestovat na modelovém systému skládajícím se z FOXO4 transkripčního faktoru a jeho DNA vazebného motivu. Druhá, a hlavní, část práce potom byla zaměřena na studium interakce transkripčního faktoru TEAD1 s jeho DNA vazebným motivem M-CAT pomocí nejen metod optimalizovaných v první části, ale také technik jako je smFRET nebo fluorescenční anisotropie.

#### 3.1. Zlepšení sekvenčního pokrytí a rozlišení v HDX-MS analýze

Pro dosažení dobrého prostorového rozlišení v HDX-MS analýze je proteolytické štěpení klíčovým faktorem, který je potřeba optimalizovat. Jelikož k tomuto účelu obvykle využívaná proteasa, pepsin, nemusí vždy poskytnout ideální soubor peptidů pro dosažení co nejlepšího prostorového rozlišení, jsou v současné době vyvíjeny alternativní proteasy, které mohou být použity místo něj nebo spolu s ním<sup>61</sup>. Z těchto důvodů byla v této práci jako první krok připravena sada alternativních proteas schopných fungovat za podmínek HDX-MS analýzy. Tyto proteasy byly buďto rekombinantně produkovány (Nepenthesin I, II a Rhizopuspepsin) nebo koupeny od výrobce (Aspergillopepsin – proteasa typu XIII) a následně imobilizovány na nosič POROS-20 AL. Takto připravené kolony s imobilizovanými proteasami byly následně využity pro zlepšení sekvenčního pokrytí a tím i prostorového rozlišení v HDX-MS analýzách integrálních membránových proteinů a transkripčních faktorů. Výsledky těchto experimentů jsou zahrnuty v Publikacích I (membránové proteiny), II a III (transkripční faktory).

##### 3.1.1. Publikace I

V této publikaci byly porovnávány výsledky štěpení čtyř integrálních membránových proteinů (Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru, leucinového transporteru, dopaminového transporteru, a serotoninového transporteru) pomocí prasečího pepsinu a tří alternativních aspartátových proteas a to jak v roztoku, tak imobilizovaných na koloně, za podmínek HDX-MS analýzy.

Využití imobilizovaných proteas vedlo téměř u každé kombinace protein-proteasa ke zvýšení sekvenčního pokrytí oproti štěpení proteasou v roztoku. Tento efekt byl pravděpodobně způsoben zvýšením teploty a tlaku při štěpení na koloně, které následně

vedlo k destabilizaci micel detergentu a tím i k odhalení jinak proteasám nepřístupných oblastí proteinu přičemž lokální zvýšení poměru množství proteasy ku proteinu mohlo také hrát svou roli<sup>62</sup>. Při štěpení v roztoku pouze Nepenthesin II poskytl sekvenční pokrytí alespoň přibližně podobné tomu, jež bylo získáno při štěpení imobilizovanými proteasami.

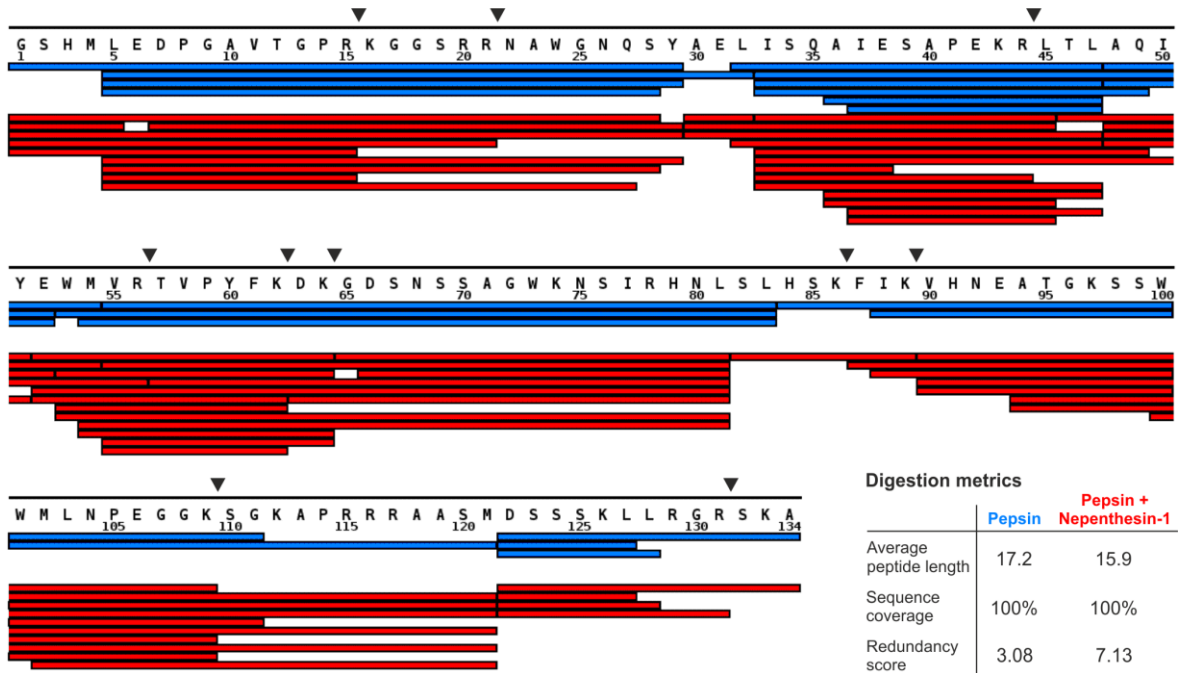
Co se týče výběru nejlepší proteasy pro štěpení membránových proteinů za podmínek HDX-MS se ukázalo, že tato volba je silně závislá na daném proteinu. Nejvyšší sekvenční pokrytí bylo dosaženo při použití buďto imobilizovaného pepsinu (pro Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter a leucinový transporter) nebo imobilizovaného Rhizopuspepsinu (v případě dopaminového transporteru, a serotoninového transporteru). Množství identifikovaných peptidů se také výrazně lišilo. Tento jev je velmi zajímavý hlavně z toho důvodu, že leucinový, dopaminový a serotoninový transporter patří mezi strukturně příbuzné proteiny, které sdílí podobné trojrozměrné uspořádání a hydrofobní vlastnosti transmembránových helixů. Výsledky této studie tedy vedly ke zjištění, že otestování sady dostupných proteas, ideálně imobilizovaných, pokud je to možné, je výhodné i v případě strukturně velmi si podobných integrálních membránových proteinů.

