

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Růžena Lišková

REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU TEAD

Recombinant preparation of TEAD transcription factor

Diplomová práce

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

Konzultant: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Praha 2016

## Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....  
Růžena Lišková

## Abstrakt

Transkripční faktory z TEAD rodiny hrají v organismu důležitou roli během jeho vývoje, kdy aktivují expresi proteinů ovlivňujících růst a diferenciaci buněk a také proteinů bránících apoptose, čímž regulují velikost orgánů. Aktivita TEAD proteinů je regulována prostřednictvím signálních drah a interakcí s koaktivátory a porucha těchto regulačních mechanismů může způsobit vznik nádorových onemocnění. Z toho důvodu jsou TEAD proteiny zajímavým cílem pro vývoj nových protirakovinných léčiv založených na inhibici jejich aktivity. Jednou z možností, jak inhibovat aktivitu transkripčního faktoru, je zabránit jeho vazbě na DNA.

Pro navržení nového léčiva bránícího vazbě transkripčního faktoru na DNA je nejprve potřeba přesně znát strukturní podstatu interakce těchto dvou molekul. V této práci byla připravena DNA vazebná doména lidského proteinu TEAD1 postupem rekombinantní exprese v bakterii *E. coli*. Byly nalezeny vhodné podmínky produkce a připravovaný protein byl purifikován do dostatečné čistoty pro strukturní analýzu jeho interakcí s DNA.

## Klíčová slova

Transkripční faktor, TEAD1, DNA vázající protein, rekombinantní exprese, purifikace proteinu

## Abstract

The TEAD family transcription factors play an important role during development of organisms, where their main purpose is to regulate organ size by activating expression of proteins involved in cell growth and differentiation and apoptosis inhibition. TEAD proteins activity is regulated by signalling pathways and interactions with coactivators. Disregulation of these mechanisms can lead to development of tumors, which is the reason why TEAD proteins became an interesting target for development of new anticancer drugs based on inhibiting their activity. There are several possibilities how to inhibit activity of a transcription factor including blocking its bond to DNA.

To design a new drug that blocks transcription factors binding to DNA the structural basis of interaction of these two molecules has to be known first. In this thesis the DNA binding domain of human protein TEAD1 was prepared using the technique of recombinant expression in bacteria *E. coli*. Suitable conditions of protein production were found and the DNA binding domain of TEAD1 protein was purified so it will be possible to use it for structural analysis of its interaction with DNA.

## Keywords

Transcription factor, TEAD1, DNA binding protein, recombinant expression, protein purification

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Novákovi Ph.D. za vedení diplomové práce a RNDr. Danielu Kavanovi Ph.D. za veškeré rady a pomoc, kdykoliv to bylo potřeba.

Můj dík patří také celému kolektivu laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření přátelského prostředí a možnost obrátit se na kohokoliv s žádostí o radu.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za podporu během celého mého studia.

# Obsah:

1.	<b>Teoretická část</b> .....	10 -
1.1.	Regulace transkripce transkripčními faktory .....	10 -
1.1.1.	Regulační elementy DNA .....	11 -
1.1.1.1.	Promotory .....	12 -
1.1.1.2.	Enhancery .....	13 -
1.1.2.	Vliv transkripčních faktorů na strukturu chromatinu .....	15 -
1.2.	Modulární struktura transkripčních faktorů .....	16 -
1.2.1.	DNA vázající doména .....	17 -
1.3.	TEAD rodina transkripčních faktorů .....	20 -
1.3.1.	Savčí TEAD proteiny .....	20 -
1.3.2.	Struktura TEAD proteinů .....	23 -
1.3.2.1.	TEA doména .....	24 -
1.3.2.1.1.	Vazebný motiv .....	25 -
1.3.2.2.	Transaktivační doména .....	25 -
1.3.3.	Koaktivátory .....	26 -
1.3.3.1.	YAP .....	26 -
1.3.3.2.	TAZ .....	27 -
1.3.3.3.	VGLL .....	29 -
1.3.4.	Cílové geny a jejich funkce .....	29 -
1.3.5.	Souvislost TEAD proteinů a nádorových onemocnění .....	31 -
1.3.5.1.	Léčba rakoviny cílená na TEAD proteiny .....	33 -
2.	<b>Cíl práce</b> .....	34 -
3.	<b>Materiál</b> .....	35 -
3.1.	Přístroje a vybavení .....	35 -
3.2.	Chemikálie .....	36 -
3.3.	Kity .....	38 -
3.4.	Enzymy .....	38 -
3.5.	Primery a vektory .....	38 -
3.6.	Bakteriální kmeny .....	39 -
3.7.	Roztoky, pufrý a média .....	39 -
4.	<b>Metody</b> .....	41 -
4.1.	Příprava plasmidů .....	41 -
4.1.1.	Amplifikace insertů pomocí PCR .....	41 -
4.1.1.1.	Agarosová elektroforéza .....	42 -
4.1.2.	Ligace do vektoru pBluescript II SK (+) .....	42 -
4.1.3.	Transformace kompetentních klonovacích buněk .....	43 -
4.1.4.	Modro-bílá selekce .....	43 -
4.1.5.	Rychlá izolace plasmidů pro restrikční analýzu .....	43 -
4.1.6.	Restrikční analýza .....	44 -

4.1.7.	Příprava většího množství plasmidů.....	- 44 -
4.1.8.	Precipitace v ethanolu.....	- 44 -
4.1.9.	Ligace do expresního vektoru pET-28a(+)	- 44 -
4.1.10.	Kontrola nově připravených plasmidů.....	- 46 -
4.2.	Výběr vhodných podmínek produkce.....	- 47 -
4.2.1.	Transformace kompetentních produkčních buněk.....	- 47 -
4.2.2.	Optimalizace koncentrace induktoru a výběr vhodného produkčního kmene.....	- 47 -
4.2.2.1.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.....	- 48 -
4.2.2.2.	Elektropřenos.....	- 48 -
4.2.3.	Peptidové mapování.....	- 49 -
4.2.4.	Výběr vhodné doby produkce.....	- 50 -
4.2.5.	Výběr vhodné produkční teploty.....	- 50 -
4.3.	Purifikace.....	- 50 -
4.3.1.	Produkcce DNA vazebné domény TEAD1 ve velkém objemu média.....	- 50 -
4.3.2.	Izolace proteinů z buněčné kultury.....	- 51 -
4.3.3.	Afinitní chromatografie.....	- 51 -
4.3.4.	Výměna pufrů dialýzou.....	- 52 -
4.3.5.	Iontově výměnná chromatografie.....	- 52 -
4.3.6.	Odštěpení histidinové kotvy.....	- 53 -
4.3.7.	Hmotnostně spektrometrická analýza produktů štěpení.....	- 53 -
4.3.8.	Gelová permeační chromatografie.....	- 54 -
5.	<b>Výsledky</b> .....	- 55 -
5.1.	Příprava plasmidů.....	- 55 -
5.1.1.	Amplifikace insertů pomocí PCR.....	- 56 -
5.1.2.	Ligace do vektoru pBluescript II SK (+).....	- 56 -
5.1.3.	Ligace do expresního vektoru pET-28a(+)	- 58 -
5.1.4.	Kontrola nově připravených plasmidů.....	- 59 -
5.2.	Výběr vhodných podmínek produkce.....	- 61 -
5.2.1.	Optimalizace koncentrace induktoru a výběr vhodného produkčního kmene.....	- 61 -
5.2.1.	Peptidové mapování.....	- 62 -
5.2.2.	Výběr vhodné produkční teploty.....	- 66 -
5.2.3.	Výběr vhodné doby produkce.....	- 66 -
5.3.	Purifikace.....	- 67 -
5.3.1.	Afinitní chromatografie.....	- 67 -
5.3.2.	Iontově výměnná chromatografie.....	- 69 -
5.3.3.	Odštěpení histidinové kotvy.....	- 71 -
5.3.4.	Gelová permeační chromatografie.....	- 73 -
6.	<b>Diskuse</b> .....	- 75 -
7.	<b>Závěr</b> .....	- 79 -

## Seznam zkratek a symbolů:

<i>ABCB1</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „ATP-binding cassette subfamily B“)
<i>Afp</i>	cílový gen proteinu Tead, kóduje $\alpha$ -fetoprotein
AK	aminokyselina
<i>Ankrd1</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „ankyrin repeat domain“)
ATP	adenosintrifosfát
ATTS	jiný název pro TEA doménu, zkratka složená z prvních písmen proteinů, ve kterých byla nalezena (AbaA, TEF-1, Tec-1, Scalloped)
<i>Birc2</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protein“)
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová
cDNA	komplementární DNA
<i>Cdx2</i>	cílový gen proteinu Tead (z anglického „caudal type homeobox“)
<i>CTGF</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „connective tissue growth factor“)
<i>CYR61</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „cysteine-rich angiogenic inducer“)
<i>DDIT4</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „DNA damage inducible transcript“)
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiothreitol
<i>EDN</i>	cílový gen proteinu TEAD, kóduje protein Endothelin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eRNA	enhancerová RNA
<i>Fgfr4</i>	cílový gen proteinu Tead (z anglického „fibroblast growth factor receptor“)
FOXA	rodina transkripčních faktorů obsahujících „forkhead box“ DNA vazebnou doménu
FT ICR	hmotnostní analyzátor (z anglického „fourier transform ion cyclotron resonance“)
<i>Gata3</i>	cílový gen proteinu Tead, kóduje transkripční faktor vázající GATA sekvenci DNA
<i>GSK3A</i>	cílový gen proteinu TEAD, glykogen synthasa kinasa-3 alfa
HLH	DNA vázající struktura „helix-loop-helix“
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
LATS	kinasa, součást Hippo signální dráhy (z anglického „large tumor suppressor“)
LC/MS čistota	dostatečná čistota pro kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií
MALDI	iontový zdroj pro hmotnostní spektrometr (z anglického „matrix assisted laser desorption ionization“)
M-CAT	specifická sekvence DNA, kterou váže TEAD ve svalech (z anglického „muscle – cytosine, adenine, thymine“)
<i>Mcl1</i>	cílový gen proteinu Tead (z anglického „myeloid cell leukemia“)
mRNA	messenger RNA



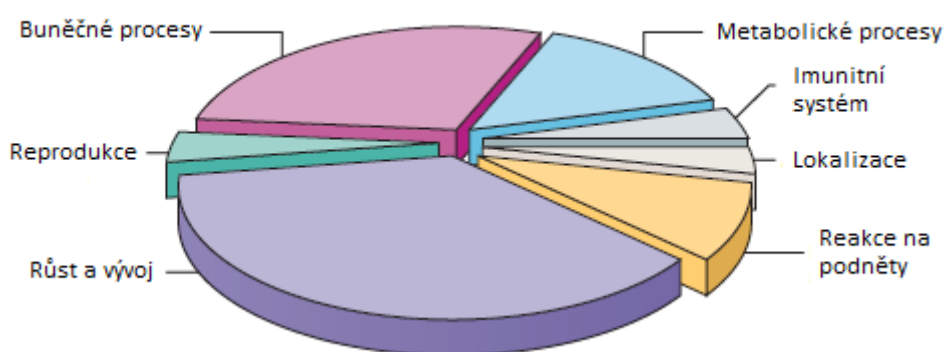
MST	kinasa, součást Hippo signální dráhy (z anglického „mammalian sterile 20-like kinase“)
<i>NAIP</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „NLR family apoptosis inhibitory protein“)
Ni-NTA	nosič pro afinitní chromatografii (Nikelnaté kationty vázané přes nitrilotrioctovou kyselinu – NTA)
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>Oct</i>	cílový gen proteinu Tead (z anglického „octamer-binding transcription factor“)
<i>Pax3</i>	cílový gen proteinu Tead (z anglického „paired box“)
pb	páry bází
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDZ motiv	strukturní motiv v aktivační doméně proteinu YAP, akronym z názvů proteinů, ve kterých byl jako první nalezen
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
<i>RHAMM</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „receptor for hyaluronan mediated motility“)
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS
SlyD	FKBP – typ peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa SlyD, bakteriální protein zachytávající se na Ni-NTA koloně
SV40	simian virus 40
<i>SOX</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „SRY-related HMG-box“, přičemž SRY je zkratka pro „sex determining region Y“ a HMG „high mobility group“)
TAZ	koaktivátor TEAD proteinů (z anglického „transcriptional coactivator with PDZ-binding motif“)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEAD	rodina transkripčních faktorů obsahujících TEA doménu (z anglického „transcriptional enhancer activator domain“)
TEF-1	jiný název pro TEAD1 (z anglického „transcriptional enhancer factor“)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan
TF	transkripční faktor
TOF	detektor pro hmotnostní spektrometr (z anglického „time of flight“)
<i>TRAIL</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“)
<i>VEGFA</i>	cílový gen proteinu TEAD (z anglického „vascular endothelial growth factor“)
Vg	Vestigial protein, koaktivátor Scallopedu u drosophily
VGLL	koaktivátor proteinu TEAD (z anglického Vestigial-like protein)
WW doména	strukturní motiv YAP proteinů, obsahuje dva vysoce konzervované tryptofany (WW)
YAP	koaktivátor proteinu TEAD (z anglického „YES-associated protein“)
ZNF	DNA vázající struktura zinkový prst (z anglického „zinc finger“)

## 1. Teoretická část

### 1.1. Regulace transkripce transkripčními faktory

Transkripční faktory jsou proteiny vázající se na DNA, pomocí kterých je buňka schopná regulovat přepis genetické informace z DNA do mRNA a tím i expresi jednotlivých genů, což je proces, při kterém je informace zakódovaná v DNA přes soustavu kroků zahrnujících transkripci, sestřih mRNA, translaci a posttranslační úpravy nakonec přeložena na výsledný produkt, protein. Díky této regulaci je pak organismus schopen reagovat na řadu vnějších i vnitřních podnětů změnami v množství a lokalizaci jím produkovaných proteinů<sup>1</sup>.

Regulace transkripce pomocí transkripčních faktorů hraje zásadní roli v mnoha důležitých biologických procesech, jako je například přestup mezi fázemi buněčného cyklu, udržování stálé vnitrobuněčné metabolické rovnováhy i při změnách ve vnějším prostředí nebo diferenciaci buněk a vývoj tkání a orgánů<sup>1,2</sup>. Změny v aktivitě nebo specifitě vazby transkripčních faktorů jsou také jednou z důležitých součástí evolučního vývoje organismů. Byla předpovězena existence přibližně 1500 protein kódujících genů v lidském genomu, které kódují transkripční faktory, ale jen u části z nich byla zatím přesně popsána jejich struktura a funkce. Na obr. 1 jsou pak známé transkripční faktory roztrženy do skupin podle své funkce v organismu<sup>2</sup>.

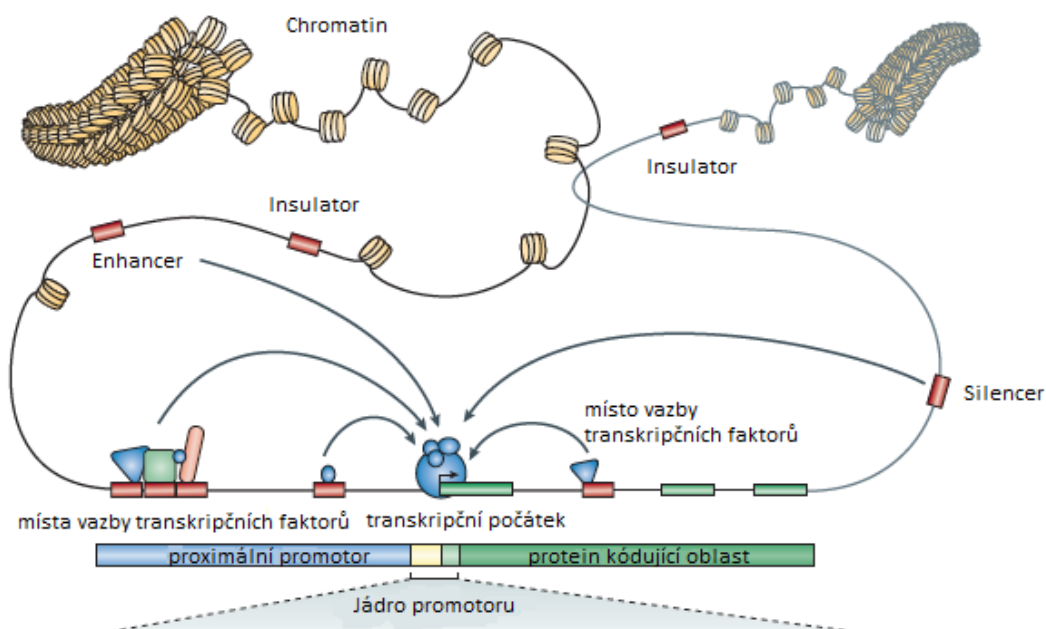


Obr. 1: Shrnutí biologických procesů regulovaných transkripčními faktory. Nejvíce transkripčních faktorů reguluje diferenciaci buněk a tkání během vývoje a velké množství se jich také účastní buněčných procesů (např. přenos signálu uvnitř buňky). Některé transkripční faktory mohou spadat do více než jedné skupiny<sup>2</sup>.

Porucha regulace transkripce pomocí transkripčních faktorů je důvodem vzniku mnoha závažných onemocnění. Transkripční faktory bývají často nadměrně exprimovány v nádorové tkáni a až třetina vývojových poruch u lidí je spojována s poruchou jejich funkce<sup>1</sup>. Z těchto důvodů jsou transkripční faktory zajímavým cílem při vývoji nových léčiv. Léčiva cílená na tyto proteiny se už v současnosti úspěšně používají například u některých typů rakoviny prsu<sup>3</sup>. Aby mohlo být navrženo nové léčivo zacílené na některý transkripční faktor, je nejprve potřeba přesně znát jak jeho funkci v organismu, tak i chemickou strukturu a možnosti interakcí s DNA a s dalšími molekulami. Transkripční faktory proto jsou v současné době častým předmětem zkoumání.

### 1.1.1. Regulační elementy DNA

Regulační elementy jsou oblasti DNA obsahující specifické sekvence, na které nasedají transkripční faktory a mohou tak ovlivnit aktivitu RNA polymerasy II, tedy enzymu, který je u eukaryotických buněk zodpovědný za přepis genetické informace z DNA do mRNA. Transkripční faktory s ní mohou interagovat buď přímo, nebo prostřednictvím jiných faktorů. Mohou také ovlivnit míru sbalení chromatinu a tím i jeho přístupnost pro RNA polymerasu II nebo další transkripční faktory<sup>4</sup>. Oblasti patřící mezi tyto cis-regulační elementy jsou shrnuty na obrázku 2.