### 3.1.2. Publikace II

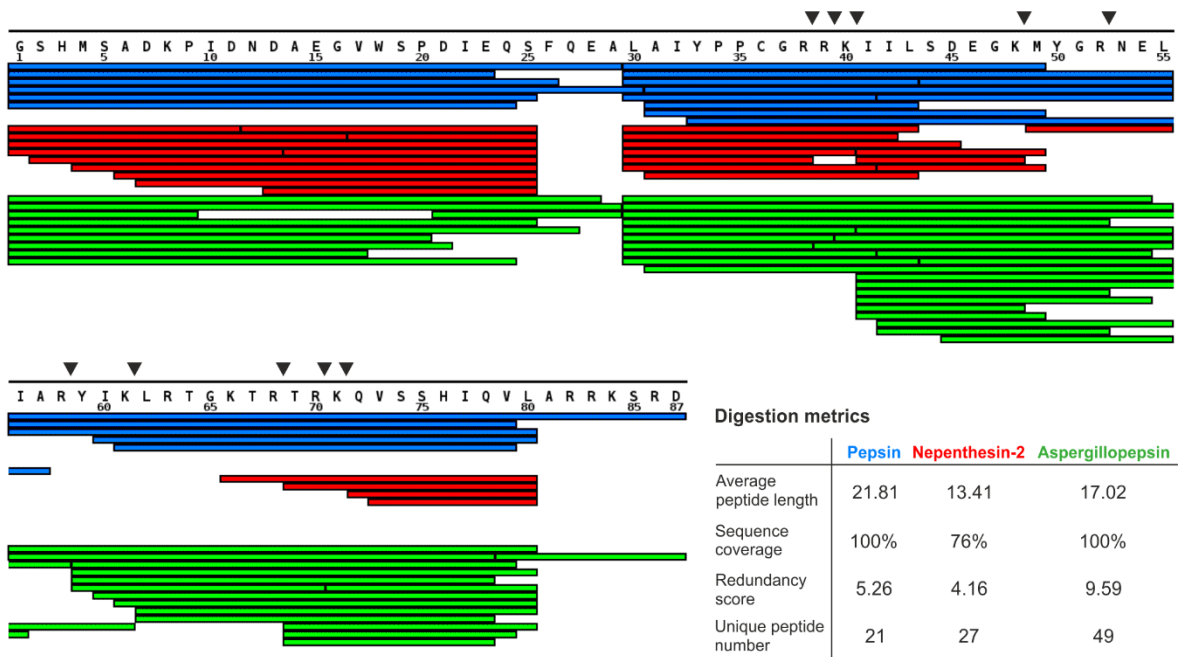
V této publikaci byl představen optimalizovaný protokol pro provádění HDX-MS experimentů na komplexech transkripčních faktorů s DNA. Podobně jako u membránových proteinů, i v tomto případě bylo zjištěno, že protein-DNA komplexy se mohou chovat překvapivě rozdílně, a to i v případě, že jak protein, tak i DNA mají podobnou velikost. Protokol byl optimalizován na dvou systémech, z nichž FOXO4-DBD/DAF16 je příkladem komplexu, kde krátká dsDNA (13 pb) výrazně neovlivnila vznik a záchyt peptidů, a proto pro dosažení dobrého prostorového rozlišení stačilo optimalizovat podmínky štěpení proteasami. Na druhou stranu 15 páru bází dlouhá dsDNA, která byla použita u TEAD1-DBD/M-CAT komplexu výrazně ovlivnila množství identifikovaných peptidů a proto bylo kromě podmínek štěpení potřeba optimalizovat také podmínky zastavení H/D výměny a chromatografické analýzy.

Co se týče optimalizace štěpení proteasami, byly všechny kolony s imobilizovanými proteasami testovány buďto samostatně, nebo ve dvojicích v sériovém zapojení. Obrázek 3 zobrazuje porovnání map sekvenčního pokrytí nejlepších nalezených podmínek se štěpením pomocí standardně využívaného pepsinu. Přestože pomocí pepsinu bylo dosaženo plného

A



B



**Obrázek 3: Mapy sekvenčního pokrytí dvou studovaných transkripčních faktorů.** (A) FOXO4-DBD u kterého bylo nejprve použité štěpení pepsinem (modrá) po optimalizaci nahrazeno štěpením pomocí kombinace proteas pepsinu a nepenthesinu I (červená). (B) TEAD1-DBD. V tomto případě bylo při štěpení pepsinem (modrá) sice dosaženo plného sekvenčního pokrytí, ale prostorové rozlišení nebylo vlivem vyšší průměrné délky peptidů moc dobré. Využití nepenthesinu II (červená) vedlo k přílišnému rozštěpení, což indikují mezery v sekvenčním pokrytí společně se vznikem krátkých peptidů. Zeleně jsou pak vyznačeny konečné podmínky štěpení, kdy byla využita proteasa aspergillopepsin (proteasa typu XIII) společně s přidáním 2M močoviny do pufru využívaného k zastavení H/D reakce za účelem zabránění precipitaci. Šipky nad sekvencí označují štěpná místa za bazickými aminokyselinami, která vznikla díky využití alternativních proteas.

sekvenčního pokrytí u obou testovaných systémů, množství identifikovaných peptidů a jejich redundance se výrazně zvýšily při použití alternativních proteas. Výhoda alternativních proteas při štěpení transkripčních faktorů (které jsou bohaté na bazické aminokyseliny) spočívá hlavně v jejich schopnosti štěpit za aminokyselinami lysinem a argininem, což umožňuje vznik dalších peptidů a nakonec vede ke zlepšení prostorového rozlišení. Nicméně, výběr nejvhodnější proteasy z těch, které jsou schopny štěpit za bazickými aminokyselinami se opět ukázal být vysoce závislým na daném proteinu.

### 3.1.3. Strukturní charakterizace modelového systému FOXO4-DBD/DAF16 (Publikace III)

Optimalizovaný protokol pro provádění HDX-MS analýz komplexů transkripčních faktorů s DNA byl společně s chemickým sítěním a homologním modelováním použit ke strukturní charakterizaci modelového komplexu sestávajícího se z DNA vazebné domény lidského transkripčního faktoru FOXO4 (FOXO4-DBD) a jeho vazebného motivu „Daf-16 family member-binding element“ (DAF16). Získaný model 3D struktury tohoto proteinu byl následně porovnán s dostupnými strukturami vyřešenými pomocí standardních metod o vysokém rozlišení.

Pomocí HDX-MS analýzy byly nalezeny dva hlavní regiony FOXO4-DBD, jejichž deuterace byla ovlivněna vazbou na DNA. Zajímavé je, že první z nich podle dostupné krystalografické struktury neměl být v přímém kontaktu s DNA<sup>63</sup>. Snížení deuterace tohoto regionu tedy nemohlo být způsobeno jednoduše protekcí přítomnou DNA, ale spíše změnami konformace tohoto regionu nepřímými vyvolanými vazbou DNA na jinou část proteinu. Na druhou stranu, druhým z regionů, ve kterém byl v přítomnosti DNA pozorován pokles deuterace, byl helix H3, který se v krystalografické struktuře nacházel přímo uvnitř velkého žlábků dvoušroubovice DNA<sup>63</sup>, což činí sterickou protekcí způsobenou DNA nejpravděpodobnějším vysvětlením pozorovaného zpomalení H/D výměny v této oblasti. Přítomnost těchto dvou efektů byla dále potvrzena pomocí chemického sítění proteinu k DNA za využití transplatiny a kvantitativního chemického sítění proteinu.

Získané 3D strukturní modely velmi dobře odpovídaly těm, jež byly dříve vyřešeny pomocí NMR nebo rentgenové strukturní analýzy<sup>63,64</sup>, což potvrzuje, že je možné informace získané kombinací metod založených na strukturní hmotnostní spektrometrii využít k sestavení modelu a tím charakterizovat i strukturu oblastí proteinu, které by jinak byly pro

standardně využívané metody nedostupné. Konformační změny pozorované v oblastech, které nejsou v přímém kontaktu s DNA mohou pak tvořit základ pro adaptivní mechanismus vazby, při kterém tyto změny konformace mohou být nezbytné pro umožnění specifické vazby dalších ligandů.

### 3.2. Strukturní charakterizace mechanismu rozpoznávání genomové DNA transkripčním faktorem TEAD1

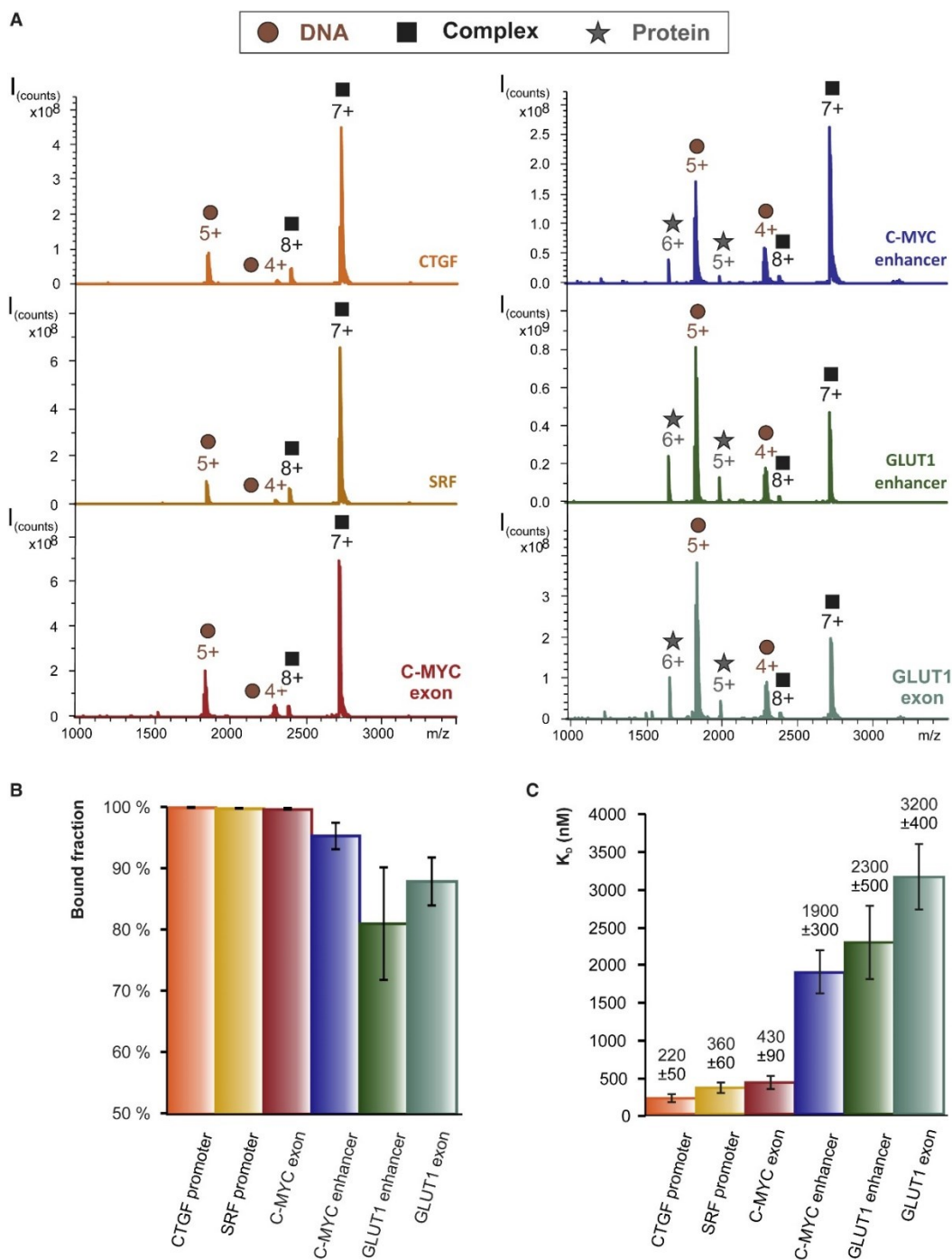
Všechny lidské transkripční faktory patřící do TEAD rodiny rozpoznávají stejný DNA vazebný motiv, jehož základem je sekvence 5'-ATTCC-3' a který bývá obvykle v literatuře nazýván „M-CAT“. Nicméně, po prohledání JASPAR databáze bylo zjištěno, že sekvence DNA v okolí jádra tohoto motivu se může lišit v závislosti na tom, o kterého člena TEAD rodiny jde<sup>65</sup>. Kromě toho jsme si také povšimli faktu, že regulační oblasti lidských genů, které byly identifikovány jakožto regulované TEAD proteiny, jsou bohaté nejen na M-CAT motivy, ale obsahují také větší množství invertované verze těchto motivů (5'-CCTTA-3').

#### 3.2.1. Publikace IV

Cílem této studie bylo zjistit jestli, a případně také jakým způsobem, ovlivňuje sekvence v okolí jádra M-CAT motivu jeho vazebné vlastnosti při interakci s TEAD1-DBD a zároveň také prozkoumat možnost vazby tohoto transkripčního faktoru na invertovaný 5'-CCTTA-3' vazebný motiv.