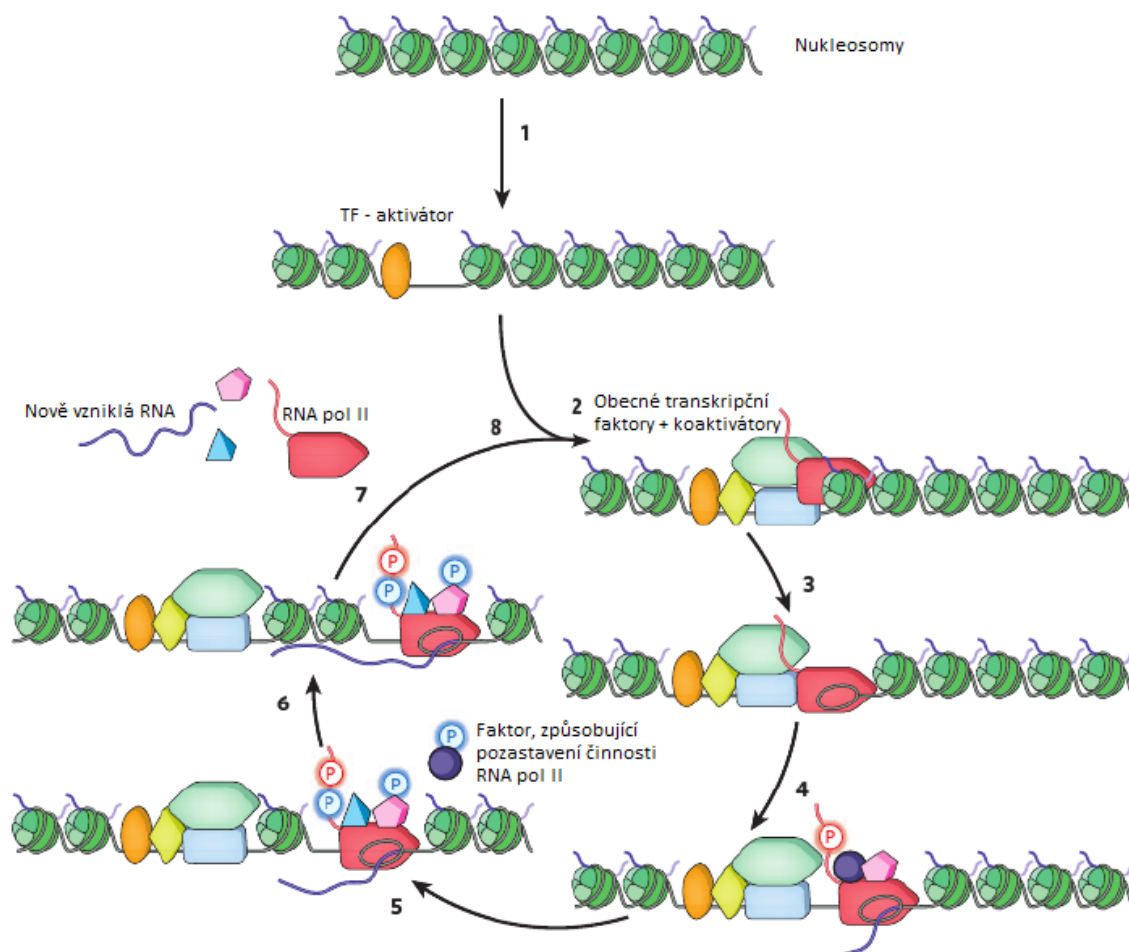
Obr. 2: Regulační oblasti DNA<sup>4</sup>.

V okolí transkripčního počátku se nachází jádro promotoru, na které nasedají obecné transkripční faktory, které společně s RNA polymerasou II tvoří preiniciační komplex a umožňují zahájení transkripce. Na proximální promotor potom nasedají transkripční faktory nebo celé jejich skupiny a ovlivňují aktivitu RNA polymerasy II. Mezi vzdálenější cis-regulační elementy patří enhancery a silencery. Vazba transkripčního faktoru na tyto oblasti také může buď zvýšit (enhancery) nebo naopak tlumit (silencery) míru transkripce. Jako insulatory (v doslovném překladu oddělovače) jsou označovány oblasti, které brání přenosu signálu z enhancerů a tím snižují jejich vliv na míru transkripce daného genu<sup>5</sup>.

#### 1.1.1.1. Promotory

Promotory jsou regulační oblasti na DNA, které se nachází v těsné blízkosti místa, kam nasedá RNA polymerasa II – transkripčního počátku. V těsné blízkosti k transkripčnímu počátku (do vzdálenosti 100 párů bází) leží v živočišných buňkách jádro promotoru. Právě toto místo obsahuje sekvence rozpoznávané obecnými transkripčními faktory, jako je například TATA box, které umožňují tvorbu preiniciačního komplexu a zahájení procesu transkripce<sup>6</sup>.

Na obrázku 3 (str. 13) jsou znázorněny jednotlivé kroky transkripčního cyklu. Aby mohla RNA polymerasa II nasednout na promotor, je v některých případech nejprve nutné uvolnit DNA v oblasti promotoru z její vazby na nukleosom<sup>7</sup>. K tomu slouží transkripční faktory, které bývají označovány jako „pioneer“ faktory. Tyto proteiny se dokážou vázat na sbalený chromatin a ve spolupráci s dalšími faktory způsobit jeho rozbalení (Obr. 3.1)<sup>8</sup>. V dalším kroku (Obr. 3.2) je takto odhalený promotor rozpoznáván transkripčním faktorem TFIID, což je komplex, který se skládá z TATA box vázajícího proteinu a třinácti dalších s ním asociovaných proteinů<sup>9</sup>. Tímto je zahájen vznik preiniciačního komplexu, který pokračuje nasednutím dalších obecných transkripčních faktorů (TFIIA, B, C, E, F a H) a RNA polymerasy II. Celý proces může být ovlivněn transkripčními faktory navázanými na specifické sekvence na promotoru nebo enhanceru a jimi vázanými koaktivátory<sup>10</sup>. V kroku 3 RNA polymerasa II začíná syntetizovat mRNA. Po oddělení proteinů vázaných na TATA box může být její činnost vlivem některých transkripčních faktorů pozastavena (Obr. 3.4) a později vlivem dalších zase obnovena (Obr. 3.5). Po dosyntetizování celého úseku (Obr. 3.6) se RNA polymerasa II uvolní (Obr. 3.7) a může být znovu využita (Obr. 3.8)<sup>7</sup>.



Obr. 3: Transkripční cyklus. Jednotlivé kroky, které mohou být ovlivněny transkripčními faktory<sup>7</sup>

Oblast promotoru vzdálenější od počátku transkripce se nazývá proximální promotor. Tato oblast obsahuje specifické sekvence pro vazbu transkripčních faktorů, které dále usnadňují (aktivátory) nebo naopak ztěžují (represory) tvorbu preiniciačního komplexu a regulují tak aktivitu RNA polymerasy II<sup>11</sup>.

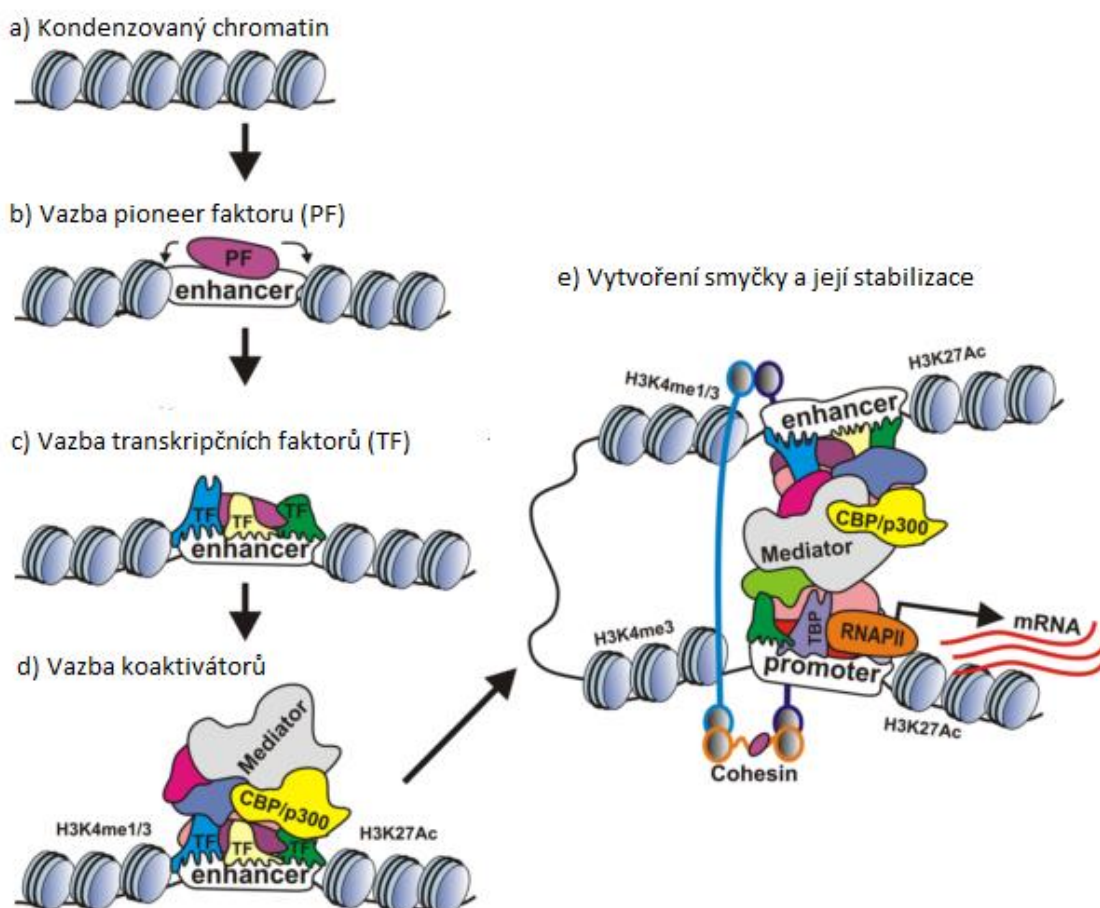
### 1.1.1.2. Enhancery

Enhancery jsou krátké regulační úseky DNA, které se na rozdíl od promotorů nachází ve větší vzdálenosti od transkripčního počátku jimi regulovaného genu. První známý enhancer byl objeven v roce 1981 v genomu viru SV40<sup>12</sup> a následně byly podobné sekvence nalezeny u mnoha vyšších eukaryot<sup>13</sup>. Bývají několik stovek párů bází dlouhé<sup>5</sup> a jejich vzdálenost od promotoru, se kterým interagují, se pohybuje v rozmezí od několika tisíc až do milionu párů bází<sup>13</sup>.

Enhancery ve své sekvenci obsahují skupiny 8 až 12 párů bází dlouhých sekvenčních

motivů specificky rozpoznávaných transkripčními faktory<sup>5</sup>. Takto navázané transkripční faktory potom k sobě přitahují koaktivátory a celý proces nakonec vede ke stimulaci transkripce cílového genu<sup>13</sup>. K ovlivnění transkripce obvykle nestačí vazba jednoho transkripčního faktoru, ale je potřeba celá skupina navzájem spolupracujících faktorů. Transkripční faktory jsou v buňce exprimovány v reakci na signály z okolí v různé míře v závislosti například na typu tkáně nebo aktuálním stádiu vývoje<sup>5</sup>. Díky této skutečnosti dokáže buňka přesněji regulovat expresi jednotlivých proteinů.

Způsob, jakým transkripční faktory navázané na enhanceru uplatňují svůj vliv na skládání preiniciačního komplexu a aktivitu RNA polymerasy II, byl popsán několika teoretickými modely. V současnosti bývá funkce enhancerů nejčastěji vysvětlována pomocí tak zvaného smyčkového modelu. Enhancer se podle tohoto modelu fyzicky přiblíží k promotoru tím, že se DNA ohne a vytvoří se na ní smyčka. Příslušný model byl i experimentálně potvrzen (obr. 4)<sup>11,14</sup>.



Obr. 4: Regulace transkripce pomocí transkripčních faktorů vázaných na enhancer<sup>13</sup>

Stejně jako v případě promotoru i u enhanceru je nejprve potřeba uvolnit cílovou sekvenci pro transkripční faktory z její vazby na nukleosom pomocí pioneer faktorů (Obr. 4a,b). Vazba pioneer faktorů bývá často spojena s demethylací DNA a následována připojením enzymů modifikujících histony. Na takto odkrytý enhancer mohou nasedat transkripční faktory (Obr. 4c) a v případě, že se zde navážou ve správné kombinaci, dojde i k vazbě koaktivátorů (Obr. 4d). Jako koaktivátory slouží proteiny, které samy o sobě nemají schopnost vázat se na DNA, ale ve spolupráci s transkripčními faktory dokážou zprostředkovat kontakt mezi enhancerem a obecnými transkripčními faktory na promotoru (Obr. 4e). Vzniklý komplex je nakonec stabilizován pomocí dalších faktorů, jako je mediátorový nebo kohesinový komplex<sup>13</sup>.

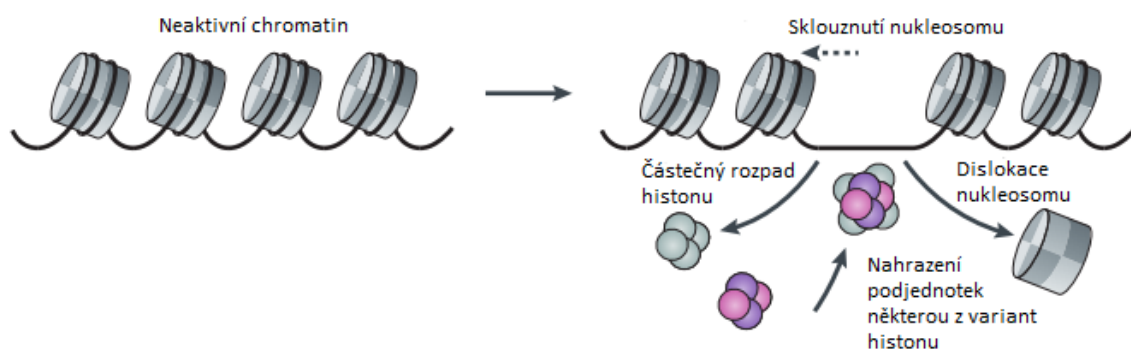
Dalším možným faktorem přispívajícím ke stabilizaci komplexu spojujícího enhancer s promotorem je takzvaná enhancerová RNA (eRNA). Tyto 100 až 500 bází dlouhá vlákna RNA vznikají transkripcí nekódujících sekvencí v oblasti enhanceru, a přestože jejich přesná funkce nebyla zatím úplně prozkoumána, bylo zjištěno, že v některých případech mohou přispívat právě ke zvýšení stability smyčky vzniklé při interakci enhanceru a promotoru<sup>13,14</sup>.

### 1.1.2. Vliv transkripčních faktorů na strukturu chromatinu

DNA se v jádrech eukaryotických buněk nachází složená do kompaktního chromatinu. Vlákno DNA je nejprve dvakrát obtočeno okolo histonu, což je oktamerní protein skládající se ze dvou tetramerních (H2A, H2B, H3 a H4) podjednotek, čímž vzniká komplex, který se nazývá nukleosom. Vzniklé nukleosomy jsou potom dále svinuty do vyšších trojrozměrných struktur, což umožňuje další kondenzaci chromatinu<sup>8</sup>. Právě míra komprimace chromatinu je limitujícím faktorem pro nasedání transkripčních faktorů, které pro svou vazbu potřebují volný přístup ke své cílové sekvenci. Důležitou skupinou transkripčních faktorů jsou proto takové, které dokážou uvolnit DNA z vazby na nukleosomu nebo naopak její afinitu k histonu zvýšit a tím regulovat její přístupnost pro další faktory.

Existují tři základní skupiny transkripčních faktorů měnících strukturu chromatinu. Do první skupiny patří faktory, které remodelují chromatin za spotřeby ATP. Obvykle to bývají velké proteinové komplexy s množstvím podjednotek, z nichž podjednotka s ATPasovou aktivitou je určující pro mechanismus jejich funkce<sup>10</sup>. Těchto mechanismů

existuje několik a patří mezi ně sklouznutí nukleosomu, dislokace nukleosomu, částečný rozpad histonu nebo nahrazení histonu některou z jeho variant (Obr. 5)<sup>15</sup>.



Obr. 5: Způsoby remodelace chromatinu pomocí komplexů spotřebovávajících ATP<sup>15</sup>

Do druhé skupiny faktorů měnících strukturu chromatinu patří enzymy schopné kovalentně modifikovat některé konkrétní aminokyseliny histonů. Tyto modifikace mohou způsobit sbalení nebo rozbalení chromatinu, případně mohou tvořit vazebná místa pro další transkripční faktory a kofaktory. Zatímco acetylace lysinů pomocí histon acetyltransferas přispívá k rozvolnění chromatinu a aktivaci transkripce, může methylace lysinů a argininů, stejně jako ubiquitinace lysinů transkripci jak aktivovat, tak i tlumit v závislosti na přesné poloze té které modifikace<sup>10</sup>.

Třetí skupinou transkripčních faktorů umožňujících aktivaci transkripčně neaktivního chromatinu jsou takzvané pioneer faktory. Jejich nejznámějšími zástupci jsou proteiny patřící do FOXA rodiny. U těchto proteinů je známa jejich schopnost vázat se na sbalený chromatin a tím umožnit vazbu dalších transkripčních faktorů a přispívat tak k aktivaci transkripce<sup>8</sup>. V některých případech mohou tyto proteiny spolupracovat s ostatními faktory způsobujícími rozbalení chromatinu, jako jsou například enzymy modifikující histony. Pioneer faktor se jako první naváže na neaktivní chromatin a rozvolní jeho strukturu natolik, že umožní přístup remodelačním komplexům, které pak mohou pokračovat v dalším rozbalování chromatinu<sup>16</sup>.

## 1.2. Modulární struktura transkripčních faktorů

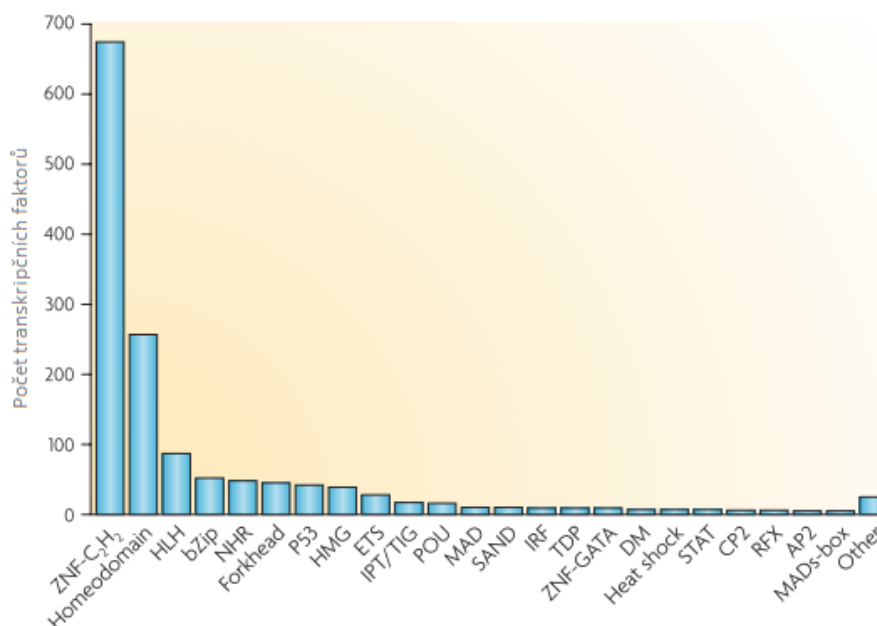
Pro strukturu transkripčních faktorů je typická přítomnost několika větších strukturních domén, mezi které patří interakční doména, efektorová (někdy bývá také nazývána aktivační) doména a DNA vázající doména. Interakční doména slouží transkripčním



faktorům ke zprostředkování kontaktu s ostatními proteiny, jako jsou další transkripční faktory nebo kofaktory<sup>17</sup>. Jeden protein může obsahovat i více interakčních domén pro různé faktory díky čemuž může například přijímat signál z několika různých signálních drah<sup>10</sup>. Efektorová doména je pak tou částí transkripčních faktorů, přes kterou jsou schopny uplatnit svůj vliv na proces transkripce. Může například interagovat s prvky preiniciačního komplexu a napomáhat aktivaci nebo represi RNA polymerasy II nebo přispívat k rozvolnění struktury chromatinu<sup>17</sup>.

### 1.2.1. DNA vázající doména

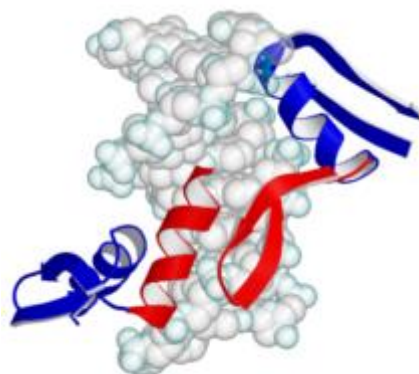
Nejčastěji zkoumanou částí struktury transkripčních faktorů je jejich DNA vázající doména. Tato doména je zodpovědná za specifickou vazbu transkripčního faktoru na jeho cílovou sekvenci a podle její struktury se dají transkripční faktory rozdělit do jednotlivých rodin. Struktura DNA vazebné domény bývá obvykle evolučně konzervovaná a objevuje se prakticky ve stejné podobě v rámci celé vývojové linie. Je možný i výskyt více DNA vázajících domén patřících do stejné rodiny v rámci jednoho proteinu<sup>18</sup>. Transkripční faktory příslušející do jedné rodiny také často mají podobnou funkci. Příkladem jsou transkripční faktory obsahující homeodoménu, které se většinou účastní vývojových procesů nebo faktory regulující transkripci interferonů („interferon regulatory factor family“), které zase bývají spojovány s imunitní odpovědí na virové infekce<sup>2</sup>.