Byla připravena série dvouvlákněných DNA konstruktů, ve kterých byl buďto klasický M-CAT (5'-ATTCC-3') nebo jeho invertovaná verze (5'-CCTTA-3') zasazen do různých sekvenčních kontextů (dále jen M-CAT motivy). Vazebné vlastnosti komplexů těchto konstruktů s TEAD1-DBD byly pak porovnány pomocí nativní hmotnostní spektrometrie (nESI-MS) a fluorescenční anisotropie (Obrázek 4). Přítomnost komplexu byla potvrzena pro všechny testované M-CAT motivy, a to včetně invertovaných. Nicméně se ukázalo, že vazebná afinita dsDNA konstruktů k TEAD1-DBD silně závisí na orientaci M-CAT motivu (invertovaný M-CAT měl 10× nižší  $K_D$ , než ten klasický). Nižší, ale přesto stále signifikantní, vliv na vzájemnou afinitu obou součástí komplexu pak měla sekvence v okolí jádra vazebného motivu.

V dalším kroku pak byla použita kombinace kvantitativního chemického sítění s MS detekcí a HDX-MS k odhalení prostorového uspořádání jak volného TEAD1-DBD, tak i

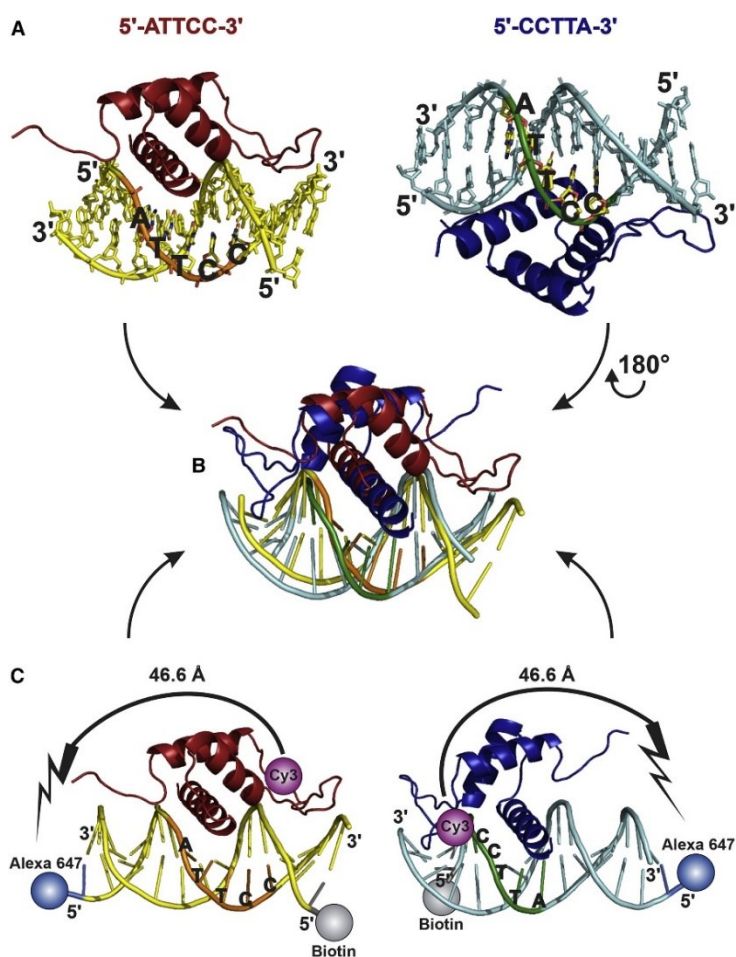


**Obrázek 4:** (A) Nativní ESI-MS spektra komplexů TEAD1-DBD s každým testovaným M-CAT motivem z nichž byly vyvozeny poměry volných a vázaných složek komplexu. Zvýrazněny jsou nejintenzivnější nábojové stavy volného proteinu (šedé hvězdy), volné DNA (hnědá kolečka) a komplexu (černé čtverce). (B) Procentuální podíl vázaného proteinu odvozený od intenzit signálů v nESI-MS spektru. (C) Porovnání disociačních konstant ( $K_D$ ) komplexů TEAD1-DBD se všemi testovanými M-CAT motivy určených pomocí fluorescenční anisotropie. Komplexy s konstrukty DNA obsahujícími klasický M-CAT motiv (SRF promotor, CTGF promotor a C-MYC exon) měly přibližně 10× nižší  $K_D$  než s těmi obsahujícími motiv invertovaný.

v komplexu s různě orientovanými M-CAT motivy a k nalezení interakčního rozhraní mezi analyzovaným proteinem a DNA. Podobně jako v případě FOXO4-DBD/DAF16 komplexu,

i zde byly vazbou na DNA ovlivněn nejen helix H3 a smyčka L1, které byly v předchozích studiích identifikovány jako interakční rozhraní, ale i další oblasti, které nebyly v přímém kontaktu s DNA<sup>57,59</sup>. I tentokrát byl tento efekt nejspíš způsoben ztrátou flexibility a následnou stabilizací struktury těchto oblastí v méně dynamické konformaci v reakci na vazbu DNA na jinou část TEAD1-DBD, což je také v souladu s podobným efektem, který už byl dříve pozorován u C-koncového helixu TEAD1-DBD<sup>59</sup>. Nicméně, ani výsledky kvantitativního chemického sítění ani HDX-MS neodhalily žádné rozdíly mezi dvěma testovanými orientacemi M-CAT motivu kromě těch, které mohly být přičteny na vrub rozdílným disociačním konstantám, jelikož ve všech případech byly vazbou DNA ovlivněny stejné oblasti proteinu a jediné, co se lišilo, byla intenzita daného efektu.

Přestože žádná z doposud využitých metod neodhalila žádný výrazný rozdíl mezi mechanismy vazby TEAD1-DBD na různě otočené M-CAT motivy, zbývala stále možnost, že se TEAD1-DBD může vázat na invertovaný M-CAT motiv za využití stejného interakčního rozhraní, ale v orientaci celého proteinu otočené o 180°. K ověření této hypotézy bylo použito molekulové dokování. Na obrázku 5 jsou pak zobrazeny struktury dvou komplexů, které vykazovaly nejstabilnější interakci a odpovídaly komplexu TEAD1-DBD s M-CAT motivem označeným jako C-MYC exon, jenž obsahoval klasický M-CAT následovaným komplexem, kde



**Obrázek 5:** (A) TEAD1-DBD/M-CAT modely použité při simulacích molekulové dynamiky ukazující relativní orientaci dvou dsDNA molekulů v nejstabilnější interakci s TEAD1-DBD. (B) Strukturální superpozice těchto dvou konstruktů (C) smFRET studie. Protein i DNA byly označeny fluorofory (donorem a akceptorem) jejichž vzdálenost a tím i efektivita FRET přenosu závisela na vzájemné orientaci interakčních partnerů.



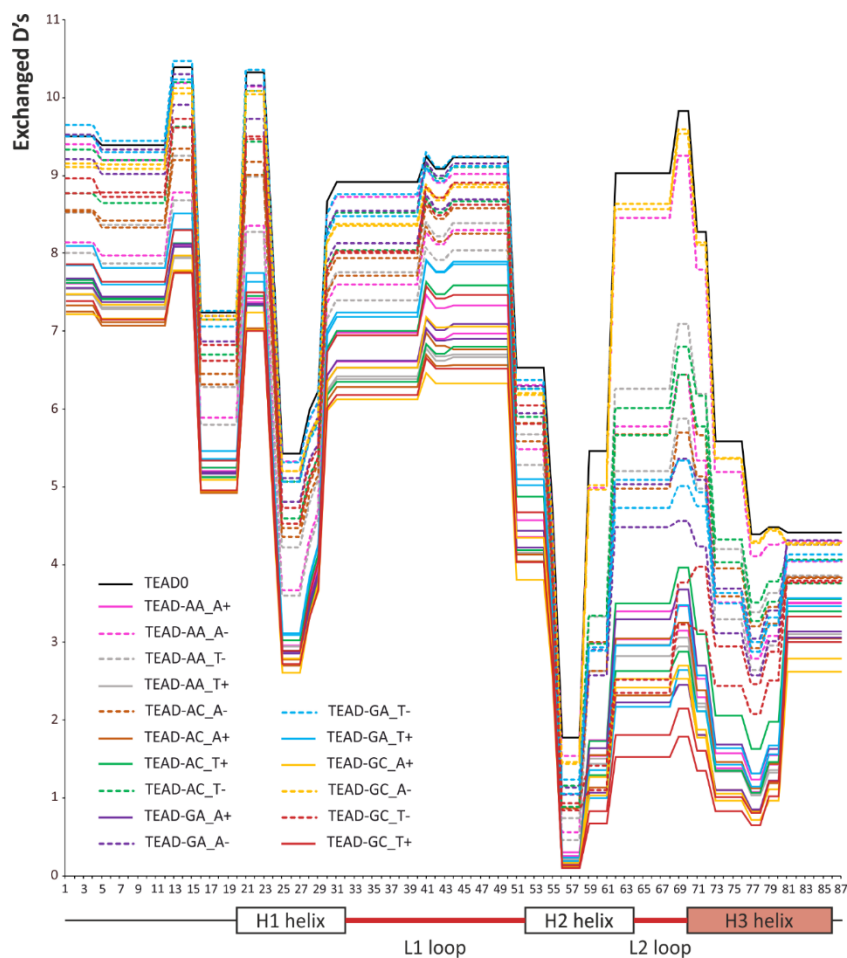
byl M-CAT motiv modelován do komplementárního vlákna DNA, což je zároveň ekvivalentem pro otočení proteinu o 180° (Obrázek 5B). Provedené počítačové simulace rovněž odhalily, že tvar velkého žlábků DNA je velmi podobný u obou orientací M-CAT motivu, což umožňuje vazbu proteinu mechanismem, při kterém je nejprve rozpoznán tvar velkého žlábků a následně je vzniklý komplex stabilizován specifickými interakcemi mezi aminokyselinami a bázemi, jejichž počet a síla závisí na orientaci motivu. Výsledky molekulového dokování společně s celou hypotézou vazby v orientaci otočené o 180° byly následně experimentálně potvrzeny provedením série smFRET experimentů (Obrázek 5C).

Na závěr byla také prokázána schopnost TEAD1 proteinu vázat se na nízkoafinní invertovaný M-CAT motiv *in vivo* pomocí ChIP-qPCR studie. Přítomnost vazebných motivů s různou afinitou k TEAD1 proteinu může být základem pro další mechanismus regulace aktivity těchto transkripčních faktorů závislý na koncentraci daného faktoru v blízkosti regulační oblasti DNA, který už byl popsán u několika jiných transkripčních faktorů<sup>24,66</sup>.

### 3.2.2. Vliv sekvence v okolí jádra vazebného motivu

V rámci **Publikace IV** bylo zjištěno, že sekvence v okolí jádra vazebného M-CAT motivu má vliv na afinitu daného dsDNA konstruktů k TEAD1-DBD proteinu. Za účelem bližšího prozkoumání tohoto efektu byla připravena další série dsDNA konstruktů, jež všechny obsahovaly centrální ATTCC vazebný motiv ať už v klasické 5'-3' nebo v invertované 3'-5' orientaci a zároveň se lišily ve dvou bázích předcházejících M-CAT motivu (na jeho 5' konci) a v jedné bázi za tímto motivem (na jeho 3' konci).

Po úvodním potvrzení tvorby všech komplexů a jejich rozřídění podle vazebné afinity, k němuž byla využita nativní hmotnostní spektrometrie, bylo pomocí HDX-MS dále zkoumáno interakční rozhraní všech testovaných dsDNA konstruktů s TEAD1-DBD. Z výsledků (Obrázek 6) je patrné, že podobně jako u šesti M-CAT motivů, které byly zkoumány v **Publikaci IV** byly největší rozdíly v deuteraci mezi jednotlivými komplexy a volným proteinem bez DNA pozorovány v oblastech helixu H3 a jemu předcházející smyčky L2, z čehož je možné usuzovat, že všechny testované dsDNA konstrukty se vážou na



**Obrázek 6: Porovnání výsledků HDX-MS** zobrazené jakožto množství vyměněných atomů deuteria v závislosti na pozici v sekvenci proteinu pro komplexy TEAD1-DBD se sérií dsDNA konstruktů lišících se v sekvenci v okolí vazebného motivu (označené v popiscích jako XX<sub>X</sub>, kde podtržítka označuje pozici jádra vazebného motivu). Oblasti proteinu, jež byly dříve identifikovány jakožto zodpovědné za vazbu DNA jsou ve schématu struktury TEAD1-DBD pod obrázkem označeny červeně. Tečkované čáry patří invertovaným motivům, které jsou v popiscích navíc označeny znaménkem minus. Motivy se silnější vazbou vyměňují méně deuterií a proto jsou umístěny ve spodní oblasti grafu zatímco ty slabě se vázající vykazují podobný vzor jako vzorek, kde DNA nebyla přítomna vůbec (TEAD0 – černá čára).

v JASPAR databázi, což by mohlo znamenat, že vyšší afinita některých vazebných míst může kompenzovat jejich nižší výskyt v lidském genomu<sup>65</sup>.

V současnosti jsou ještě doměřovány přesné disociační konstanty každého z analyzovaných komplexů a je připravována další publikace zabývající se právě vlivem sekvence v okolí jádra vazebného M-CAT motivu na jeho interakci s TEAD1-DBD.