Obr. 6: Počet známých členů jednotlivých rodin transkripčních faktorů rozdělených podle struktury DNA vázající domény<sup>2</sup>

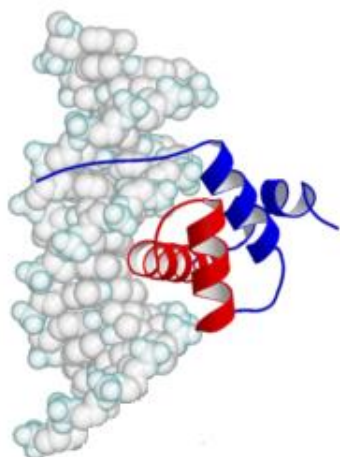
Počet známých rodin DNA vázajících domén stále narůstá (k roku 2009 jich bylo 77 a v roce 2012 už 111), přičemž nejvíce členů (80 % celkového počtu transkripčních faktorů) mají rodiny transkripčních faktorů obsahujících zinkový prst (ZNF), homeodoménu nebo helix-loop-helix (HLH) strukturu (Obr. 6, str. 17)<sup>2,19</sup>. Příslušnost transkripčního faktoru k některé z rodin a z toho plynoucí přítomnost vazebného motivu specifického pro danou rodinu je určující pro jeho způsob vazby na DNA.

Například rodina s největším počtem členů obsahuje ve struktuře DNA vazebné domény motiv zvaný zinkový prst. Pro jeho strukturu je charakteristická přítomnost dvou antiparalelních  $\beta$ -listů, za nimiž následuje  $\alpha$ -helix (obr. 7). Dále obsahuje zinečnatý kation, který je koordinován přes dvojici cysteinů na druhém  $\beta$ -listu a dvojici histidinů na  $\alpha$ -helixu. Při vazbě na DNA je  $\alpha$ -helix zinkového prstu vložen do velkého žlábků DNA, kde interagují aminokyselinové zbytky s bázemi pomocí vodíkových můstků<sup>20</sup>. Častá je také přítomnost více zinkových prstů na jednom proteinu, které se při vazbě na DNA okolo ní spirálovitě obtácejí<sup>21</sup>. Čím více zinkových prstů protein obsahuje, tím unikátnější sekvenci bude vázat<sup>22</sup>.



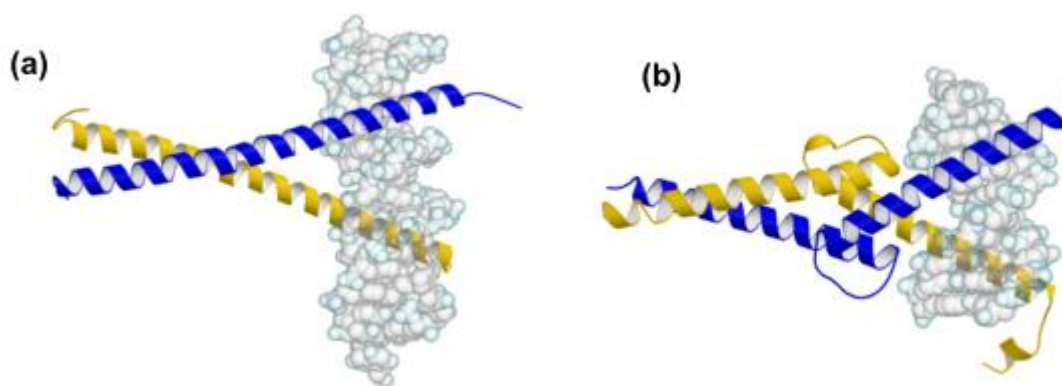
Obr. 7: Struktura komplexu zinkového prstu (znázorněn červeně) s DNA<sup>22</sup>

Dalším často se vyskytujícím motivem, který umožňuje vazbu transkripčních faktorů na DNA, je helix-turn-helix. Tento motiv se vyskytuje například ve struktuře homeodomény zmiňované v obr. 6 (str. 17). Typická pro něj je přítomnost dvou navzájem na sebe kolmých  $\alpha$ -helixů propojených čtyřmi aminokyselinami dlouhou  $\beta$ -otočkou (obr. 8, str. 19). Vazba na DNA je v tomto případě zprostředkována druhým z  $\alpha$ -helixů, který se váže do oblasti velkého žlábků. Struktura tohoto motivu bývá často stabilizována přítomností dalších  $\alpha$ -helixů v jejím okolí, které společně tvoří hydrofobní jádro<sup>22</sup>.



Obr. 8: Struktura komplexu homeodomény s DNA. Červeně je vyznačen motiv helix-turn-helix<sup>22</sup>

Jiný způsob vazby na DNA umožňuje motiv zvaný leucinový zip. Strukturu DNA vázající domény proteinů patřících do této rodiny lze rozdělit na dvě části: dimerizační oblast a DNA vázající oblast. Každá ze dvou podjednotek tohoto motivu sestává z jednoho přibližně 60 AK dlouhého  $\alpha$ -helixu (obr. 9a). Oblast na jeho C-konci slouží k dimerizaci zatímco N-koncová část obsahuje jako každou osmou aminokyselinu (tedy přibližně jednou za dvě otočky) leucin nebo jinou bazickou AK a slouží k vazbě na DNA. Dimerizační oblast hydrofobními interakcemi drží podjednotky pohromadě a z ní vycházející leucin obsahující části se vážou na DNA v místě velkého žlábkku. Každá z podjednotek váže dvoušroubovici z jedné strany a nasedá na svou polovinu cílové sekvence<sup>22</sup>. Modifikací tohoto motivu je motiv zvaný helix-loop-helix (obr. 9b), u kterého jsou části zodpovídající za dimerizaci a za vazbu na DNA odděleny smyčkou<sup>23</sup>. Tato úprava dává motivu větší flexibilitu a umožňuje tak vazbu i na hůř přístupném místě DNA<sup>22</sup>.



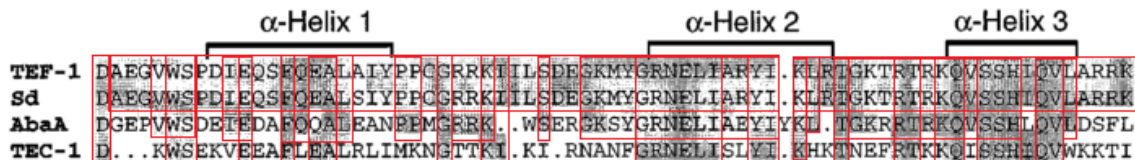
Obr. 9: Struktury komplexů motivů leucinový zip (a) a helix-loop-helix (b) s DNA<sup>22</sup>

Kromě těchto nejobvyklejších motivů se vyskytuje ještě mnoho dalších (obr. 6, str. 17), z nichž každý také má svou typickou strukturu a v ní oblast, pomocí které dochází k interakci s DNA. Jedním z nich je i TEA doména, která byla připravována v této práci.

### 1.3. TEAD rodina transkripčních faktorů

TEAD je rodina eukaryotických transkripčních faktorů, které sdílejí evolučně konzervovanou DNA vazebnou TEA doménu. První protein patřící do této rodiny (TEAD1) byl objeven ve vazbě na enhancer viru SV40 z lidských HeLa buněk<sup>24</sup>. Odtud pochází i zkratka jeho názvu – „transcriptional enhancer activator domain“, tedy protein, který nasedá na enhancer a dokáže aktivovat transkripci<sup>25</sup>.

72 aminokyselin velká TEA doména bývá nazývána také ATTS podle prvních písmen názvů proteinů, ve kterých byla nejdříve nalezena<sup>26</sup>. Patří mezi ně protein AbaA, který reguluje vývoj nepohlavních spor u *Aspergillus nidulans*, Tec1 nalezený u kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*, lidský TEF-1, což je původní název pro TEAD1 (z anglického „transcriptional enhancer factor“) a protein Scalloped, který se účastní vývoje křídel, nervového systému a smyslových orgánů u drosophily<sup>27,28</sup>. Tyto čtyři proteiny jsou zároveň příkladem evoluční konzervovanosti TEA domény a porovnání jejich aminokyselinových sekvencí je vidět na obrázku 10<sup>28</sup>.



Obr. 10: Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinů TEF-1, Scalloped, AbA a Tec1. Zvýrazněny jsou konzervované oblasti a oblasti, které v sekundární struktuře budou tvořit α-helixy<sup>28</sup>.

#### 1.3.1. Savčí TEAD proteiny

U savců jsou známy čtyři strukturně velmi podobné proteiny patřící do TEAD rodiny transkripčních faktorů – Tead1, Tead2, Tead3 a Tead4. Všechny čtyři mají na N-konci prakticky identickou DNA vazující doménu. Tead2 jí má ze 100 %, Tead3 z 99 % a Tead4 z 94 % shodnou s Tead1. Zbylé části proteinu vykazují mezi jednotlivými homology shodu v sekvenci okolo 70 % a to převážně v C-koncové oblasti (obr. 11, str. 21)<sup>29</sup>. Všechny TEAD proteiny také vážou stejné sekvence na DNA<sup>29</sup>.

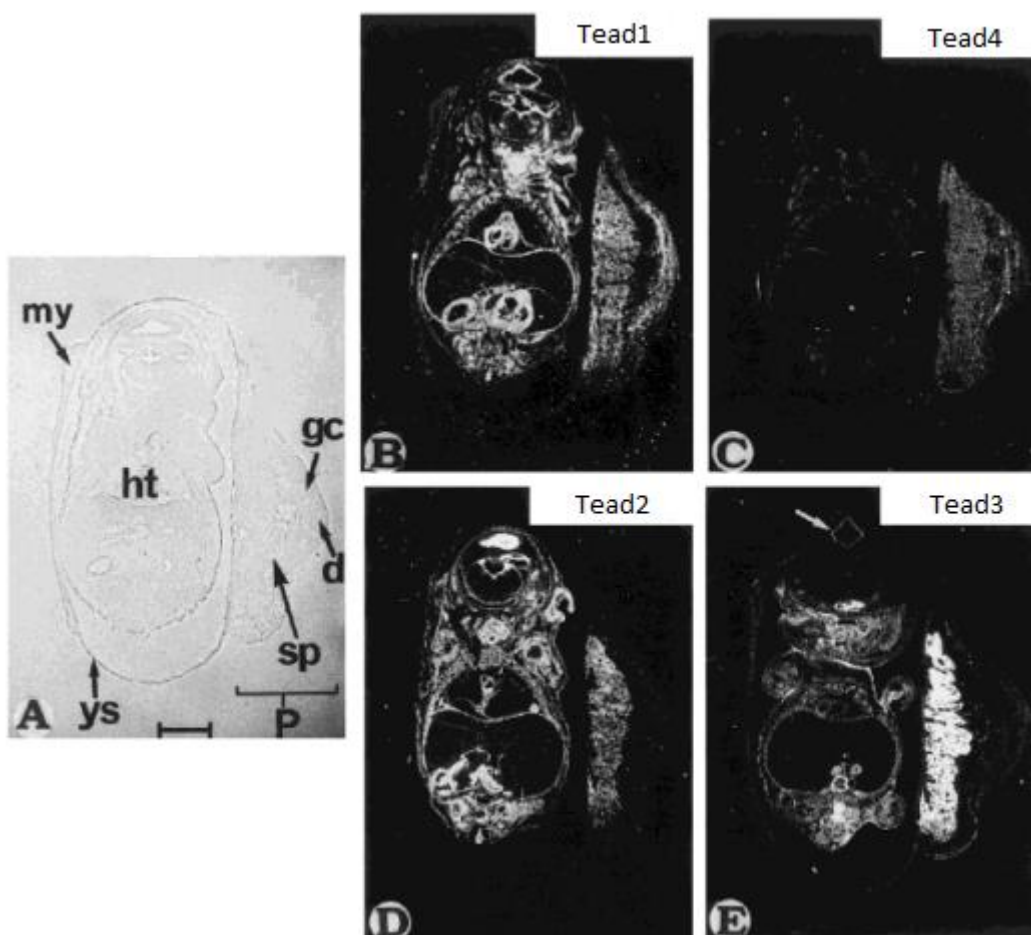
				DNA vázající TEA doména				90			
1	mTEAD1	IEPSS	WGSSESP	AENMERM	SDSADKPIDN	DAEGV	WSPDIEQSFQEALAI	YPPCGRRKIILSDEG	KMYGRNELIARIYIKL		
	mTEAD2	MGDPRTGAPLDDGGG	+T+++EG	S+EGTGG	+EGVGGDGGSP	+++++	+++++	+++++	+++++		
	mTEAD3	+ASN+	+TANS+	G+AR+DG	+EGL+G+++	+++++	+++++	+++++	+++++		
	mTEAD4	+TSNE	++SPD++EGSSISGG	+QAL+++++		+++++	+++E+R+++++	+++++TE++	+++++H+++		
91	mTEAD1	RTGKTRTRKQVSSHI	QVLARRK	SRDFHSKL	K	DOTAKDKALQ	HMAAMSSAQIVSATA	IHNKLGLPG	IPRPT	FPGGPGFWPGMIQTG	180
	mTEAD2	+++++	+++++	++EIQ+++	+	++V++++F+	T++T++++LI++PS	LQA+++PS+	+Q	ATELFQ+++S+S	S+
	mTEAD3	+++++	+++++K+	V+EYQVGI	+AMNL++VS+++++	S++S+++++SV	LQ++FSP+SPL+QAV	+SSSSR++SSPPLL+			
	mTEAD4	+++++	+++++	A+EIQA++	+	++A+N++++	S++++++++++	F+S+ML+AR	GP	G	Y+AIS+++Q+ALP
181	mTEAD1	Q	PGSSQDVKPFVQQ	AYPIQPAVTAPIP	GFEPTSAPAPS	VPAWQGRSIGTT	KLRLVEFSAFLEQQR	DPDSYNKHLFVHIGH			270
	mTEAD2	P	+WNVP++++S+A	PFSVSLT+PAS	DL+	+Y++PPALS+LPPP	APSP++++A+AL++A	R+Q+I++++V+PPD	AV++PQR+++++SQ		
	mTEAD3	+Q++P+++I+++A+P		+++++PLPPALN	SY+SLAPL+AAASA	TASA++++D+T+ASS	R+++L+Y+++M+V++	+++T+S+++++Q			
	mTEAD4	++T+H++++S+N		T++V++PL	+L+	+++SPAG+T++PS	APLA+P+++++ASS	++WML+++++R+Q	+++T+++++SQ		
271	mTEAD1	ANHSYSDPLESVDI	RQIYDKFPEKKGGLK	ELFGKGPQNAFFLVK	FWADLNC	NIQDDA	GAFYGVSSQY	ESSENMTVTCST			360
	mTEAD2	QCP+PGA+P++++V	+++++R	++YDR++PH+++++		+++++WGPSAEEAG	SSGGG+G+++++	++R+L++L+++S	+++		
	mTEAD3	T+PAF+++P++A+V	+++++Y	++YE+++P+++++		+++++S	T+EGP	+++++S+ADS++ISV+++	+++		
	mTEAD4	SSP++++Y+++T+++	+++++Y	+++ER++S+++++		+++++T	++D+EG	S+++++	++P+++II+++	+++	
361	C-terminální doména									450	
	mTEAD1	SFGKQVVEKVETEYA	RFENGRFVYRINRSP	MCEYMINFIHKLKHL	PEKYMMSVLENFTI	LLVVTNRDTQETLLC	MACVFEVSNSEHGAQ				
	mTEAD2	+++++R+	QL+D++++LL+++	+++LV++L+++RQ+	++R+++++	+Q+++++L+++	T+Y++++T+R+++				
	mTEAD3	+++++H+++	+L+++++H+++	+++++H+++	+++++H+++	+Q+++S++S++++V	I+F++++T+++++				
	mTEAD4	+++++H+++	+Y+++HYL+++H+++	L+++++H+++	+++++H+++	+Q+++++H+++	I+Y++++A+++++				
451	Počet aminokyselin										
	mTEAD1	HHIYRLVKD								426	
	mTEAD2	Y+++++R+								445	
	mTEAD3	++V+K++++								439	
	mTEAD4	+++++E								427	

Obr. 11: Porovnání sekvencí myších Tead proteinů. Aminokyseliny, které jsou na dané pozici shodné s Tead1 jsou vyznačeny jako +<sup>29</sup>.

Jednotlivé TEAD proteiny se od sebe liší hlavně tím v jaké tkáni a v jaké fázi vývoje jsou exprimovány. V podstatě v každé tkáni je exprimován alespoň jeden z *TEAD* genů a právě místo jejich výskytu je jedním z důležitých znaků potřebných ke zjištění jejich funkce<sup>30</sup>. Nejvíce je funkce jednotlivých TEAD proteinů prozkoumána u jejich myších homologů, které se od těch lidských liší jen minimálně (myši Tead1 se od lidského liší ve třech aminokyselinách)<sup>29</sup>. Přestože v některých případech plní několik Tead proteinů stejnou funkci, každý z nich je v určité fázi vývoje organismu nenahraditelný<sup>31</sup>.

Expres *Tead1* byla u dospělých myší zjištěna v různém množství v mnoha tkáních a orgánech, mezi které patří plíce, srdce, ledviny, játra, mozek nebo kosterní svalstvo<sup>30</sup>. Z lidských buněčných linií byl přítomen v rakovinových buňkách děložního čípku, vaječníku, střev, mozku, v leukemických buňkách a v buňkách ledvin a placenty. Jeho exprese naopak nebyla zjištěna u lidských rakovinových jaterních buněk<sup>28</sup>. Důležitou funkci tento protein zastává také během vývoje, kdy reguluje růst srdečního svalu. Myší embrya, která měla gen pro *Tead1* poškozený, umírala ještě před narozením na srdeční defekty<sup>32</sup>. Tead1 je totiž jediným proteinem z TEAD rodiny, jehož gen je u embryí exprimován

v myokardu<sup>28</sup>. Zároveň se Tead1 během vývoje podílí i na růstu kosterního svalstva, vývoji nervového systému, ledvin a dýchacího ústrojí (obr. 12). Jeho funkce může být v některých případech nahrazena jinými proteiny z TEAD rodiny, ale úplně vždy to možné není (např. právě u vývoje srdečního svalu)<sup>28,33</sup>.



Obr. 12: Porovnání exprese jednotlivých Tead proteinů v různých tkáních během vývoje myšího embrya (13. den). A – histologický řez (P: placenta, my+d: buňky dělohy, ht: srdce, gc: buňky trofoblastu, ys: žlutkový váček), B-E – po označení hybridizačními sondami pro jednotlivé Tead proteiny<sup>34</sup>

Tead2 je jako jediný z TEAD rodiny exprimován už od brzkého embryonálního stádia (jeho mRNA byla nalezena ve dvoubuněčném myším embryu)<sup>30</sup>. Do osmého dne vývoje je exprimován téměř po celém embryu a podílí se hlavně na vývoji mozku, později jeho množství v organismu klesá a objevuje se jen v některých tkáních, mezi které patří právě mozek, ledviny, plíce nebo střevo (obr. 12)<sup>28,35</sup>. U dospělých jedinců je *Tead2* exprimován v mnohem menší míře, než u embryí<sup>35</sup>. U myší byl nalezen v buňkách mozku, plic a vaječnících<sup>30</sup>. Z lidských buněčných linií byla exprese *TEAD2* zjištěna hlavně v buňkách

vaječniku a dále pak v menší míře v mozku, ledvinách, střevě a v placentě<sup>28</sup>. Tead1 může z počátku vývoje nahradit funkci Tead2. Myší embrya s porušeným *Tead2* genem se vyvíjejí normálně, i když je u nich výrazně zvýšená šance, že se narodí s poruchou mozku<sup>35</sup>. Pokud ale mají porušený zároveň i *Tead1*, umírají ještě před narozením a mají řadu vážných vývojových vad (horších než u těch, které mají porušený pouze *Tead1*)<sup>33</sup>.