TEAD1-DBD do stejné oblasti. Fakt, že míra protekce proti deuteraci byla silně závislá na vazebné afinitě daného dsDNA konstruktů k TEAD1-DBD pak umožnil identifikaci motivů, které vážou TEAD1-DBD nejsilněji (5'-GCATTCC(T/A)-3') stejně jako toho motivu, který váže analyzovaný protein nejslaběji (3'-GCATTCCA-5').

Zajímavostí potom je, že sekvence, jež byla identifikována jakožto ta s nejvyšší afinitou k TEAD1-DBD, se lišila od nejobvyklejší sekvence vazebného motivu TEAD proteinů uvedené

## 4. Shrnutí

Cílem této práce bylo přispět k vývoji sady strukturních hmotnostně spektrometrických metod pro charakterizaci komplexů transkripčních faktorů s jejich vazebnými motivy a následně tyto metody využít pro strukturní charakterizaci interakce mezi DNA vazebnými doménami proteinů FOXO4 a TEAD1 a jejich DNA vazebnými motivy. Získány byly následující výsledky, které byly zahrnuty do čtyř publikací:

- Byla připravena sada alternativních HDX-MS kompatibilních proteas potřebných ke zlepšení sekvenčního pokrytí a zvýšení rozlišení HDX-MS metody a jejich použitelnost byla otestována na dvou proteinových systémech
- Výběr nejvýhodnější proteasy pro štěpení v HDX-MS je velmi závislý na studovaném proteinu a liší se i pro proteiny s podobnou terciální strukturou
- Přídavek močoviny jako denaturantu do pufru pro zastavení deuteracní výměny, použití promývacích kroků mezi analýzou jednotlivých vzorků a zvolení nejvhodnější alternativní proteasy je důležité pro získání co nejvyššího sekvenčního pokrytí při HDX-MS analýze transkripčních faktorů v komplexu s DNA
- Výsledky získané kombinací metod strukturní hmotnostní spektrometrie mohou tvořit dostatečné podklady pro strukturní modelování a poskytnout tak informace jak o regionech nedostupných pro obvykle používané metody s vysokým rozlišením, tak o strukturní dynamice komplexů transkripčních faktorů s DNA
- Významná ztráta flexibility po vazbě na DNA byla pozorována pro oba analyzované komplexy – FOXO4/DAF16 i TEAD1/M-CAT
- TEAD1-DBD je schopný vazby na invertovaný nízkoafinní M-CAT motif 5'-CCTTA-3' jak *in vitro*, tak *in vivo*
- TEAD1-DBD se váže na invertovaný motiv v opačné orientaci – otočený o 180°
- Nativní hmotnostní spektrometrie s nESI ionizací se ukázala být vhodnou úspornou metodou k rychlému potvrzení tvorby komplexu transkripčního faktoru s DNA, stejně jako k rozřídění DNA konstruktů dle jejich afinity k proteinu
- Sekvence DNA v oblastech sousedících s M-CAT motivem ovlivňuje sílu vazby k TEAD1-DBD, přičemž sekvence 5'-GCATTCC(T/A)-3' vykazovala vazbu nejsilnější
- TEAD1-DBD a FOXO4-DBD jsou schopné společné vazby na jeden oligonukleotid obsahující oba jejich vazebné motivy.

## Použitá literatura:

1. Fulton, D. L., Sundararajan, S., Badis, G., Hughes, T. R., Wasserman, W. W., Roach, J. C. & Sladek, R. TFCat: the curated catalog of mouse and human transcription factors. *Genome Biol.* **10**, R29 (2009).
2. 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).
3. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. & Scott, M. P. *Molecular Cell Biology*. (W.H. Freeman and Company, 2013).
4. 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**, 252–63 (2009).
5. Accili, D. & Arden, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**, 421–426 (2004).
6. De Pooter, R. F. & Kee, B. L. E proteins and the regulation of early lymphocyte development. *Immunol. Rev.* **238**, 93–109 (2010).
7. Lania, L., Majello, B. & Napolitano, G. Transcriptional control by cell-cycle regulators: A review. *J. Cell. Physiol.* **179**, 134–141 (1999).
8. Reiter, F., Wienerroither, S. & Stark, A. Combinatorial function of transcription factors and cofactors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**, 73–81 (2017).
9. Boyadjiev, S. & Jabs, E. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) as a knowledgebase for human developmental disorders. *Clin. Genet.* **57**, 253–266 (2000).
10. Furney, S. J., Higgins, D. G., Ouzounis, C. A. & López-Bigas, N. Structural and functional properties of genes involved in human cancer. *BMC Genomics* **7**, 1–11 (2006).
11. Eguchi, A., Lee, G. O., Wan, F., Erwin, G. S. & Ansari, A. Z. Controlling gene networks and cell fate with precision-targeted DNA-binding proteins and small-molecule-based genome readers. *Biochem. J.* **462**, 397–413 (2014).
12. Garza, A. S., Ahmad, N. & Kumar, R. Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation. *Life Sci.* **84**, 189–193 (2009).
13. Minezaki, Y., Homma, K., Kinjo, A. R. & Nishikawa, K. Human transcription factors contain a high fraction of intrinsically disordered regions essential for transcriptional regulation. *J. Mol. Biol.* **359**, 1137–49 (2006).
14. Fry, C. J., Pearson, A., Malinowski, E., Bartley, S. M., Greenblatt, J. & Farnham, P. J. Activation of the murine dihydrofolate reductase promoter by E2F1: A requirement for CBP recruitment. *J. Biol. Chem.* **274**, 15883–15891 (1999).
15. Fietze, S. & Farnham, P. J. Transcription factor effector domains. *Subcell. Biochem.* **52**, 261–77 (2011).
16. Kribelbauer, J. F., Rastogi, C., Bussemaker, H. J. & Mann, R. S. Low-Affinity Binding Sites and the Transcription Factor Specificity Paradox in Eukaryotes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 357–379 (2019).
17. Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., Zhou, T., Rohs, R., Honig, B., Bussemaker, H. J. & Mann, R. S. Cofactor Binding Evokes Latent Differences in DNA Binding Specificity between Hox Proteins. *Cell* **147**, 1270–1282 (2011).
18. Ramos, A. I. & Barolo, S. Low-affinity transcription factor binding sites shape morphogen

- responses and enhancer evolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, (2013).
19. Wang, J., Malecka, A., Trøen, G. & Delabie, J. Comprehensive genome-wide transcription factor analysis reveals that a combination of high affinity and low affinity DNA binding is needed for human gene regulation. *BMC Genomics* **16 Suppl 7**, S12 (2015).
  20. Nagy, G. & Nagy, L. Motif grammar: The basis of the language of gene expression. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 2026–2032 (2020).
  21. Farley, E. K., Olson, K. M., Zhang, W., Rokhsar, D. S. & Levine, M. S. Syntax compensates for poor binding sites to encode tissue specificity of developmental enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 6508–6513 (2016).
  22. Kribelbauer, J. F., Laptenko, O., Chen, S., Martini, G. D., Freed-Pastor, W. A., Prives, C., Mann, R. S. & Bussemaker, H. J. Quantitative Analysis of the DNA Methylation Sensitivity of Transcription Factor Complexes. *Cell Rep.* **19**, 2383–2395 (2017).
  23. Zeiske, T., Baburajendran, N., Kaczynska, A., Brasch, J., Palmer, A. G., Shapiro, L., Honig, B. & Mann, R. S. Intrinsic DNA Shape Accounts for Affinity Differences between Hox-Cofactor Binding Sites. *Cell Rep.* **24**, 2221–2230 (2018).
  24. Lorenzin, F., Benary, U., Baluapuri, A., Walz, S., Jung, L. A., von Eyss, B., Kisker, C., Wolf, J., Eilers, M. & Wolf, E. Different promoter affinities account for specificity in MYC-dependent gene regulation. *Elife* **5**, 1–35 (2016).
  25. Zheng, Y. & Levens, D. Tuning the MYC response. *Elife* **5**, 2015–2017 (2016).
  26. Jacquemin, P., Hwang, J. J., Martial, J. A., Dollé, P. & Davidson, I. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 21775–85 (1996).
  27. Huh, H., Kim, D., Jeong, H.-S. & Park, H. Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells* **8**, 600 (2019).
  28. Santucci, M., Vignudelli, T., Ferrari, S., Mor, M., Scalvini, L., Bolognesi, M. L., Uliassi, E. & Costi, M. P. The Hippo Pathway and YAP/TAZ–TEAD Protein–Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment. *J. Med. Chem.* **58**, 4857–4873 (2015).
  29. Pobbati, A. V. & Hong, W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 390–8 (2013).
  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. 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).
  32. Liu, R., Lee, J., Kim, B. S., Wang, Q., Buxton, S. K., Balasubramanyam, N., Kim, J. J., Dong, J., Zhang, A., Li, S., Gupte, A. A., Hamilton, D. J., Martin, J. F., Rodney, G. G., Coarfa, C., Wehrens, X. H., Yechoor, V. K. & Moulik, M. Tead1 is required for maintaining adult cardiomyocyte function, and its loss results in lethal dilated cardiomyopathy. *JCI insight* **2**, (2017).
  33. Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y. & Sasaki, H. Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3177–89 (2008).
  34. Kaneko, K. J., Kohn, M. J., Liu, C. & DePamphilis, M. L. Transcription factor TEAD2 is

- involved in neural tube closure. *Genesis* **45**, 577–87 (2007).
35. Joshi, S., Davidson, G., Le Gras, S., Watanabe, S., Braun, T., Mengus, G. & Davidson, I. TEAD transcription factors are required for normal primary myoblast differentiation in vitro and muscle regeneration in vivo. *PLoS Genet.* **13**, e1006600 (2017).
  36. 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).
  37. 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**, 1962–71 (2008).
  38. Landin-Malt, A., Benhaddou, A., Zider, A. & Flagiello, D. An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors. *Gene* **591**, 292–303 (2016).
  39. Landin Malt, A., Cagliero, J., Legent, K., Silber, J., Zider, A. & Flagiello, D. Alteration of TEAD1 expression levels confers apoptotic resistance through the transcriptional up-regulation of Livin. *PLoS One* **7**, publikováno online (2012).
  40. Hucl, T., Brody, J. R., Gallmeier, E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Farrance, I. K. & Kern, S. E. High cancer-specific expression of mesothelin (MSLN) is attributable to an upstream enhancer containing a transcription enhancer factor dependent MCAT motif. *Cancer Res.* **67**, 9055–65 (2007).
  41. Schütte, U., Bisht, S., Heukamp, L. C., Keschull, 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**, 309–21 (2014).
  42. Wang, W., Xiao, Z.-D., Li, X., Aziz, K. E., Gan, B., Johnson, R. L. & Chen, J. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat. Cell Biol.* **17**, 490–9 (2015).
  43. Vališ, K., Talacko, P., Grobárová, V., Černý, J. & Novák, P. Shikonin regulates C-MYC and GLUT1 expression through the MST1-YAP1-TEAD1 axis. *Exp. Cell Res.* **349**, 273–281 (2016).
  44. Knight, J. F., Shepherd, C. J., Rizzo, S., Brewer, D., Jhavar, S., Dodson, A. R., Cooper, C. S., Eeles, R., Falconer, A., Kovacs, G., Garrett, M. D., Norman, A. R., Shipley, J. & Hudson, D. L. TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *Br. J. Cancer* **99**, 1849–58 (2008).
  45. Liu, Y., Wang, G., Yang, Y., Mei, Z., Liang, Z., Cui, A., Wu, T., Liu, C.-Y. & Cui, L. Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial–mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene* **35**, 2789–2800 (2016).
  46. Wang, C., Nie, Z., Zhou, Z., Zhang, H., Liu, R., Wu, J., Qin, J., Ma, Y., Chen, L., Li, S., Chen, W., Li, F., Shi, P., Wu, Y., Shen, J. & Chen, C. The interplay between TEAD4 and KLF5 promotes breast cancer partially through inhibiting the transcription of p27 Kip1. *Oncotarget* **6**, 17685–17697 (2015).
  47. Zhou, Y., Huang, T., Zhang, J., Wong, C. C., Zhang, B., Dong, Y., Wu, F., Tong, J. H. M., Wu, W. K. K., Cheng, A. S. L., Yu, J., Kang, W. & To, K. F. TEAD1/4 exerts oncogenic role and is negatively regulated by miR-4269 in gastric tumorigenesis. *Oncogene* **36**, 6518–6530 (2017).