Tead3 byl z TEAD proteinů objeven jako poslední. U lidí i u myší je exprimován hlavně v placentě, kde se váže na enhancer genu pro choriový somatomammotropin a ovlivňuje diferenciaci buněk. V embryu se objevuje až v pozdějších fázích vývoje a to v nervových a svalových buňkách (obr. 12, str. 22)<sup>34</sup>. U dospělých myší byl nalezen v buňkách téměř všech orgánů (plíce, srdce, ledviny, střeva, játra... ), ale například i ve svalových buňkách kosterního svalstva<sup>36</sup>.

Nejdůležitější rolí proteinu Tead4 je jeho vliv na diferenciaci buněk trofoektodermu na počátku vývoje embrya. U myších embryí, která měla *Tead4* gen porušený, k diferenciaci vůbec nedošlo. Pokud ale k porušení *Tead4* dojde až později (když už je trofoektoderm diferenciován), vyvíjí se embryo normálně<sup>31</sup>. V pozdějších fázích vývoje a v dospělosti je u myší *Tead4* exprimován hlavně v buňkách kosterního svalstva a v plicích (obr. 12, str. 22)<sup>28,36</sup>. V lidských buněčných liniích byla zjištěna jeho exprese v mnoha různých tkáních (rakovinné buňky jater, děložního čípku, mozku, vaječníků, leukemické buňky a kmenové buňky ledvin a střev)<sup>28</sup>.

### 1.3.2. Struktura TEAD proteinů

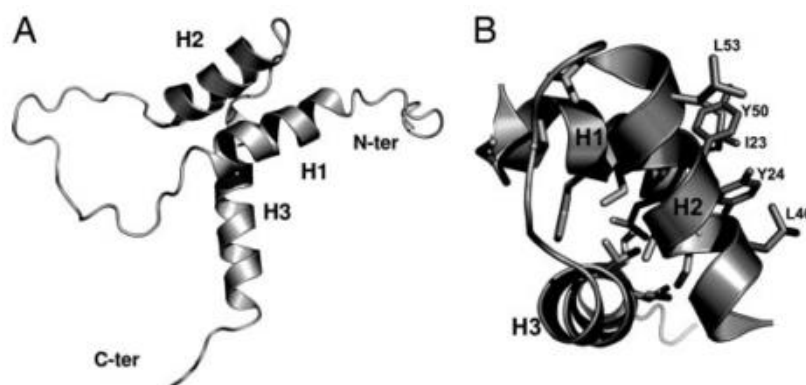
U žádného z proteinů patřících do TEAD rodiny nebyla zatím vyřešena struktura celého proteinu. Všechny čtyři savčí TEAD proteiny sdílí na svém N-konci stejnou DNA vázající TEA doménu a na C-konci transaktivační doménu, pomocí které se na ně vážou jejich koaktivátory a struktura těchto dvou domén již známa je (obr. 13)<sup>37</sup>.



Obr. 13: Doménová struktura TEAD proteinů<sup>37</sup>

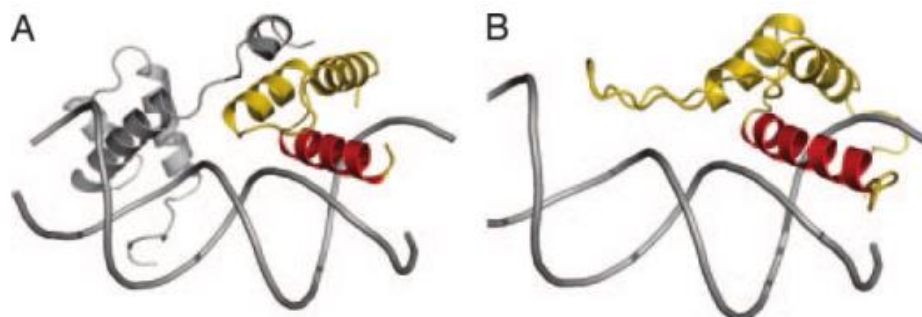
### 1.3.2.1. TEA doména

Struktura TEA domény byla řešena pro lidský protein TEAD1 pomocí NMR a rentgenové krystalografie. Z NMR analýzy vyplývá, že TEA doména je globulární protein, skládající se ze třech  $\alpha$ -helixů propojených dvěma  $\beta$ -smyčkami a nestrukturovanými oblastmi. První dva helixy jsou vůči sobě téměř antiparalelní a společně se třetím stabilizují strukturu proteinu hydrofobními interakcemi (obr. 14). Třetí  $\alpha$ -helix a oblast, která mu těsně předchází, jsou tou částí TEA domény, pomocí které se váže na DNA. Pro vazbu na DNA je důležitá také část smyčky spojující helixy 1 a 2<sup>38</sup>. V březnu 2016 byla publikována také částečná krystalografická struktura TEA domény (bez smyčky spojující helixy 1 a 2), která potvrzuje sekundární strukturu vyřešenou pomocí NMR a zdůrazňuje důležitost smyčky mezi helixy 1 a 2 pro vazbu na DNA<sup>39</sup>.



Obr. 14: Struktura TEA domény. A – stužkový diagram, B – se zobrazenými hydrofobními AK zbytky<sup>38</sup>

Ze známých DNA vazebných domén transkripčních faktorů se TEA doména nejvíce podobá homeodoméně a patří tedy mezi helix-turn-helix domény (obr. 15). Od ostatních homeodomén se TEA doména liší hlavně v primární struktuře a DNA sekvenci, kterou selektivně váže<sup>38</sup>.



Obr. 15: A – nejbližší strukturní homolog TEA domény (homeodoména MatA1) ve vazbě na DNA, B – model komplexu TEA domény s DNA (vytvořený podle A a dat získaných z NMR analýzy)<sup>38</sup>



#### 1.3.2.1.1. Vazebný motiv

Jak už bylo řečeno, poprvé byl TEAD1 nalezen ve vazbě na enhancer viru SV40 v lidských HeLa buňkách a to konkrétně na sekvenci zvanou GT-II motiv<sup>24</sup>. Z tohoto motivu je pro vazbu TEAD proteinů důležitá sekvence 5'-TGG AATGT-3'<sup>38</sup>.

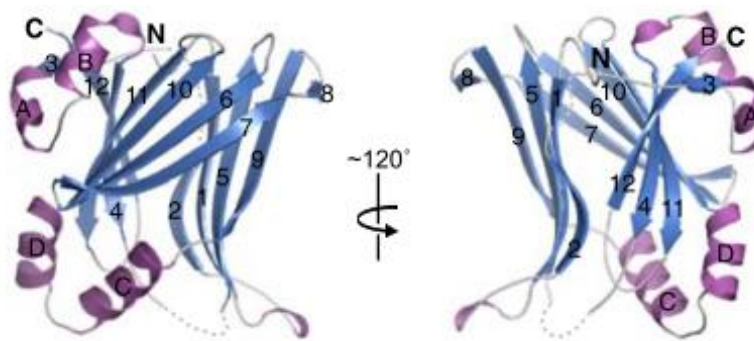
Další vazebnou sekvencí pro TEAD proteiny jsou takzvané M-CAT elementy, jejichž název vychází z anglického „muscle cytosine, adenine, thymine“<sup>40</sup>. Tyto motivy se vyskytují v promotorových nebo enhancerových regionech mnoha genů, které jsou specificky exprimovány ve svalových buňkách hladkého i kosterního svalstva. Patří mezi ně například srdeční troponin T,  $\alpha$ -aktin nebo těžký řetězec  $\beta$ -myosinu. M-CAT elementy se dají nalézt i v genetické informaci jiných než svalových buněk a to například v promotoru genů pro choriový somatomammotropin nebo FOXA2. Sekvence potřebná pro vazbu TEAD proteinů na tyto elementy je 5'-CAT TCC-3' a v promotorech některých genů se vyskytuje i vícekrát. V takovém případě, pokud to dovolí vzdálenost M-CAT elementů od sebe, se TEAD proteiny vážou na oba tyto elementy kooperativně ve formě dimeru<sup>27</sup>.

Byla také nalezena obecná sekvence, ke které má nejvyšší afinitu izolovaná TEA doména a to 5'-N, ne C, G, ne G, A, T, N, T-3', kde N může být kterákoliv z bází<sup>38</sup>.

#### 1.3.2.2. Transaktivační doména

TEAD proteiny samy o sobě nejsou schopny aktivovat transkripci<sup>41</sup>. Postrádají totiž aktivační doménu, pomocí které by mohly interagovat s obecnými transkripčními faktory nebo s enzymy remodelujícími chromatin. K aktivaci transkripce proto využívají koaktivátory, což jsou proteiny, které sice mají aktivační doménu, ale nejsou schopny vazby na DNA. Transaktivační doména TEAD proteinům slouží právě ke zprostředkování vazby s koaktivátory a tím i k tvorbě heterodimeru sloužícího jako funkční transkripční faktor<sup>37</sup>.

Struktura transaktivační domény TEAD proteinů byla zatím vyřešena pro TEAD 1, 2 a 4. Ve všech případech se skládá ze dvou  $\beta$ -skládaných listů, z nichž jeden je složený z pěti a druhý ze sedmi vláken, uspořádaných do struktury podobné imunoglobulinu. Kromě toho obsahuje ještě dva helix-turn-helix motivy (obr. 16, str. 26)<sup>42-44</sup>.



Obr. 16: Struktura transaktivační domény proteinu TEAD4

### 1.3.3. Koaktivátory

Bylo nalezeno několik proteinů, které ovlivňují expresi svých cílových genů skrze vazbu na TEAD. Patří mezi ně YAP, TAZ, Vgll a koaktivátor nukleárních receptorů p160.

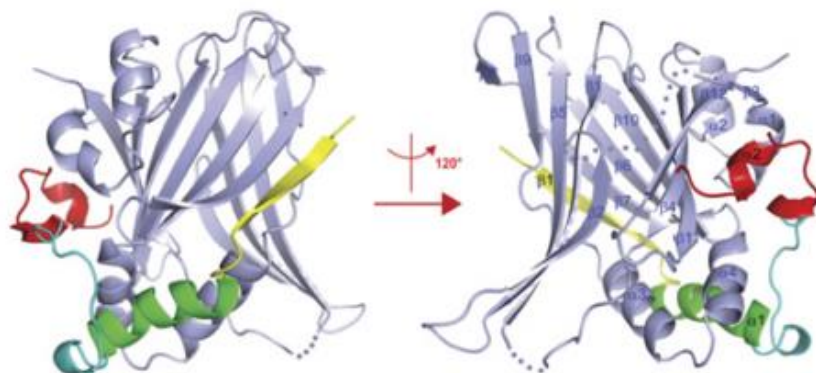
#### 1.3.3.1. YAP

Jako první byl z koaktivátorů savčích TEAD proteinů objeven YAP, jehož název je zkratkou anglického „YES-associated protein“, protože původně byl nalezen ve vazbě na tyrosin kinasu YES<sup>45</sup>. Ze všech známých koaktivátorů TEAD proteinů, je právě YAP tím nejdůležitějším pro jejich správnou funkci při regulaci růstu a diferenciaci během vývoje. Stejně jako TEAD je i YAP evolučně konzervovaný napříč eukaryotickými organismy<sup>46</sup>. Množství proteinu YAP dostupného pro vazbu na TEAD je limitujícím faktorem pro míru exprese mnoha TEAD proteiny ovlivněných genů. Nadměrná exprese *YAP* genu v buňce násobně zvýší expresi TEAD proteiny regulovaných genů na rozdíl od nadměrné exprese *TEAD* genů, která takový vliv nemá (zvýší se sice množství proteinu TEAD, ale není dostatek YAP)<sup>45,47</sup>. Myší embrya s porušeným *Yap* genem navíc mají stejné vývojové defekty jako ta s porušeným *Tead1* a zároveň *2*<sup>33</sup>.

YAP se váže na transaktivační doménu TEAD proteinů pomocí domény na svém N-konci. Tato doména je v nepřítomnosti proteinu TEAD v nestrukturovaném stavu<sup>42</sup> a při vytvoření komplexu utvoří dva  $\alpha$ -helixy a jedno  $\beta$ -vlákno, pomocí kterých pak interaguje s transaktivační doménou TEAD proteinů na třech rozhraních (obr. 17, str. 27). Modifikace některého z těchto míst vede k oslabení vazby na TEAD nebo k jejímu úplnému zabránění<sup>43,44</sup>.

K ovlivnění míry exprese proteinem YAP, a přes něj i TEAD, regulovaných genů využívá YAP aktivační doménu s PDZ motivem, která se nachází na jeho C-konci<sup>48</sup>.

Kromě ní obsahuje v závislosti na isoformě ještě jednu až dvě WW domény, které slouží k interakci s dalšími proteiny<sup>49</sup>. Způsob, jakým ovlivňuje transkripci, byl zatím částečně prozkoumán pouze u proteinu Yorkie, což je homolog proteinu YAP u drosophily, který interaguje s chromatin remodelujícími proteiny Gaf a Brahma a s mediátorovým komplexem<sup>50</sup>.



Obr. 17: Struktura komplexu transkripční domény TEAD proteinů (šedá) s TEAD vázající doménou proteinu YAP (barevná)<sup>43</sup>

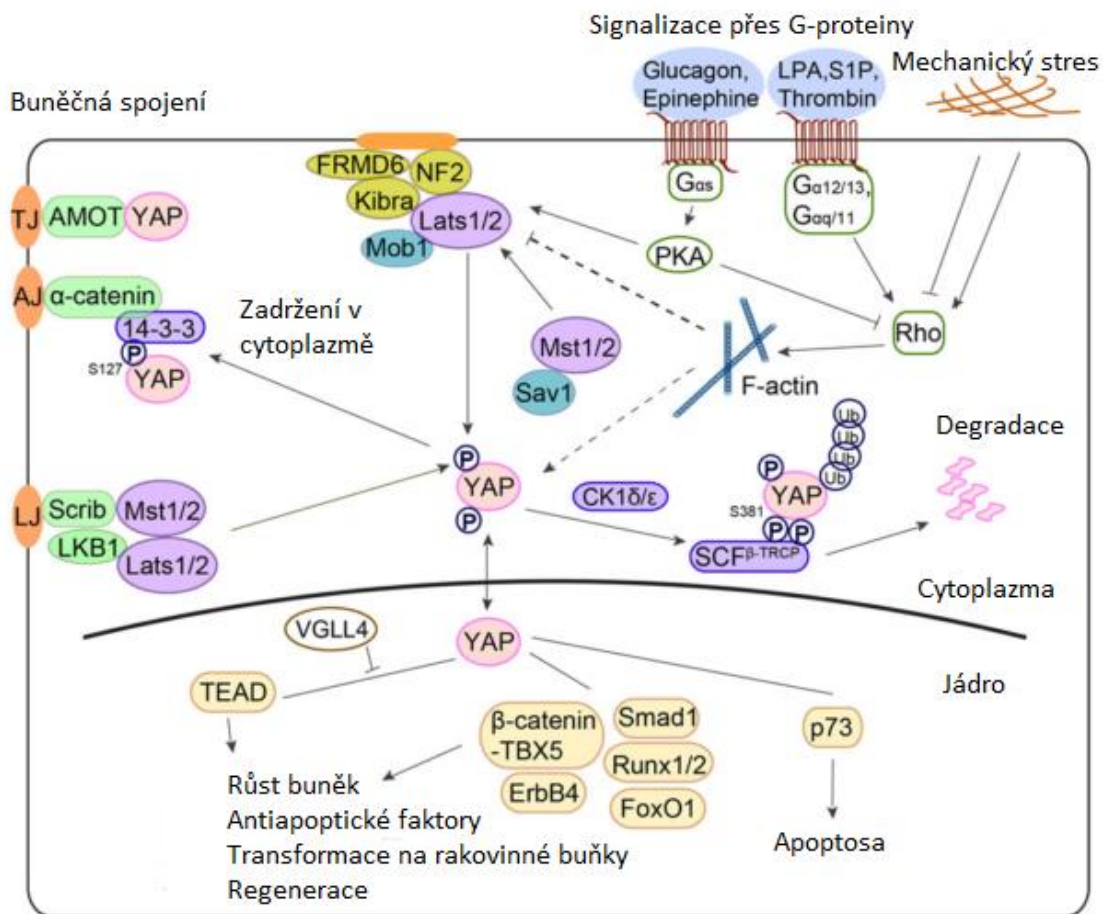
Přestože TEAD a YAP potřebují jeden druhého k aktivaci transkripce, je ve většině dospělých diferenciovanych buněk TEAD přítomen v jádře, zatímco YAP je vázán v cytoplazmě na proteinu 14-3-3<sup>45</sup>. Vazba proteinu YAP na 14-3-3 a tím i aktivita jeho partnera, proteinu TEAD, je regulována signalizací přes evolučně konzervovanou Hippo signalizační dráhu, jejímž je TEAD posledním článkem (obr. 18, str. 28)<sup>51</sup>.

Když je tato signalizační dráha aktivní, jsou signály z vně buňky přenášeny na dvojici centrálních kinas této dráhy, MST1 a 2. MST1/2 poté fosforyluje další dvojici kinas, a to LATS1 a 2<sup>52</sup>. LATS1/2 nakonec fosforylují YAP na serinu 127, čímž vytvoří vazebné místo pro 14-3-3<sup>53</sup>. Pokud Hippo dráha aktivní není, YAP zůstává nefosforylovaný, na 14-3-3 se neváže a může vstoupit do jádra a interagovat s některým z TEAD proteinů. Další možností regulace množství proteinu YAP dostupného pro vazbu na TEAD je jeho fosforylace na serinu 381, která umožní jeho další fosforylaci kasein kinasou 1, což způsobí následnou ubiquitinaci a degradaci<sup>54</sup>.

### 1.3.3.2. TAZ

Protein TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) je homologem proteinu YAP (shoda v primární sekvenci je 45 %)<sup>55</sup>. Stejně jako YAP se váže na všechny čtyři

TEAD proteiny, i když ne ke všem má stejnou afinitu, pomocí domény na svém N-konci, která je téměř shodná s TEAD vázající doménou proteinu YAP<sup>56</sup>. Jediným rozdílem ve struktuře TEAD vázající domény těchto dvou proteinů je délka smyčky spojující oba  $\alpha$ -helixy<sup>44</sup>. I zbytek doménové struktury proteinu TAZ je velmi podobný proteinu YAP. Na C-konci má aktivační doménu s PDZ motivem, podle které byl pojmenován, a obsahuje i WW doménu. Zároveň regulace přítomnosti proteinu TAZ v jádře probíhá také přes Hippo signální dráhu, jejímž vlivem je TAZ fosforylován na serinu 89 a následně zadržen v cytoplazmě na proteinu 14-3-3<sup>55</sup>.



Obr. 18: Hippo signální dráha. Šipka naznačuje aktivaci, rovné zakončení inhibici. Přerušovanou čarou je vyznačen vztah, který zatím nebyl dostatečně prozkoumán<sup>57</sup>.

Přestože jsou si proteiny YAP a TAZ velmi podobné, jejich funkce v organismu úplně stejná není. Důkazem je například studie prováděná na myších embryích, která, v případě že měla nefunkční *Yap*, umírala v počáteční fázi vývoje, zatímco ta s porušeným *Taz* genem se dožila narození, ale brzy zemřela na glomerulocystickou poruchu ledvin<sup>33</sup>.

### 1.3.3.3. VGLL

Vestigial-like proteiny dostaly svůj název proto, že sdílejí stejnou Vg doménu s proteinem Vestigial, který u drosophily společně se svým partnerem Scalloped (homolog TEAD proteinů) reguluje růst křídel. Jako Vg u drosophily, tak i Vgll u obratlovců využívají svou Vg doménu právě k vazbě na TEAD<sup>58</sup>. Po navázání vytváří VGLL s TEAD proteiny velmi podobný komplex jako s nimi vytváří YAP a to i přes to, že jejich primární struktury jsou odlišné<sup>59</sup>. VGLL dokonce dokáže inhibovat vznik komplexu YAP/TEAD tím, že s ním soupeří o vazbu na stejné místo na transaktivační doméně TEAD proteinů<sup>59,60</sup>. Přestože VGLL prokazatelně aktivuje transkripci některých TEAD proteiny regulovaných genů, nebyla v jeho struktuře nalezena žádná aktivační doména<sup>37</sup>. Na rozdíl od proteinů YAP a TAZ také není přítomnost VGLL v jádře regulována Hippo dráhou.

### 1.3.4. Cílové geny a jejich funkce

TEAD proteiny, jak už bylo řečeno výše, se uplatňují v organismu hlavně v období jeho růstu a vývoje. Mezi cílové geny transkripčních faktorů TEAD tak patří převážně faktory, které podporují proliferaci buněk, ovlivňují jejich diferenciaci a brání apoptose<sup>51,61</sup>. S růstem souvisí i další dvě velké skupiny cílových genů TEAD proteinů. Jednou z nich jsou geny kódující proteiny typicky produkované ve svalech a to jak v kosterním svalstvu, tak i v hladkém svalstvu stěn cév nebo v srdečním svalstvu, kde se mohou i v dospělosti podílet na regeneraci po poškození<sup>62,63</sup>. Do druhé skupiny potom patří geny, jejichž zvýšená exprese byla zaznamenána u rakovinných buněk a bývá spojována s jejich rychlým růstem, tvorbou metastáz nebo s rezistencí na léčbu chemoterapií<sup>64,65</sup>.

Mezi jedny z prvních objevených cílových genů transkripčních faktorů TEAD způsobujících proliferaci buněk patří *CYR61*<sup>64,66</sup> a *CTGF* (connective tissue growth factor)<sup>51,67</sup>. Oba tyto proteiny patří do stejné rodiny extrabuněčných faktorů ovlivňujících proliferaci, migraci a adhezi buněk a oba také způsobují rezistenci na chemoterapeutikum taxol u rakoviny prsu<sup>68</sup>. Dalším genem, jehož expresi TEAD proteiny aktivují, je *AXL*, tyrosin kinasa podporující růst, tvorbu metastáz a bránící apoptose<sup>69</sup>. Mnoho dalších genů ovlivněných některým z TEAD proteinů má také schopnost zvýšit rychlost růstu a dělení buněk. V rakovinných buňkách ledvin jsou to například *EDN1/2*, které jsou aktivní i během vývoje ledvin a *C-MYC*, jehož zvýšená hladina byla zaznamenána i u mnoha dalších typů rakoviny<sup>64</sup>. V myších buňkách rakoviny jater také byla nalezena řada genů

zvyšujících proliferaci, jejichž exprese je zvýšena vlivem některého z Tead transkripčních faktorů a to *Ki67*, *Sox4*, *H19* a *Afp*<sup>70</sup>. U rakoviny prsu je TEAD proteiny regulován gen *RHAMM* (receptor for hyaluronan mediated motility), který se váže na mitotické dělicí vřetenko a podporuje tvorbu metastáz<sup>71</sup>. Během vývoje embrya ovlivňuje Tead v nervových progenitorových buňkách jejich růst tak, že zvyšuje expresi *Cyklinu D1*, který zrychluje buněčný cyklus a zároveň inhibuje expresi *NeuroM*, čímž zabraňuje jejich předčasné diferenciaci<sup>47</sup>. Podobným způsobem uplatňuje Tead svůj vliv na buněčný cyklus i přes Cyklin dependentní kinasu 6<sup>72</sup>.

K podpoře proliferace buněk slouží i další skupina proteinů, jejichž množství produkované buňkou je regulováno přes transkripční faktory z TEAD rodiny. Jsou to proteiny schopné zabránit apoptose inhibicí Caspas 3, 7 nebo 9<sup>73</sup>. Patří mezi ně například *Birc2*, *Survivin*, *Mcl1*<sup>70</sup>, *LIVIN*<sup>73</sup> nebo *NAIP*<sup>74</sup>.

Jak bylo právě zmíněno na příkladu *NeuroM*, netýká se role TEAD proteinů během vývoje embrya pouze růstu buněk, ale i jejich diferenciaci. Ve stadiu blastocysty například spouští Tead4 v okrajových buňkách transkripci *Cdx2* a *Gata3*, což jsou transkripční faktory, které pak dále spouštějí transkripci genů typických pro trofoektoderm a způsobí tak jeho diferenciaci<sup>75,76</sup>. Podobný účel má také *Pax3*, transkripční faktor důležitý pro správný vývoj mozku a některých svalů<sup>61</sup>.

Zatímco v některých případech TEAD diferenciaci buněk napomáhá, v jiných jí naopak brání expresí genů zodpovědných za udržení buněk ve stavu kmenových buněk. Takovým genem je například *SOX9*, transkripční faktor, jehož zvýšená hladina v nádorových tkáních vede k tvorbě metastáz a je spojená se špatnou prognózou vývoje stavu pacienta<sup>77</sup> nebo geny *Oct3* a *Oct4*, které bývají využívány jako markery typické pro kmenové buňky<sup>78</sup>.

Právě vliv TEAD proteinů a jejich koaktivátorů na růst buněk, diferenciaci a apoptosu je důvodem toho, proč při jejich deregulaci může velmi snadno dojít ke vzniku rychle se množících rakovinných buněk. V nádorové tkáni bývá často zjištěna zvýšená exprese TEAD proteiny regulovaných genů<sup>37</sup>. Tyto geny mohou kromě zvýšené proliferace způsobovat také resistenci na léčbu chemoterapií, jako tomu je u výše zmíněných *CTGF* a *CYR61* v případě rakoviny prsu<sup>68</sup> nebo *ABCB1* a *GSK3A* u rakoviny vaječníků<sup>65</sup>. V některých rakovinných buňkách TEAD proteiny navíc fungují i jako represory genů pro tumor supresory jako jsou například *DDIT4* a *TRAIL*<sup>79</sup>.

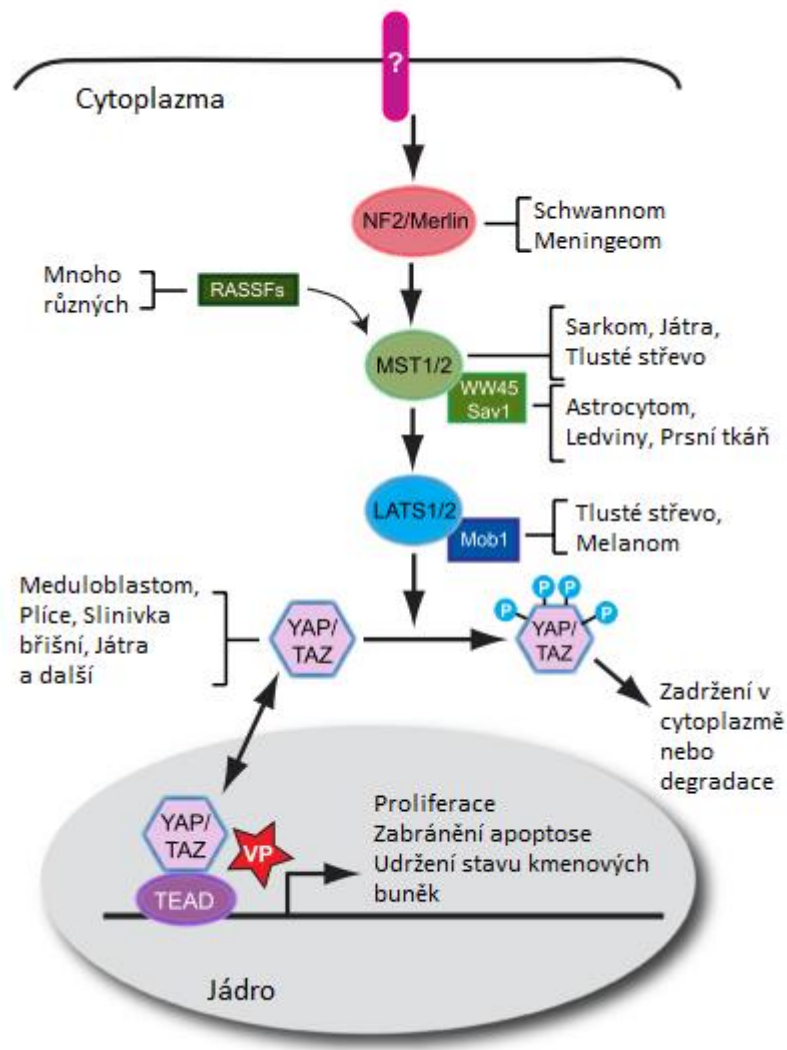
Poslední skupinou cílových genů TEAD proteinů jsou geny typicky exprimované

ve svalových buňkách. TEAD je nezbytný pro správný vývoj srdečního svalu a mezi jím ovlivněné geny patří například geny kódující těžké řetězce srdečního myosinu  $\alpha$  i  $\beta$ <sup>80,81</sup>, transkripční faktor Myocardin, potřebný k aktivaci exprese řady dalších svalových genů<sup>63</sup> nebo *Fgfr4*, který se účastní nejen vývoje, ale i regenerace svalů a je exprimován v reakci na zranění<sup>82</sup>. Regenerace se účastní i další proteiny, jejichž exprese je regulována přes TEAD, a to například *VEGFA* při obnovování prostoupení svalu cévami po ischemii<sup>83</sup> nebo *Ankrd1*, který je exprimován u myši s atrofí svalů a napomáhá udržení svalové hmoty<sup>62</sup>.

### 1.3.5. Souvislost TEAD proteinů a nádorových onemocnění

V předchozí kapitole byla zmíněna řada genů, jejichž expresi TEAD proteiny společně se svými koaktivátory aktivují, které slouží k regulaci růstu a diferenciaci buněk nebo brání apoptose. Tyto vlastnosti jsou velmi důležité pro správný vývoj organismu, ale zároveň jsou pro něj hrozbou, pokud dojde k poruše regulace jejich aktivity. Rychlé dělení, blokace systému signálů vedoucích k apoptose a vlastnosti podobné kmenovým buňkám totiž patří mezi typické atributy rakovinných buněk. Není proto nijak překvapivé, že některé z koaktivátorů TEAD proteinů, konkrétně YAP a TAZ, patří zároveň mezi onkoproteiny<sup>37</sup>.

Nadměrná exprese a nukleární lokalizace proteinu YAP byla zjištěna v mnoha typech rakovinných buněk, mezi které patří nádorové buňky plic, jater, ledvin, prsu, střev nebo vaječníků<sup>57</sup>. K takové situaci může dojít hned z několika důvodů. Jedním z nich je porucha Hippo signalizační dráhy, která v organismu za normálního stavu zodpovídá za regulaci velikosti orgánů tak, že fosforyluje YAP na S127 a zadržuje ho v cytoplazmě ve vazbě na 14-3-3<sup>70</sup>. Pokud dojde k porušení některého článku v jejím signalizačním řetězci (obr. 19, str. 32), nemůže být YAP fosforylován a přesouvá se do jádra, kde interaguje s TEAD proteiny a spouští transkripci svých cílových genů, což vede ke zvýšenému růstu orgánů a nakonec až k tvorbě nádorů<sup>84</sup>. Druhou možností pak je amplifikace samotného *YAP* genu, což způsobí i zvýšení množství proteinu YAP. Amplikon oblasti chromosomu 11q22, ve které se *YAP* nachází, byl nalezen v nádorových buňkách ledvin a prsu<sup>85,86</sup>.



Obr. 19: Nádorová onemocnění vzniklá poruchou některého z článků Hippo signální dráhy<sup>52</sup>

Deregulace proteinu YAP může nejen způsobit vznik rakoviny, ale navíc i výrazně zhoršuje průběh tohoto onemocnění. U rakoviny prsu a melanomu YAP zvyšuje tvorbu metastáz<sup>87</sup>, jeho zvýšená exprese je spojená se špatnou prognózou u rakoviny plic<sup>88</sup> a může také způsobit rezistenci nádorových buněk na chemoterapii<sup>65</sup>. U některých typů nádorů navíc YAP způsobuje dediferenciaci buněk, které se potom svými vlastnostmi přibližují kmenovým buňkám, což usnadňuje jejich růst a tvorbu metastáz<sup>77,89</sup>.

Pomocí Hippo signální dráhy je regulován i další z koaktivátorů TEAD proteinů, TAZ. Porucha této signalizace i v tomto případě vede ke vzniku nádorového onemocnění. Zvýšená exprese a nukleární lokalizace TAZ proteinu byla nalezena přibližně u 20 % všech typů nádorů prsu a byla prokázána jeho souvislost se zvýšenou tvorbou metastáz<sup>90</sup>. Stejně jako YAP i TAZ může způsobit dediferenciaci buněk<sup>91</sup>.



### 1.3.5.1. Léčba rakoviny cílená na TEAD proteiny

Vzhledem k tomu, že TEAD proteiny se spolu se svými koaktivátory v organismu uplatňují hlavně během vývoje a jejich zvýšená aktivita v dospělosti vede ke vzniku nádorových onemocnění, je inhibice těchto transkripčních faktorů zajímavým cílem pro vývoj nových léčiv. Protože TEAD v dospělosti ve zdravých buňkách nebývá aktivní, předpokládá se, že by jeho inhibitory neměly mít moc vedlejších účinků. Všechny doposud objevené látky inhibující TEAD transkripční faktory způsobují snížení jeho aktivity tím, že blokují vznik komplexu YAP/TEAD.

První objevenou molekulou schopnou blokovat vazbu proteinu Yap na Tead a tím zastavit růst nádorů vzniklých nadměrnou expresí *Yap* genu byl protein Tead2, kterému byla odstraněna DNA vázající doména. Takto upravený Tead2 byl podáván myším se zvýšenou expresí genu *Yap* v játrech a dokázal zabránit jejich nadměrnému růstu i vzniku nádorů. Zdravé myši tato molekula nijak neovlivnila<sup>92</sup>.

Další látkou schopnou zabránit vazbě proteinu YAP na TEAD je verteporfin. Tento derivát porfyrinu je v medicíně využíván k léčbě makulární degenerace fotodynamickou terapií. Při této léčbě je nutná aktivace verteporfinu laserem o specifické vlnové délce, aby došlo k zničení postižených cév vzniklými radikály. Verteporfin se váže na TEAD vázající doménu YAP proteinu a blokuje tak jeho vazbu na TEAD i bez této světelné aktivace<sup>92</sup>. Verteporfin, stejně jako Tead2 bez TEA domény, dokáže zabránit vzniku nádorů u myších jater se zvýšenou expresí *Yap* genu. Expresi TEAD proteiny regulovaných genů snižuje také u rakovinných buněk jícnu a retinoblastomu<sup>77,93</sup>.

VGLL je také koaktivátorem TEAD proteinů a soupeří s proteinem YAP o vazbu na ně. Peptid nazvaný super-TDU odpovídá části proteinu VGLL, kterou se váže na TEAD a dokáže inhibovat aktivitu TEAD proteinů ještě lépe než samotný VGLL. Stejně jako u předchozích dvou látek byl jeho účinek ověřen na myších (v tomto případě s rakovinou žaludku)<sup>60</sup>.

Na podobném principu byla připravena i další molekula inhibující TEAD. Cyklický peptid imitující část TEAD vázající domény proteinu YAP je schopen vazby na transaktivační doménu TEAD transkripčních faktorů, čímž zabrání vazbě proteinu YAP na jeho interakční místo<sup>94</sup>.

Schopnost zabránit vazbě proteinu YAP na transaktivační doménu TEAD proteinů má také kyselina flufenamová, která je v medicíně využívána jako protizánětlivé léčivo<sup>95</sup>.

## 2. Cíl práce

- Připravit plasmid pro rekombinantní přípravu transkripčního faktoru TEAD1 a jeho DNA vazebné domény
- Nalézt vhodné podmínky produkce DNA vazebné domény lidského proteinu TEAD1
- Připravit DNA vazebnou doménu proteinu TEAD1 v dostatečném množství a čistotě pro strukturní analýzu její interakce s DNA

### 3. Materiál

#### 3.1. Přístroje a vybavení

- Analytické váhy AL54-IC Mettler Toledo, Švýcarsko
- Automatické pipety Gilson, USA
- Centrifuga Avanti J-26 XP Beckman Coulter, USA
- Centrifuga Spectrafuge 16M Labnet, USA
- Centrifugační koncentrátoři Millipore, USA
- Dialyzační trubice Spectrum Laboratories, USA
- Elektrody pro elektropřenos Sigma-Aldrich, USA
- Fotodokumentační box G:Box HR16 Syngene, USA
- Hmotnostní spektrometr FT ICR SolariX XR Bruker Daltonics, Německo
- Hmotnostní spektrometr MALDI TOF/TOF Ultraflex III Bruker Daltonics, Německo
- Chromatografický systém NGC Quest 10 Bio-Rad, USA
- Chromatografický systém BioSys 510 Beckman Coulter, USA
- Kolona ENrich SEC 650 10 x 300 mm Bio-Rad, USA
- Kolona MicroTrap Bruker Daltonics, Německo
- Kolona Mono S 5/50 GL GE Healthcare, UK
- Magnetická míchačka Stuart CB161 Keison, USA
- Ni Sepharose GE Healthcare, UK
- pH metr Beckman Coulter, USA
- Předvážky HF 1200G AND, USA
- Sonikační lázeň Bandellin, Německo
- Sonikační sonda Ultrasonic Homogeniser 4710 Cole-Pharmer, USA
- Souprava pro agarosovou elektroforézu Sigma-Aldrich, USA
- Souprava pro SDS-PAGE Bio-Rad, USA
- Spektrometr DeNovix DS-11 DeNovix, USA
- Termocykler Mastercycler personal Eppendorf, Německo
- Termostat s třepačkou Thermomixer comfort Eppendorf, Německo
- Třepačka Sanyo Gallenkamp Ltd., UK

- Vakuová odparka SpeedVac Jouan, Francie
- Vortex Scientifica, Itálie
- Zdroj deionizované vody MilliQ Merck-Millipore, USA
- Zdroj napětí EPS 500/400 Pharmacia, USA

### 3.2. Chemikálie

- 1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED) Sigma-Aldrich, USA
- 1,4-dithiothreitol (DTT) Sigma-Aldrich, USA
- 2-merkapt ethanol Sigma-Aldrich, USA
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal) Serva, Německo
- Acetonitril Merck, Německo
- Agar Oxoid, USA
- Agarosa Serva, Německo
- Akrylamid Sigma-Aldrich, USA
- Ampicilin Jersey Lab Supply, USA
- Azid sodný Sigma-Aldrich, USA
- Bacto-Trypton Oxoid, USA
- Bacto-Yeast extrakt Oxoid, USA
- Bromfenolová modř Serva, Německo
- Coomassie Brilliant Blue R 250 Sigma-Aldrich, USA
- Dihydrogenfosforečnan draselný Lach-ner, ČR
- DNA marker 100 bp, 1 kb New England Biolabs, USA
- Dodecylsírán sodný (SDS) Bio-Rad, USA
- Ethanol Lach-ner, ČR
- Ethidium bromid Sigma-Aldrich, USA
- Ethylmorfolin Sigma-Aldrich, USA
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) Sigma-Aldrich, USA
- Glycerol Lach-ner, ČR
- Glycin Sigma-Aldrich, USA
- Hovězí sérový albumin (BSA) Sigma-Aldrich, USA

• Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-ner, ČR
• Hydroxid sodný	Lach-ner, ČR
• Chloramfenikol	Jersey Lab Supply, USA
• Chlorid hořečnatý	Lach-ner, ČR
• Chlorid draselný	Lach-ner, ČR
• Chlorid sodný	Lach-ner, ČR
• Imidazol	Fluka, Švýcarsko
• Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, USA
• Kanamycin	Jersey Lab Supply, USA
• Kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxysořicová (CCA)	Sigma-Aldrich, USA
• Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Lachema, ČR
• Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
• Kyselina mravenčí	Fluka, Švýcarsko
• Kyselina octová	Fluka, Švýcarsko
• Methanol	Lach-ner, ČR
• Monoklonální myši Anti-polyhistidinová protilátka konjugovaná s peroxidasou	Sigma-Aldrich, USA
• N,N-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
• Octan sodný	Sigma-Aldrich, USA
• Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
• Sacharosa	Lachema, ČR
• SeeBlue Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, USA
• Sušené mléko Laktino	PML, ČR
• Tetracyklin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, USA
• Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)	Sigma-Aldrich, USA
• Tris	Sigma-Aldrich, USA
• Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific, USA
• Voda (LC/MS čistota)	Merck, Německo