48. Xiao, J. H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J. M. & Chambon, P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**, 551–568 (1991).
49. Lin, K. C., Park, H. W. & Guan, K. L. Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 862–872 (2017).
50. Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y. & DePamphilis, M. L. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* **15**, 1229–41 (2001).
51. Mahoney, W. M., Hong, J.-H., Yaffe, M. B. & Farnace, I. K. G. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem. J.* **388**, 217–25 (2005).
52. Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. & Guan, K. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* **21**, 2747–61 (2007).
53. Jiang, S. W., Dong, M., Trujillo, M. A., Miller, L. J. & Eberhardt, N. L. DNA Binding of TEA/ATTS Domain Factors Is Regulated by Protein Kinase C Phosphorylation in Human Choriocarcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 23464–23470 (2001).
54. Gupta, M. P., Kogut, P. & Gupta, M. Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3168–3177 (2000).
55. 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).
56. Gibault, F., Sturbaut, M., Bailly, F., Melnyk, P. & Cotellet, P. Targeting Transcriptional Enhanced Associate Domains (TEADs). *J. Med. Chem.* **61**, 5057–5072 (2018).
57. 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**, 17225–30 (2006).
58. 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.* 1–12 (2016). doi:10.1016/j.jmb.2016.03.008
59. 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).
60. Dimitrova-Paternoga, L., Jagtap, P. K. A., Chen, P. C. & Hennig, J. Integrative Structural Biology of Protein-RNA Complexes. *Structure* **28**, 6–28 (2020).
61. Cravello, L., Lascoux, D. & Forest, E. Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2387–2393 (2003).
62. Ahn, J., Jung, M. C., Wyndham, K., Yu, Y. Q. & Engen, J. R. Pepsin Immobilized on High-Strength Hybrid Particles for Continuous Flow Online Digestion at 10 000 psi. *Anal. Chem.* **84**, 7256–7262 (2012).
63. Boura, E., Rezabkova, L., Brynda, J., Obsilova, V. & Obsil, T. Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to

- the DNA. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 1351–1357 (2010).
64. Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V. & Obsil, T. Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding. *J. Biol. Chem.* **282**, 8265–8275 (2007).
  65. Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., Van Der Lee, R., Bessy, A., Chèneby, J., Kulkarni, S. R., Tan, G., Baranasic, D., Arenillas, D. J., Sandelin, A., Vandepoele, K., Lenhard, B., Ballester, B., Wasserman, W. W., Parcy, F. & Mathelier, A. JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **46**, D260–D266 (2018).
  66. Ridinger-Saison, M., Boeva, V., Rimmelé, P., Kulakovskiy, I., Gallais, I., Levavasseur, B., Paccard, C., Legoix-Né, P., Morlé, F., Nicolas, A., Hupé, P., Barillot, E., Moreau-Gachelin, F. & Guillouf, C. Spi-1/PU.1 activates transcription through clustered DNA occupancy in erythroleukemia. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8927–8941 (2012).



## Seznam publikací:

- 1) Möller, I. R., Slivacka, M., Hausner, J., Nielsen, A. K., Pospíšilová, E., Merkle, P. S., **Lišková, R.**, Polák, M., Loland, C. J., Kádek, A., Man, P., & Rand, K. D. (2019). Improving the Sequence Coverage of Integral Membrane Proteins during Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Experiments. *Analytical Chemistry*, *91*(17), 10970–10978.
- 2) **Filandrova, R.**, Kavan, D., Kadek, A., Novak, P., & Man, P. (2021). Studying Protein–DNA Interactions by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. In *Multiprotein Complexes: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology (2247))*, 193–219, Humana Press Inc.
- 3) Slavata, L., Chmelík, J., Kavan, D., **Filandrová, R.**, Fiala, J., Rosůlek, M., Mrázek, H., Kukačka, Z., Vališ, K., Man, P., Miller, M., McIntyre, W., Fabris, D., & Novák, P. (2019). Ms-based approaches enable the structural characterization of transcription factor/DNA response element complex. *Biomolecules*, *9*(10), 1–21
- 4) **Filandrová, R.**, Vališ, K., Černý, J., Chmelík, J., Slavata, L., Fiala, J., Rosůlek, M., Kavan, D., Man, P., Chum, T., Cebecauer, M., Fabris, D., & Novák, P. (2021). Motif orientation matters: structural characterization of TEAD1 recognition of genomic DNA. *Structure*, *29*, 1–12



# Růžena Filandrová

PhD Student

## PERSONAL

Birthday : 27th February 1992  
Nationality : Czech  
Languages : Czech - native speaker  
English - advanced (C1)  
French - basic  
Relationship : Married  
Hobbies : LARP and Reenactment,  
Cycling, Cats

## SKILLS AND EXPERIENCE

### Mass Spectrometry:

ESI/nESI-FT-ICR, MALDI-TOF  
LC-MS, LC-MS/MS (HPLC, UPLC)  
Hydrogen/Deuterium Exchange  
Chemical Cross-linking  
FPOP

### Other scientific techniques:

Recombinant protein production in *E.Coli*,  
Western Blotting, Immobilization of  
proteins on resins, Protease activity assay,  
Fluorescence anisotropy  $K_D$  assay

### Software and other skills:

Bruker DataAnalysis, ProteinScape  
StavroX  
PyMOL  
CorelDRAW  
MS Office

## CONTACT

+420 604 444 611  
filandrova.ruzena@gmail.com  
Kysucká 13, 196 00, Prague, Czechia

## PROFILE

I am currently a PhD student working in laboratory of Petr Novák (<http://peterslab.org/>) which is mainly focused on combining mass spectrometry with structural biology. I started here with my Master's thesis project where I optimized recombinant preparation of TEAD1 transcription factor. In my PhD project I continued working with this protein and I have studied its interactions with DNA by using structural mass spectrometry techniques such as H/D exchange and chemical cross-linking. I have also used native MS and fluorescence anisotropy to determine  $K_D$  of TEAD1 complexes with different DNA oligonucleotides. Besides my PhD project I have also worked with acidic proteases which I immobilized on resins and tested for use in H/D exchange to improve structural resolution. In the future I hope to continue my career in science by joining a lab where I can utilize and further expand my experience in structural mass spectrometry as a postdoc.

## EDUCATION

2003 - 2011: **High School**  
Gymnázium Českolipská, Prague, Czechia  
2011 - 2014: **Bachelor's Degree in Clinical and Toxicological Analysis**  
Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia  
2014 - 2016: **Masters's Degree in Clinical and Toxicological Analysis**  
Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia  
2016 - now: **PhD in Biochemistry**  
Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia

## NON-SCIENTIFIC WORK EXPERIENCE AND CERTIFICATES

2018 - Obtained Cambridge English FCE, Grade A (CEFR Level C1)  
2015 - now - Organizing festivals and games for 200-1000 participants  
2013 - 2016 - Receptionist  
2010 - 2014 - Leader of Scout troop

## ACADEMIC ACHIEVEMENTS AND EXPERIENCE

**Publications:** 4

**Grants:** 2018 - 2020 financial support from Charles University Grant Agency

**Conference talks:** 2

**Conference poster presentations:** 9 including 3 short poster talks

**Teaching:** five semesters of practical course in biochemistry,  
advisor of two bachelor theses

## REFERENCE

**Petr Novák**  
*Head of Laboratory and PhD Advisor*  
pnovak@biomed.cas.cz

**Petr Man**  
*Senior Scientist*  
pman@biomed.cas.cz