### 3.3. Kity

- Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit Geneaid, Taiwan
- Maxiprep Plasmid Kit Geneaid, Taiwan
- Pierce ECL Western Blotting Substrate Thermo Scientific, USA

### 3.4. Enzymy

- *EcoRI* New England Biolabs, USA
- *HindIII* New England Biolabs, USA
- Lysozym Sigma-Aldrich, USA
- *NdeI* New England Biolabs, USA
- *NotI* New England Biolabs, USA
- Platinum Taq DNA polymerasa 5U/ml New England Biolabs, USA
- *PstI* New England Biolabs, USA
- RNasa Sigma-Aldrich, USA
- *SmaI* New England Biolabs, USA
- T4 DNA ligasa Fermentas, USA  
(1 WeissU/ml nebo 5 WeissU/ml)
- Trypsin Promega, Švýcarsko
- *XhoI* New England Biolabs, USA

### 3.5. Primery a vektory

- pBluescript II SK (+) Stratagene, USA
- pET-28a(+) Novagen, USA
- TEAD1 celý fw Generi Biotech, ČR  
5'-ATCATATGATTGAGCCCAGCAGCTGG-3'
- TEAD1 celý rev Generi Biotech, ČR  
5'- ATGAATTCTCATCAGTCCTTTACAAGCC-3'
- TEAD1-DBD fw Generi Biotech, ČR  
5'- ATCATATGTCTGCAGATAAGCC-3'
- TEAD1-DBD rev Generi Biotech, ČR  
5'- ATGAATTCTCATCAATCACGAGATTCCTTCTG-3'

### 3.6. Bakteriální kmeny

- *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Stratagene, USA  
Genotyp:  $F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal \lambda(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]$  ] [  $argU ileY leuW Strep/Spec^r$  ]
- *E. coli* BL21-Gold (DE3) Stratagene, USA  
Genotyp:  $F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal \lambda(DE3) endA Hte$
- *E. coli* NovaBlue Novagen, USA  
Genotyp:  $endA1 hsdR17 (r_{K12}^- m_{K12}^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA^+ B^+ lacI^q \Delta M15::Tn10]$  (Tet<sup>R</sup>)

### 3.7. Roztoky, pufrы a média

- Akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%)  
70 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 29 % (w/v) akrylamid, 1 % (w/v) N,N-methylen-bis-akrylamid
- Barvicí roztok pro SDS-PAGE gely  
45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- EP pufr pro rychlou izolaci plasmidové DNA  
10 mM Tris, 1 mM EDTA, 15 % (w/v) sacharosa, 2 mg/ml lysozym, 0,2 mg/ml RNasa, 0,2 mg/ml BSA, pH 8
- Ethylmorfolinový pufr  
100 mM ethylmorfolin
- LB agar  
1,25 % (w/v) agar v LB médiu, sterilizováno
- LB médium  
1 % (w/v) bacto-trypton, 0,5 % (w/v) bacto-yeast extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4, sterilizováno
- NEB2, NEB3, NEB4 pufrы  
Komerční výrobky firmy New England Biolabs, USA
- Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely  
55 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) ethanol
- PBS pufr  
137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, sterilizováno

- Pufr pro T4 ligasu  
Komerční výrobek firmy Fermentas, USA
- Pufr pro Taq polymerasu  
Komerční výrobek firmy New England Biolabs, USA
- Roztok protilátky pro imunodetekci  
1:4000 (v/v) monoklonální myší anti-polyhistidinová protilátka konjugovaná s peroxidasou v PBS pufru
- SDS pufr  
10 mM Tris, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
- Směs nukleotidů pro PCR  
Komerční výrobek firmy Promega, USA
- TAE pufr  
2 M Tris, 1 M kyselina octová, 50 mM EDTA, pH 8
- Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu  
Gel Loading Dye Blue (6×), komerční výrobek firmy New England Biolabs, USA
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE  
50 mM Tris, 12 % (v/v) glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) bromfenolová modř,  
100 mM DTT, pH 6,8



## 4. Metody

### 4.1. Příprava plasmidů

#### 4.1.1. Amplifikace insertů pomocí PCR

Pomocí polymerázové řetězové reakce byla amplifikována DNA kódující lidský protein TEAD1 a jeho DNA vázající doménu. Jako templát byla pro obě reakce použita cDNA získaná z lidské buněčné linie Jurkat (izolaci provedl RNDr. Karel Vališ, Ph.D.). Použité oligonukleotidové primery obsahovaly restrikční místa pro restrikční endonukleasy *NdeI* a *EcoRI* (obr. 20). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1, termální profil PCR reakce pak v tabulce 2 (str. 42). Délka amplifikovaných fragmentů byla následně ověřena elektroforézou v 1% agarosovém gelu.

#### TEAD1 - celý protein

Forward primer: ATCATATGATTGAGCCCAGCAGCTGG

Reverse primer: ATGAATTCTCATCAGTCCTTTACAAGCC

#### DNA vázající doména TEAD1

Forward primer: ATCATATGTCTGCAGATAAGCC

Reverse primer: ATGAATTCTCATCAATCACGAGATTCCTTCTG

Obr. 20: Primery pro amplifikaci insertů pomocí PCR. Zvýrazněna jsou restrikční místa a stop kodon.

Tab. 1: Složení reakční směsi pro PCR

Složka	V (μl)
H <sub>2</sub> O (LC/MS čistota)	19
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,5
PCR pufr pro Taq polymerasu (10x koncentrovaný)	5
10mM Směs dNTP	2
5μM Forward primer	10
5μM Reverse primer	10
DNA templát	2
Platinum Taq DNA polymerasa (5 U/μl)	0,4

Tab. 2: Termální profil PCR reakce

Krok	T	t (min)	Počet cyklů
1	94 °C	2	1
2	94 °C	0,5	30
	55 °C	1	
	72 °C	2	
3	72 °C	10	1

#### 4.1.1.1. Agarosová elektroforéza

1% agarosový gel byl připraven rozpuštěním 0,5 g agarosy v 50 ml TAE pufru a následným zahřátím. Elektroforéza probíhala v TAE pufru při konstantním napětí 90 V. K detekci DNA v gelu bylo použito interkalační barvivo ethidium bromid, které fluoreskuje pod UV světlem. Vzorky pro agarosovou elektroforézu byly připraveny přidáním 1  $\mu$ l vzorkového pufru k 5  $\mu$ l PCR produktu.

#### 4.1.2. Ligace do vektoru pBluescript II SK (+)

Amplifikované inserty byly vloženy do vektoru pBluescript II SK (+). Výhodou tohoto vektoru je, že umožňuje po transformaci buněk vzniklým plasmidem snadno rozpoznat klony obsahující plasmid, do kterého se insert opravdu podařilo vložit metodou modro-bílé selekce (blue-white screening). Oblast obsahující restrikční místa pro endonukleasy (polylinker) je u tohoto vektoru vložena do genu *LacZ*, který kóduje část enzymu  $\beta$ -galaktosidasy a je indukovatelný IPTG. Pokud do vektoru není vložen žádný insert, je po transformaci správných buněk, které mají ve svém genomu vloženou sekvenci kódující zbývající část enzymu (např. právě NovaBlue), produkována  $\beta$ -galaktosidasa, která štěpí X-gal a při této reakci vzniká modré barvivo. Pokud je *LacZ* přerušen vloženým insertem, zůstávají kolonie bílé (enzym se neprodukuje a reakce neprobíhá)<sup>96</sup>.

Byly připraveny dvě ligační směsi, jedna pro celý TEAD1 a druhá pro TEA doménu (tab. 3, str. 43), které byly ponechány přes noc reagovat při pokojové teplotě.

Tab. 3: Složení ligačních směsí

Složka	V (μl)
Vektor pBluescript II SK (+)	0,5
Pufř NEB4	1,5
Insert (celý <i>TEAD1</i> /TEA doména)	13
T4 DNA ligasa (1 WeissU/ml)	0,3
Restrikční endonukleasa <i>Sma</i> I	0,3
20mM ATP	0,3

#### 4.1.3. Transformace kompetentních klonovacích buněk

Transformace kompetentních buněk byla provedena metodou tepelného šoku. Klonovací buňky NovaBlue, dlouhodobě uchovávané při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , rozmrzly na ledu a poté k nim byl přidán celý objem ligační směsi. Po 20 minutách stání na ledu byly buňky zahřáty na  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 45 s. Následně byl přidán 1 ml sterilního LB média a buňky v něm byly nechány 1 h růst na třepačce (250 otáček/min) při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po hodinové inkubaci byly buňky centrifugovány 5 min při  $1800\times\text{ g}$ . 800 μl supernatantu bylo odebráno a ve zbytku byla resuspendována peleta.

#### 4.1.4. Modro-bílá selekce

Byly připraveny misky s LB agarem obsahujícím ampicilin o koncentraci 100 μg/ml a tetracyklin o koncentraci 12,5 μg/ml, na které bylo rozetřeno 100 μl 2% X-gal a 100 μl 40mM IPTG. Na takto připravené misky bylo nanášeno 30 μl suspenze transformovaných buněk NovaBlue. Misky byly inkubovány přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Následující den bylo vybráno 5 bílých kolonií z misky s plasmidy pro celý *TEAD1* a 5 bílých kolonií s plasmidy pro TEA doménu, které byly zaočkovány do 1 ml LB média s ampicilinem (100 μg/ml) a tetracyklinem (12,5 μg/ml) a třepány (250 otáček/min) přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.5. Rychlá izolace plasmidů pro restrikční analýzu

Roztoky nočních kultur byly centrifugovány při  $1800\times\text{ g}$  5 min. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována ve 30 μl EP pufru. Vzniklá směs byla ponechána 10 min stát na ledu, následně byla 2 min povařena a centrifugována při  $10000\times\text{ g}$  10 min. Plasmidy se

poté nacházely v supernatantu, který byl použit pro restriční analýzu.

#### 4.1.6. Restriční analýza

Bylo odebráno 9 µl roztoku plasmidů od každého z deseti vzorků (5 pro celý TEAD1 a 5 pro TEA doménu). Ke každému vzorku byl přidán 1 µl pufru NEB3 a po 0,3 µl enzymů *NotI* a *EcoRI*. Směs byla inkubována 1 h při 37 °C. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 1,5 µl vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu. Velikost vzniklých fragmentů byla poté zjištěna pomocí agarosové elektroforézy v 1 % gelu (popsáno v kapitole 4.1.1.1.).

#### 4.1.7. Příprava většího množství plasmidů

Na základě výsledků restriční analýzy byl pro další práci zvolen jeden z testovaných bakteriálních klonů pro každý z připravovaných plasmidů a byla z něj připravena noční kultura zaočkováním do 250 ml LB média s příslušnými antibiotiky, která byla kultivována přes noc na třepačce (250 otáček/min) při 37 °C.

Noční kultury byly centrifugovány 10 min při 3000× g a 4 °C. K izolaci plasmidů byl použit kit „Maxiprep plasmid kit“ od firmy Geneaid a bylo postupováno podle návodu<sup>97</sup>. Získaná vysušená plasmidová DNA byla nakonec rozpuštěna v 200 µl destilované vody v LC/MS čistotě.

#### 4.1.8. Precipitace v ethanolu

Izolované plasmidy byly přečištěny precipitací v ethanolu. K roztokům plasmidů byl přidán 2,5 násobek objemu 96% ethanolu a 1/10 objemu 3M octanu sodného o pH 5,2. Směsi byly inkubovány 30 min při -80 °C a poté centrifugovány při 12000× g a 4 °C 10 min. Vzniklá peleta byla vysušena vakuovou odparkou a následně rozpuštěna v 50 µl destilované vody (LC/MS čistota). Koncentrace DNA v roztocích byla stanovena spektrofotometricky při 260 nm.

#### 4.1.9. Ligace do expresního vektoru pET-28a(+)

Inserty obsažené ve vektoru pBluescript II SK (+) byly odtud vyštěpeny restričními endonukleasami *NdeI* a *EcoRI*. Stejnými enzymy byl štěpen i vektor pET-28a(+). Byly připraveny reakční směsi, jejichž složení je uvedeno v tabulce 4 (str. 45). Po 1,5 h inkubace při 37 °C k nim byly přidány 2 µl vzorkového pufru pro agarosovou

elektroforézu. Vzniklé produkty byly rozděleny agarosovou elektroforézou v 1 % gelu (popsáno v kapitole 4.1.1.1.). Proužky velikostí odpovídající oběma insertům a linearizovanému vektoru byly skalpelem vyříznuty a DNA v nich přítomná byla z gelu extrahována pomocí kitu „Gel/PCR fragments extraction kit“ od firmy Geneaid (postupováno bylo podle návodu<sup>98</sup>) a nakonec byla vysušena vakuovou odparkou.

Linearizovaný vektor pET-28a(+) byl po vysušení rozpuštěn v 18  $\mu$ l destilované vody (LC/MS čistota). Dále byly připraveny ligační směsi přidáním složek uvedených v tabulce 5 do zkumavek s vysušenými inserty. Směsi byly inkubovány přes noc při 16 °C.

Tab. 4: Složení reakčních směsí pro restrikční štěpení

Složka	TEA doména	Celý <i>TEAD1</i>	Vektor
pET-28a(+) (1 mg/ml)	-	-	2 $\mu$ l
Celý <i>TEAD1</i> v pBluescript (0,3 mg/ml)	-	6 $\mu$ l	-
TEA doména v pBluescript (1,1 mg/ml)	2 $\mu$ l	-	-
NEB3 pufr	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l
<i>NdeI</i>	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
<i>EcoRI</i>	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (LC/MS čistota)	11,5 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l	11,5 $\mu$ l

Tab. 5: Složky ligační směsi přidané do zkumavek s vysušenými inserty

Složka	V( $\mu$ l)
Linearizovaný vektor pET-28a(+)	9
Pufr pro T4 DNA ligasu	1
T4 DNA ligasa (5 WeissU/ml)	0,5
20mM ATP	0,3

Další den jimi byly metodou tepelného šoku transformovány kompetentní klonovací buňky NovaBlue způsobem popsaným v kapitole 4.1.3. Suspenze buněk byla rozetřena na misky s LB agarem obsahujícím antibiotika kanamycin (50  $\mu$ g/ml) a tetracyklin (12,5  $\mu$ g/ml). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Šest kolonií z každé misky bylo sterilně přeneseno každá do 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky a takto připravené noční kultury byly nechány růst při 37 °C do rána na třepačce (250 otáček/min).

Plasmidy byly z nočních kultur izolovány postupem uvedeným v kapitole 4.1.5. Bakteriální klony obsahující vektor se správným insertem byly vybrány na základě restrikční analýzy (postup v kapitole 4.1.6) po štěpení enzymem *HindIII* v prostředí pufru NEB2. Zvolené klony byly využity k přípravě většího množství plasmidů postupem uvedeným v kapitole 4.1.7.

Koncentrace DNA ve výsledném roztoku byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 260 nm. Její čistota byla vyjádřena jako poměr absorbance při 260 nm a při 280 nm.

#### 4.1.10. Kontrola nově připravených plasmidů

Přítomnost správných insertů vložených do vektoru pET-28a(+) byla ověřena další restrikční analýzou, tentokrát s několika různými enzymy. Připraveno bylo celkem šest reakčních směsí (3 pro každý plasmid), jejichž složení je uvedeno v tabulce 6. Směsi byly ponechány 1 h inkubovat při 37 °C a poté byla reakce zastavena přidáním 1,5 µl vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu. Vzniklé fragmenty byly rozděleny elektroforézou v 1% agarosovém gelu stejným způsobem jako v kapitole 4.1.1.1.

Tab. 6: Složení reakčních směsí pro restrikční analýzu. D – TEA doména, F – celý *TEAD1*

	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
Plasmid (1 µg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O (LC/MS čistota)	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
0,3 µl Enzymu	<i>NdeI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	<i>NdeI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>
	<i>EcoRI</i>	-	<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>	-	-
1 µl Pufu	NEB4	NEB2	NEB3	NEB4	NEB2	NEB3

Správnost sekvence DNA genů kódujících *TEAD1* a jeho DNA vázající doménu v nově připravených plasmidech byla ověřena také DNA sekvenováním, které bylo provedeno Střediskem sekvenování DNA v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky.

## 4.2. Výběr vhodných podmínek produkce

### 4.2.1. Transformace kompetentních produkčních buněk

Pro produkci DNA vazebné domény proteinu TEAD1 byly testovány dva produkční kmeny bakterie *E. coli*: buňky BL21-Gold (DE3) a od nich odvozené BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, které ve svém genomu obsahují více kopií genů kódujících tRNA s kodony obvyklými v lidských genech. Nedostatek tRNA s těmito kodony v bakteriích by mohl limitovat množství jimi produkovaného proteinu<sup>99</sup>.

Oba tyto produkční kmeny byly transformovány metodou tepelného šoku plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD s genem pro TEA doménu připraveným v první části této práce. Buňky skladované dlouhodobě při -80 °C rozmrzly na ledu a k 100 µl buněčné suspenze bylo přidáno 0,5 µl roztoku plasmidu o koncentraci 1 µg/µl. Po 20 minutách inkubace na ledu byl proveden tepelný šok teplotou 42 °C po dobu 45 s. Následně byl přidán 1 ml sterilního LB média a buňky byly inkubovány 1 h při 37 °C. Dále byla buněčná suspenze centrifugována 5 min při 1800× g. 800 µl supernatantu bylo odebráno a ve zbytku byla resuspendována peleta. 30 µl takto zakoncentrované buněčné suspenze bylo rozetřeno na misku s LB agarem obsahujícím v případě buněk BL21-Gold (DE3) kanamycin (50 µg/ml) a tetracyklin (12,5 µg/ml) a v případě buněk BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Další den byly připraveny noční kultury zaočkováním kolonií z každé misky do 2 ml sterilního LB média a byly inkubovány přes noc na třepáčce (250 otáček/min) při 37 °C.

### 4.2.2. Optimalizace koncentrace induktoru a výběr vhodného produkčního kmene

Pro každý z buněčných kmenů bylo osm zkumavek s 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky inokulováno 50 µl noční kultury. Po 2 h třepání (250 otáček/min) při 37 °C byly kultury vytemperovány na 30 °C a bylo přidáno IPTG. Testovány byly výsledné koncentrace IPTG ve zkumavkách 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM a 2 mM. Kultura v jedné zkumavce pro každý z testovaných kmenů indukována nebyla a sloužila pak jako kontrola. Po indukci byly buněčné kultury inkubovány při 30 °C a za

třepání rychlostí 250 otáček/min 3 h. Po třech hodinách byly kultury centrifugovány 10 min při 3000× g a vzniklá peleta byla resuspendována ve 100 µl vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Vzorky byly analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) a elektropřenosu s imunodetekcí.

#### 4.2.2.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Byl připraven gel skládající se z 15% separačního a 5% zaostřovacího polyakrylamidového gelu (složení je uvedeno v tabulce 7) pro každý z testovaných produkčních kmenů. Vzorky byly 5 min povařeny a následně centrifugovány 5 min při 10000× g. Do jamek v každém z gelů bylo nanášeno 10 µl od každého vzorku a 5 µl markeru obsahujícího proteiny o známé molekulové hmotnosti. Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 25 mA na gel o rozměrech 8,5×7,5×0,1 cm v prostředí SDS pufru.

Tab. 7: Složení gelů pro SDS-PAGE

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

Po proběhnutí elektroforézy byl gel použit pro elektropřenos na nitrocelulosovou membránu anebo obarven barvicím roztokem Coomassie Brilliant Blue po dobu 10 min. Přibližné molekulové hmotnosti proteinů ve vzniklých proužcích byly po odbarvení oblastí neobsahujících proteiny odbarvovacím roztokem vyhodnoceny porovnáním s proteinovým standardem o známé molekulové hmotnosti.

#### 4.2.2.2. Elektropřenos

Proteiny rozdělené elektroforézou v polyakrylamidovém gelu byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu pomocí techniky elektropřenosu (v angličtině nazývané



western blot). Přenos probíhal 1,5 h při konstantním proudu 0,8 mA na cm<sup>2</sup> membrány v prostředí SDS pufru s obsahem 20% methanolu. Neobsazená místa na membráně byla blokována roztokem 1% odtučněného sušeného mléka v PBS pufru po dobu přibližně 16 h.

Následně byla membrána promyta 3× 10 min v PBS pufru a inkubována 1 h v roztoku myší protilátky proti histidinové kotvě konjugované s křenovou peroxidasou. Poté byla membrána opět promyta 3× 10 min PBS puftrem. Přítomnost protilátky byla detekována pomocí ECL kitu pokrytím membrány směsí roztoků peroxidu vodíku a luminolu v poměru 1:1. Vzniklá luminiscence byla zachycena fotodokumentačním boxem.

#### 4.2.3. Peptidové mapování

Protein tvořící nejsilnější proužek v SDS-PAGE gelu ze vzorku indukovaného 0,2 mM IPTG při produkci v BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL buňkách byl identifikován technikou peptidového mapování pomocí hmotnostní spektrometrie (metoda je v angličtině nazývána „peptide mass fingerprinting“).

Zkoumaný proužek byl z gelu vyříznut skalpelem a nakrájen na kostky o hraně přibližně 1 mm. Ke kouskům gelu ve zkumavce bylo přidáno 100 µl ethylmorfolinového pufru a 100 µl acetonitrilu. V tomto roztoku byly kostičky gelu ponechány až do jejich úplného odbarvení.

Následně byl odbarvovací roztok odstraněn a ke gelu bylo přidáno 100 µl destilované vody. Po pěti minutách byla voda také odsána a bylo místo ní přidáno 100 µl acetonitrilu. Po dalších 5 min byl odstraněn i acetonitril. Tento postup byl zopakován ještě dvakrát. Promyté kousky gelu byly vysušeny na vzduchu.

Protein v gelu byl štěpen trypsinem. K vysušeným kostičkám gelu bylo přidáno 35 µl ethylmorfolinového pufru s 10 % acetonitrilu a 1 µl trypsinu o koncentraci 100 ng/µl. Směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Štěpení bylo ukončeno přidáním 6 µl 5% kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu. Peptidy byly z gelu uvolněny sonikací po dobu 15 min.

1 µl vzniklého roztoku byl nanesen na MALDI terč a po zaschnutí převrstven CCA maticí. Hmotnost peptidů a jejich aminokyselinová sekvence byla určena pomocí hmotnostní spektrometrie v uspořádání MALDI-TOF/TOF. Měření provedl RNDr. Daniel Kavan, Ph.D. Výsledky byly porovnány s databází SwissProt pomocí algoritmu Mascot.

#### 4.2.4. Výběr vhodné doby produkce

Z noční kultury buněk BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformovaných postupem uvedeným v kapitole 4.2.1. plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD bylo 50 µl inokulováno šest zkumavek s 1 ml LB média s antibiotiky (kanamycin 50 µg/ml, chloramfenikol 35 µg/ml). Zkumavky byly třepány 3 h rychlostí 250 otáček/min při 37 °C. Po vytemperování na 30 °C bylo do každé zkumavky přidáno IPTG tak, aby jeho výsledná koncentrace ve zkumavce byla 0,5 mM. Kontrolní vzorek pro dobu produkce 0 h byl ihned připraven centrifugací při 3000× g 10 min a následným resuspendováním pelety ve 100 µl vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Ostatní zkumavky byly dále třepány rychlostí 250 otáček/min při 30 °C. Sklizeny byly postupně po 1, 2, 3, 5 a 16 hodinách a vzorky z nich byly připraveny stejným způsobem jako u kontroly.

Všechny vzorky byly nakonec analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.2.1.) a elektropřenosu s imunodetekcí (kap. 4.2.2.2.).

#### 4.2.5. Výběr vhodné produkční teploty

Stejně jako u ostatních optimalizací byly 3 zkumavky s 1 ml LB média a antibiotiky zaočkovány 50 µl noční kultury transformovaných buněk BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Po třech hodinách třepání rychlostí 250 otáček/min za teploty 37 °C byly jednotlivé zkumavky vytemperovány na teploty 23, 30 a 37 °C a bylo přidáno IPTG o koncentraci 0,5 mM. Zkumavky byly třepány za daných teplot další 3 h a poté byly připraveny vzorky na SDS-PAGE a elektropřenos stejným způsobem jako v 4.2.3.

### 4.3. Purifikace

#### 4.3.1. Produkce DNA vazebné domény TEAD1 ve velkém objemu média

Buňky BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL byly transformovány plasmidem pET-28a(+)-TEAD1-DBD (postup uveden v kapitole 4.2.1.). Noční kultura byla připravena přenesením jedné kolonie do LB média s antibiotiky (kanamycin 50 µg/ml, chloramfenikol 35 µg/ml) o objemu 100 ml a inkubována přes noc při 37 °C.

Produkce probíhala ve čtyřech Erlenmeyerových baňkách o objemu 2 l, z nichž každá obsahovala 0,5 l LB média s příslušnými antibiotiky. Každá z baňek byla inokulována 5 ml noční kultury a třepána rychlostí 250 otáček/min při 37 °C. Byla měřena optická denzita

buněčné suspenze (spektrofotometricky při 600 nm). Ve chvíli, kdy optická densita dosáhla hodnoty 0,6, byly baňky vytemperovány na 23 °C a produkce TEA domény byla indukována přidáním IPTG do konečné koncentrace v médiu 0,2 mM. Po indukci byly baňky dále třepány stejnou rychlostí při 23 °C přibližně 16 h. Nakonec byly bakteriální kultury centrifugovány 10 min při 6000× g a 4 °C a peleta byla zmrazena na -20 °C.

#### 4.3.2. Izolace proteinů z buněčné kultury

Pelety v centrifugačních kyvetách byly resuspendovány ve 20 ml pufru A pro afinitní chromatografii (složení uvedeno v tab. 8 v následující kapitole) na 0,5 l média. Vzniklá suspenze byla lyzována sonikací. Sonikace probíhala vždy přibližně 1 min a následovalo 1 min chlazení na ledu. Tento postup byl opakován 15×. Po sonikaci byl buněčný lyzát centrifugován 20 min při 40000× g a supernatant byl ihned přemístěn do jiné nádoby.

#### 4.3.3. Afinitní chromatografie

Vzhledem k tomu, že součástí vektoru pET-28a(+)-TEAD1-DBD je i sekvence kódující histidinovou kotvu, která je od připravovaného proteinu odštěpitelná thrombinem, byla k jeho purifikaci v prvním kroku využita afinitní chromatografie.

Kolona s Ni-NTA nosičem byla nejprve 10 min promyta puftrem B a následně 10 min puftrem A (složení uvedeno v tab. 8). Byl nanesen celý objem buněčného lyzátu a následně byla kolona promyta puftrem A. Byla měřena absorbance při 280 nm roztoku vycházejícího z kolony. Ve chvíli, kdy absorbance klesla zpět na nulu, byly proteiny zachycené na koloně eluovány gradientem imidazolu obsaženým v pufru B. Množství složky B v mobilní fázi rostlo konstantní rychlostí od 0 do 100 % po dobu 60 min. Po skončení gradientu byla kolona ještě 10 min promývána puftrem B. Průtok mobilní fáze byl po celou dobu 1 ml/min.

Tab. 8: Složení pufrů použitých jako mobilní fáze při afinitní chromatografii

Pufr	Složky			
A (pH 8)	25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 M NaCl	5 mM 2-merkapt ethanol	-
B (pH 8)	25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 M NaCl	5 mM 2-merkapt ethanol	0,5 M imidazol

Byla zachytávána veškerá tekutina vycházející z kolony při nanášení vzorku. Během eluce bylo sbíráno vše, co vykazovalo absorbanci při 280 nm alespoň 0,1. Z takto

získaných frakcí bylo odebráno 10  $\mu$ l, ke kterým bylo přidáno 10  $\mu$ l 2 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE analýzu (postup uveden v kapitole 4.2.2.1.).

#### 4.3.4. Výměna pufrů dialýzou

Frakce z afinitní chromatografie obsahující TEA doménu byly zakoncentrovány na objem 10 ml pomocí centrifugačních koncentrátorů s membránou o velikosti pórů 3 kDa. Roztok obsahující připravovaný protein byl v koncentrátoru centrifugován při 3500 $\times$  g dokud nebylo dosaženo požadovaného objemu.

Nadbytečná sůl a 2-merkaptoethanol byly odstraněny dialýzou. 10 ml roztoku proteinu po koncentrování bylo nalito do dialyzační trubice, která byla ponořena do 2 l pufru A pro iontově výměnnou chromatografii (složení uvedeno v tab. 9, str. 53). Po čtyřech hodinách míchání byl pufr vyměněn za čerstvý a dialýza v něm probíhala ještě dalších 16 h.

#### 4.3.5. Iontově výměnná chromatografie

Pro oddělení TEA domény od ostatních proteinů, které se nespecificky zachytily na Ni-NTA koloně, byla využita iontově výměnná chromatografie, pomocí které lze proteiny rozdělit na základě hodnoty jejich pI. Použita byla kolona Mono S, což je silný katex, který pevněji zadržuje proteiny, které mají vysoké pI, a tedy jsou při pH 7,4 kladně nabitě. Hodnota pI připravovaného proteinu je predikována na 10.

K nanesení vzorku na kolonu byla použita 20 ml dávkovací smyčka. Průtok mobilní fáze činil po celou dobu 1 ml/min. Smyčka i kolona byly nejprve 30 min promývány puftrem B o vysoké koncentraci NaCl (složení v tab. 9, str. 53) a následně 30 min puftrem A (složení v tab. 9, str. 53). Dávkovací smyčka byla naplněna roztokem proteinu a byl spuštěn automatický program zahrnující nanesení vzorku na kolonu a oplach kolony puftrem A (25 min) a eluci zachycených proteinů gradientem pufru B. Podíl složky B v mobilní fázi během eluce stoupal konstantní rychlostí po dobu 25 min od 0 do 100 % a následně zůstal 10 min na hodnotě 100 %.

Tab. 9: Složení pufrů sloužících jako mobilní fáze iontově výměnné chromatografie

Pufr	Složky		
A (pH 7,4)	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM NaCl	1 mM NaN <sub>3</sub>
B (pH 7,4)	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M NaCl	1 mM NaN <sub>3</sub>

V průběhu celé chromatografie byly sbírány frakce o objemu 4 ml. Z vybraných frakcí bylo odebráno 10 µl, ke kterým bylo přidáno 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Takto připravené vzorky byly nakonec analyzovány pomocí SDS-PAGE (popsáno v kapitole 4.2.2.1).

#### 4.3.6. Odštěpení histidinové kotvy

Vybrané frakce z iontově výměnné chromatografie, ve kterých byla přítomna TEA doména, byly spojeny a byl k nim přidán thrombin tak, aby jeho aktivita v roztoku činila 1 U/mg proteinu. Štěpení probíhalo 16 h při 4 °C.

Vzorky o objemu 100 µl byly odebrány před přidáním thrombinu, po 1 h štěpení a po 16 h štěpení. U vzorků obsahujících thrombin bylo ihned po odebrání štěpení ukončeno přidávkem PMSF o konečné koncentraci 1 mM. Po 16 h štěpení bylo PMSF o stejné koncentraci přidáno i do zbytku roztoku proteinů.

#### 4.3.7. Hmotnostně spektrometrická analýza produktů štěpení

Vzorky produktů štěpení byly nejprve analyzovány pomocí SDS-PAGE, ale v gelu po obarvení nebylo možné rozlišit neštěpenou formu proteinu od štěpené. Přesná molekulová hmotnost proteinu ve vzorcích byla tedy určena pomocí hmotnostní spektrometrie o vysokém rozlišení.

Vzorky byly nejprve odsoleny pomocí kolonky s reverzní fází Microtrap. Kolona byla nejprve promyta 250 µl 80% acetonitrilu s obsahem 0,5% kyseliny mravenčí. Následně byla kvůli ekvilibraci ještě třikrát propláchnuta 250 µl 0,5% kyseliny mravenčí. Vzorek o objemu 100 µl byl okyselen doplněním na 250 µl 0,5% kyselinou mravenčí a nanesen na kolonku. Následovalo opět promývání (třikrát 250 µl 0,5% kyseliny mravenčí). Odsolený vzorek byl z kolony uvolněn 50 µl 80% acetonitrilu s obsahem 0,5% kyseliny mravenčí.

Po odsolení byla přesná hmota proteinů ve vzorcích určena pomocí hmotnostního spektrometru v uspořádání ESI-FTICR. Měření na hmotnostním spektrometru provedl RNDr. Petr Pompach, Ph.D.

#### 4.3.8. Gelová permeační chromatografie

Posledním purifikačním krokem, během kterého byla od připravované TEA domény oddělena odštěpená polyhistidinová kotva, thrombin a případné zbývající bakteriální proteiny byla gelová permeační chromatografie s využitím kolony ENrich SEC 70 10× 300 mm.

Roztok proteinu po štěpení thrombinem byl koncentrován na objem 900  $\mu$ l pomocí centrifugačního koncentrátoru způsobem popsáním v kapitole 4.3.4. Dávkovací smyčka o objemu 1 ml i kolona byly nejprve promyty mobilní fází o pH 7,4 a složení 150 mM NaCl, 20 mM Tris a 1 mM TCEP. Po nanesení vzorku na kolonu byl 30 min udržován průtok mobilní fáze 0,7 ml/min a byly jímány frakce o objemu 0,7 ml. Z vybraných frakcí bylo odebráno 10  $\mu$ l roztoku a byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE přidáním 10  $\mu$ l 2× koncentrovaného vzorkového pufru. Analýza pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu proběhla stejně jako v kapitole 4.2.2.1.

## 5. Výsledky

V rámci této práce byla připravována DNA vazebná doména lidského proteinu TEAD1. Aminokyselinové sekvence celého proteinu TEAD1 i jeho DNA vazebné domény jsou uvedeny v obrázku 21.

```
IEPSSWSGSESPAENMERMSDSADKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAIY  
PPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYIKLRTGKTRTRKQVSSHIQVLARR  
KSRDFHSKLKDQTAKDQALQHMAAMSSAQIVSATAIHNKLGGLPGIPRPTF  
PGAPGFWPGMIQTGQPGSSQDVKPFVQQAYPEIQAQVTAQIPGFEPASAPA  
PSVPAWQGRSIGTTKLRLVEFSAFLEQQRDPDSYNKHLFVHIGHANHSYS  
DPLLESVDIRQIYDKFPEKKGGLKELFGKGPQNAFFLVKFWADLNCNIQD  
DAGAFYGVTSQYESSENMTVTCSTKVCSFGKQVVEKVEYARFENGRFV  
YRINRSPMCEYMINFIHKLKHLPEKYMMSVLENFTILLVVVNRDQTQETL  
LCMACVFEVSNSEHGAQHIIYRLVKD
```

Obr. 21: Primární sekvence proteinu TEAD1. **Modře** je vyznačena připravovaná DNA vazebná doména

### 5.1. Příprava plasmidů

```
ATTGAGCCCAGCAGCTGGAGCGGCAGTGAGAGCCCTGCCGAAAACATGGA  
AAGGATGAGTGACTCTGCAGATAAGCCAATTGACAATGATCGAGAAGGGG  
TCTGGAGCCCCGACATCGAGCAAAGCTTTCAGGAGCCCTGGCTATCTAT  
CCACCATGTGGGAGGAGGAAAATCATCTTATCAGACGAAGGCAAAATGTA  
TGGTAGGAATGAATTGATAGCCAGATACATCAAACCTCAGGACAGGCAAGA  
CGAGGACCAGAAAACAGGTGTCTAGTCACATTCAGGTTCTTGCCAGAAGG  
AAATCTCGTGATTTTTCATTCCAAGCTAAAGGATCAGACTGCAAAGGATAA  
GGCCCTGCAGCACATGGCGGCCATGTCTCAGCCCAGATCGTCTCGGCCA  
CTGCCATTATAACAAGCTGGGGCTGCCTGGGATTCCACGCCCGACCTTC  
CCAGGGGCGCCGGGGTTCTGGCCGGGAATGATTCAAACAGGGCAGCCAGG  
ATCCTCACAAAGACGTCAAGCCTTTTGTGCAGCAGGCCTACCCCATCCAGC  
CAGCGGTACAGCCCCCATTCAGGGTTTGAGCCTGCATCGGCCCCAGCT  
CCCTCAGTCCCTGCCTGGCAAGGTCGCTCCATTGGCACAACCAAGCTTCG  
CCTGGTGGAAATTTTCAGCTTTTCTCGAGCAGCAGCGAGACCCAGACTCGT  
ACAACAAACACCTCTTCGTGCACATTGGGCATGCCAACCATTCTTACAGT  
GACCCATTGCTTGAATCAGTGGACATTCGTTCAGATTTATGACAAAATTTCC  
TGAAAAGAAAGGTGGCTTAAAGGAAGTGTGGAAAGGGCCCTCAAATG  
CCTTCTTCCTCGTAAAATTTCTGGGCTGATTTAAACTGCAATATTCAAGAT  
GATGCTGGGGCTTTTTATGGTGTAAACCAGTCAGTACGAGAGTTCTGAAAA  
TAGAAAAAGTAGAGACGGAGTATGCAAGGTTTGAGAATGGCCGATTTGTA  
TACCGAATAAACCGCTCCCCCAATGTGTGAATATATGATCAACTTCATCCA  
CAAGCTCAAACACTTACCAGAGAAATATATGATGAACAGTGTTTTGGAAA  
ACTTCACAATTTTATTGGTGGTAACAAACAGGGATACACAAGAACTCTA  
CTCTGCATGGCCTGTGTGTTTGAAGTTTCAAATAGTGAACACGGAGCACA  
ACATCATATTTACAGGCTTGTAAGGACTGA
```

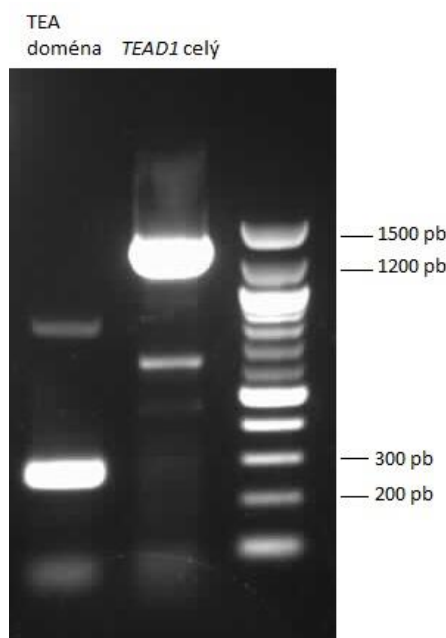
Obr. 22: DNA sekvence celého *TEAD1* insertu. **Modře** je vyznačena DNA sekvence TEA domény použitá jako insert do druhého z plasmidů. **Žlutě** je označeno štěpící místo restriktční endonukleazy *HindIII*, **zeleně** *PstI* a **růžově** *XhoI*.

Připravovány byly dva plasmidy, z nichž jeden obsahoval insert kódující celý TEAD1 a druhý jeho DNA vazebnou doménu. DNA sekvence těchto dvou insertů jsou uvedeny

v obrázku 22 (str. 55) i s vyznačenými zásahovými místy pro restriční endonukleasy, které byly v průběhu přípravy plasmidu využity pro analýzu jednotlivých meziproduktů. Insert kódující celý TEAD1 je dlouhý 1281 párů bází a insert kódující jeho DNA vazebnou doménu 249 párů bází.

### 5.1.1. Amplifikace insertů pomocí PCR

Pomocí polymerasové řetězové reakce byly amplifikovány oba inserty. Délka amplifikovaných fragmentů byla následně zkontrolována agarosovou elektroforézou v 1 % gelu (obr. 23). Pokud PCR proběhlo správně, měly by se na gelu objevit fragmenty o velikosti 1281 pb pro celý TEAD1 a 249 pb pro jeho DNA vazebnou doménu.



Obr. 23: Inserty po PCR amplifikaci

Na obr. 23 je vidět, že nejsilnější proužek v obou drahách opravdu odpovídá velikostí výše zmíněným fragmentům, což potvrzuje, že amplifikace insertů pomocí PCR proběhla úspěšně.

### 5.1.2. Ligace do vektoru pBluescript II SK (+)

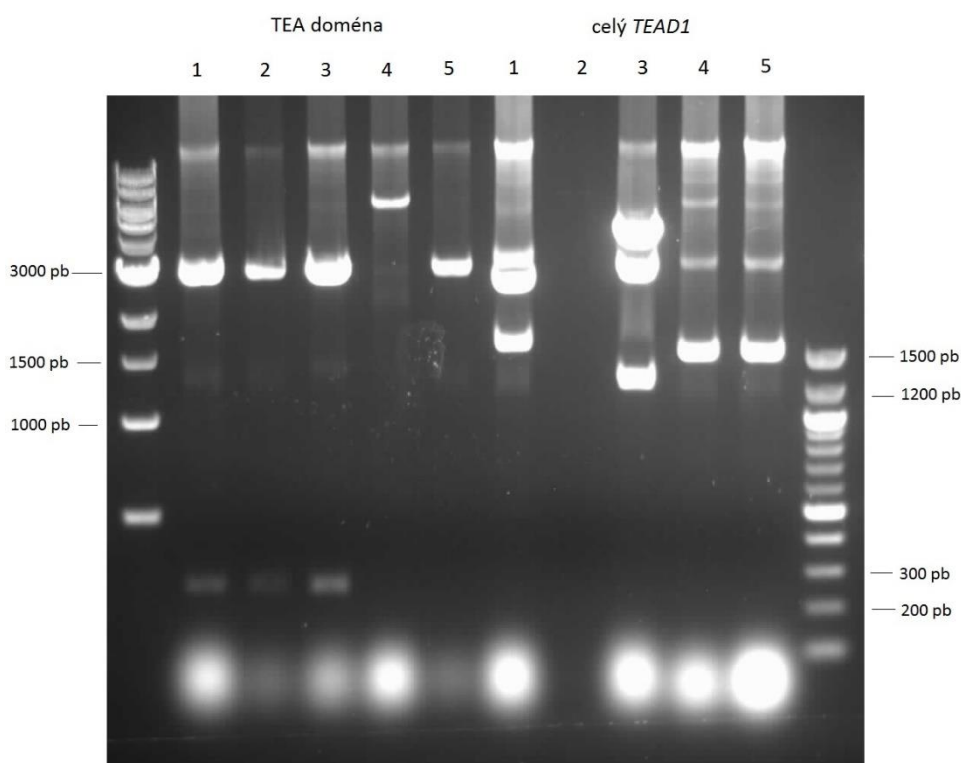
Amplifikované inserty byly vloženy do vektoru pBluescript II SK (+) a po transformaci buněk tímto vektorem bylo metodou modro-bílé selekce zvoleno pět kolonií obsahujících plasmid s vloženým insertem pro celý TEAD1 a pět pro TEA doménu. Z vybraných



buněčných klonů byla izolována plasmidová DNA, která byla následně štěpena restričními enzymy *NotI* a *EcoRI*. Vzniklé fragmenty byly analyzovány agarosovou elektroforézou (obr. 24).

Zásahové místo pro *EcoRI* bylo součástí použitého primeru a nachází se tedy na okraji vloženého insertu. Součástí druhého z primerů bylo štěpící místo pro *NdeI*, ale tento enzym bohužel nefunguje v prostředí pufru použitého pro rychlou izolaci plasmidové DNA. Proto byl pro restriční analýzu využit enzym *NotI*, jehož zásahové místo je součástí polylinkeru vektoru pBluescript II SK (+) a nachází se 24 pb od vloženého insertu.

V případě, že se ve zvoleném buněčném klonu nacházel plasmid se správným insertem, měly by po štěpení restričními endonukleasami vzniknout dva fragmenty. 3000 pb dlouhý fragment odpovídající vektoru pBluescript by měl být přítomen v obou připravovaných plasmidech. V plasmidu s celým *TEAD1* genem by pak druhý z fragmentů měl být 1305 pb dlouhý (součet délky insertu a vzdálenosti od jeho okraje k štěpícímu místu *NotI*). V případě TEA domény by pak měl druhý proužek analogicky odpovídat velikosti 273 pb.



Obr. 24: Restriční analýza po vložení PCR produktů do vektoru pBluescript II SK (+)

Z obrázku 24 je patrné, že v případě samotné TEA domény se plasmid se správným insertem nacházel v buněčných klonech 1, 2 a 3. U celého *TEAD1* genu byl fragment

o délce 1305 pb přítomen pouze v klonu číslo 3. V dráze číslo 3 se u celého *TEADI* genu nachází kromě dvou hledaných proužků ještě třetí, který nejspíš vznikl neúplným štěpením pouze jedním z použitých enzymů (došlo jen k linearizaci plasmidu). Na základě výsledků restriční analýzy byly pro další práci zvoleny u obou připravovaných plasmidů klony číslo 3.

### 5.1.3. Ligace do expresního vektoru pET-28a(+)

Z vybraných klonů bylo připraveno větší množství plasmidů, které byly přečištěny precipitací v ethanolu, štěpeny restričními endonukleasami *EcoRI* a *NdeI* a následně vloženy do stejnými enzymy poštěpeného vektoru pET28a(+).

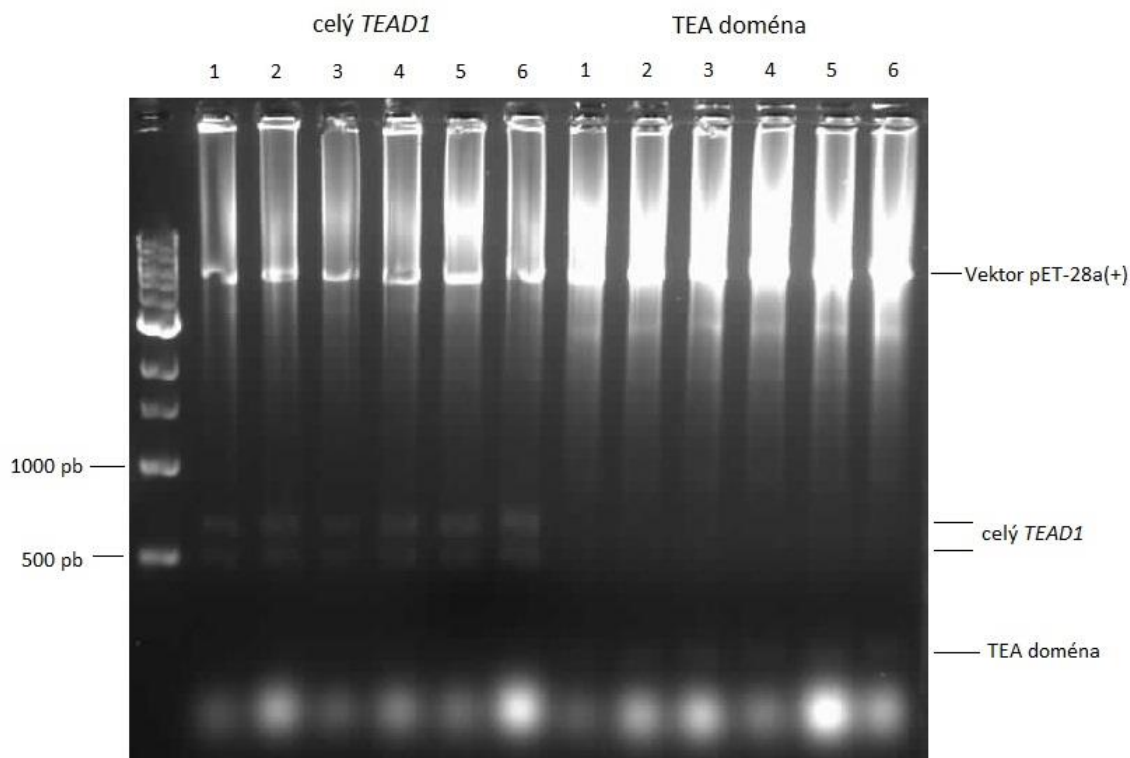
Použitý vektor obsahuje před oblastí, kam se vkládají inserty, sekvenci kódující polyhistidinovou kotvu oddělitelnou zásahovým místem pro proteasu thrombin. Přítomnost této kotvy umožňuje jak snadnější purifikaci připravovaného proteinu pomocí afinitní chromatografie, tak i jeho detekci po elektropřenosu protilátkou právě proti polyhistidinové kotvě.

Stejně jako u ligace do vektoru pBluescript, bylo i v tomto případě po transformaci buněk nově připravenými plasmidy, zvoleno šest kolonií narostlých na misce od každého z připravovaných plasmidů. Z nich byly připraveny noční kultury a následně izolována plasmidová DNA. Pro ověření přítomnosti správně vloženého insertu byla provedena restriční analýza endonukleasou *HindIII*, která byla vyhodnocena pomocí agarosové elektroforézy (obr. 25, str. 59).

Zásahová místa pro použitý enzym jsou vyznačena na obrázku 22 (str. 55). Jedno zásahové místo pro *HindIII* se nachází také v použitém vektoru a to 20 pb od restričního místa pro *EcoRI*, kde končí vložený insert. Na gelu by proto v případě, že se insert zaligoval správně, měly u celého *TEADI* genu být vidět fragmenty o velikostech přibližně 5500, 650 a 500 pb. U plasmidu pro DNA vazebnou doménu by po restrikci měly vzniknout fragmenty o přibližných velikostech 5500 a 200 pb.

Na obrázku 25 (str. 59) jsou hledané fragmenty vidět ve všech drahách. Špatná viditelnost fragmentů o délce 200 pb je nejspíš způsobena právě malou velikostí těchto fragmentů. Výraznost proužku v agarosovém gelu je totiž úměrná nejen množství DNA, ale právě i délce fragmentu (čím delší řetězec DNA je, tím více barviva se do něj může interkalovat). Plasmid se správným insertem byl tedy přítomen ve všech testovaných

klonech a pro další práci byly u obou připravovaných plasmidů zvoleny klony číslo 3.



Obr. 25: Restrikční analýza po vložení insertu do vektoru pET-28a(+)

#### 5.1.4. Kontrola nově připravených plasmidů

Ze zvolených klonů bylo připraveno větší množství plasmidů. Vzorky takto připravených plasmidů byly kvůli ověření správnosti sekvence vložených insertů analyzovány pomocí restrikčních enzymů (obr. 26, str. 60) a také DNA sekvenováním.

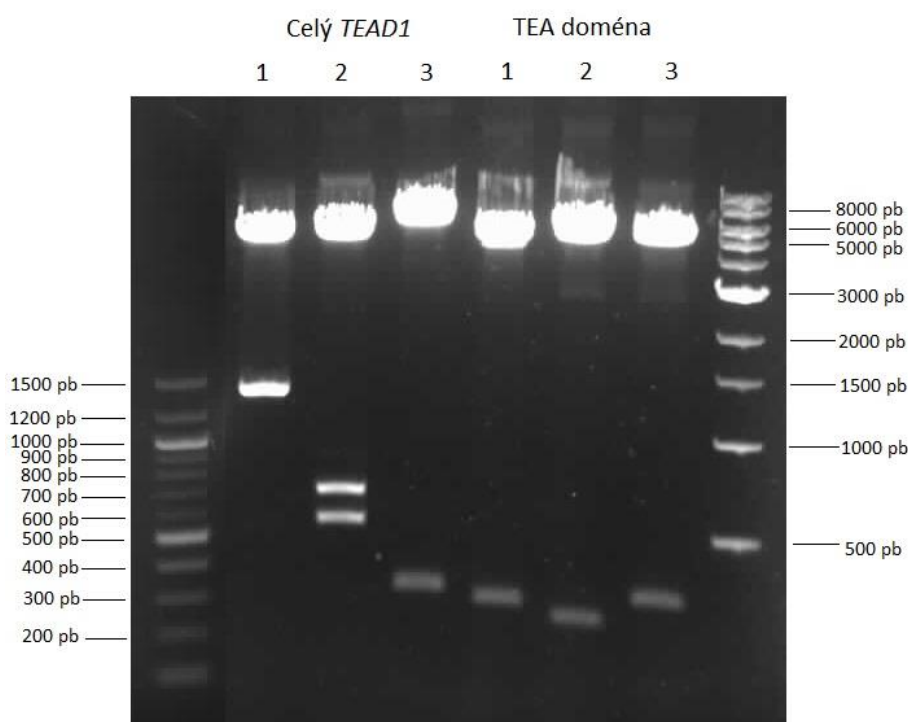
Pro restrikční analýzu byly využity enzymy uvedené v tabulce 10 (str. 60). Restrikční místa *HindIII*, *PstI* a *XhoI* jsou vyznačena v obrázku 22 (str. 55), přičemž *HindIII* a *XhoI* mají jedno zásahové místo navíc i ve vektoru a to ve vzdálenosti 20 pb (*HindIII*) a 45 pb (*XhoI*) od konce vloženého insertu. Zásahová místa pro *EcoRI* a *NdeI* byla součástí použitých primerů. V tabulce 11 (str. 60) jsou uvedeny předpokládané přibližné délky vzniklých fragmentů.

Tab. 10: Endonukleasy využívané pro restrikční analýzu. D - DNA vázající doména, F – celý *TEAD1*

	D1	D2	D3	F1	F2	F3
Enzymy	<i>NdeI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	<i>NdeI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>
	<i>EcoRI</i>	-	<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>	-	-

Tab. 11: Předpokládané délky fragmentů po restrikcích. D - DNA vázající doména, F – celý *TEAD1*

	F1	F2	F3	D1	D2	D3
Předpokládaná velikost fragmentů (pb)	5370	5500	6360	5370	5500	5330
	1280	650	290	250	200	290
		500				



Obr. 26: Kontrolní restrikce připravených plasmidů

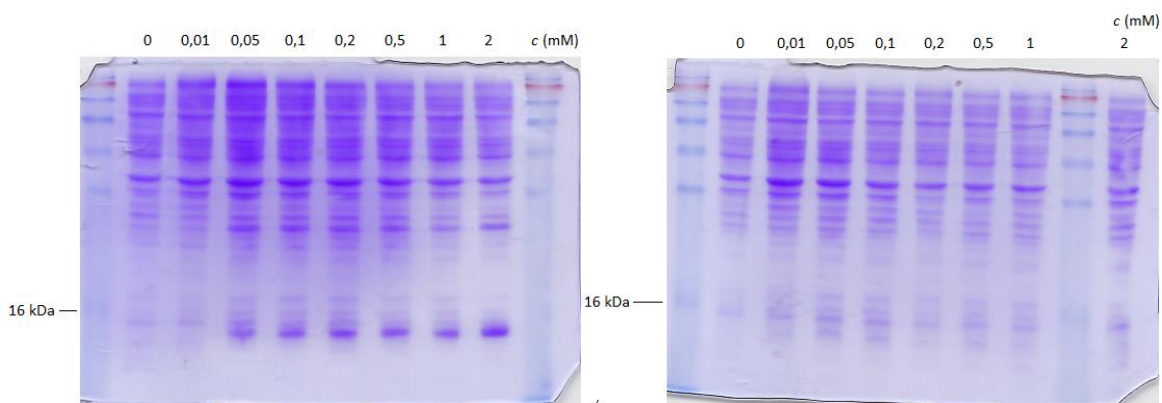
Všechny předpokládané fragmenty byly v gelu opravdu vidět (obr. 26) a vzorky nově připravených plasmidů byly proto odeslány k sekvenování do Střediska sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky. Získané sekvence odpovídaly teoretickým, které jsou uvedeny na začátku této kapitoly (obr. 22, str. 55) a připravený plasmid kódující DNA vazebnou doménu proteinu *TEAD1* byl dále využit k produkci tohoto proteinu.

## 5.2. Výběr vhodných podmínek produkce

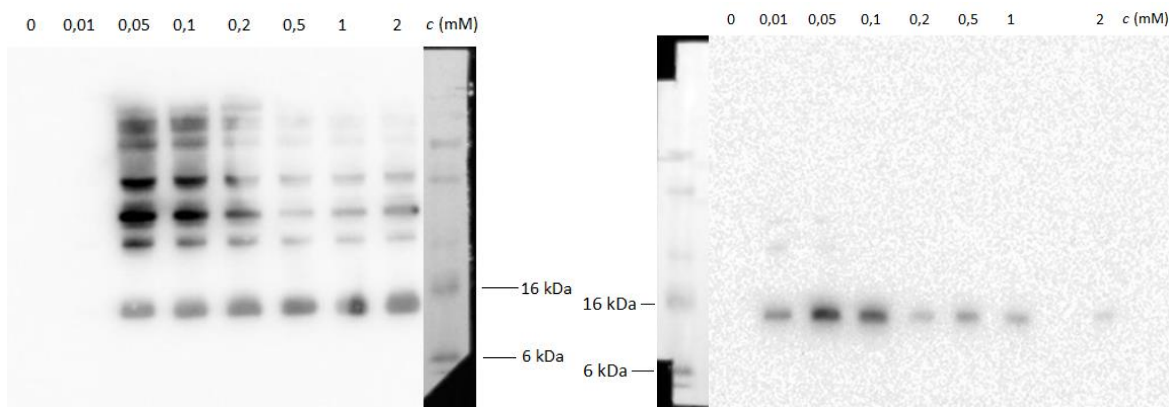
### 5.2.1. Optimalizace koncentrace induktoru a výběr vhodného produkčního kmene

Konstruktem připraveným v předchozí kapitole s insertem kódujícím DNA vazebnou doménu TEAD1 proteinu s polyhistidinovou kotvou, jehož produkci lze indukovat přidáním IPTG, byly transformovány dva porovnávané bakteriální kmeny: BL21-Gold (DE3) a BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. U obou byly testovány různé koncentrace induktoru s cílem dosáhnout co největšího výtěžku produkce.

Testovány byly koncentrace IPTG 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 a 2 mM. Proteiny v získaných vzorcích byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 27) a elektropřenosu s imunodetekcí (obr. 28, str. 62). Velikost připravovaného proteinu s polyhistidinovou kotvou by měla být 11,824 kDa.



Obr. 27: Optimalizace koncentrace induktoru a výběr produkčního kmene – SDS-PAGE gely obarvené CBB. Na levém gelu jsou vzorky z CodonPlus RIPL buněk, na pravém z Gold buněk.



Obr. 28: Optimalizace koncentrace induktoru a výběr vhodného produkčního kmene – elektropřenos po imunodetekci protilátkou proti polyhistidinové kotvě. Na levé membráně jsou vzorky z CodonPlus RIPL buněk, na pravé z Gold buněk.

DNA vazebné doměně proteinu TEAD1 se velikostí nejvíce blíží proužek viditelný na membránách obou elektropřenosů a na gelu se vzorky z CodonPlus RIPL buněk mezi proužky markeru o velikostech 6 a 16 kDa. Nicméně tento proužek velikostí odpovídá přibližně 15 kDa, což je více, než je teoretická hodnota molekulové hmotnosti připravovaného proteinu, která s polyhistidinovou kotvou činí 11,824 kDa. Abychom se ujistili, že se opravdu jedná o DNA vazebnou doménu proteinu TEAD1, byl tento proužek z gelu vyříznut a po štěpení trypsinem identifikován metodou peptidového mapování pomocí hmotnostní spektrometrie (kapitola 5.2.1.).

Při porovnání gelů i membrán se vzorky z Gold buněk a CodonPlus RIPL buněk je vidět, že mnohem více proteinu se tvoří při produkci v buněčném kmeni CodonPlus RIPL. Při produkci v buňkách Gold není produkovaný protein na gelu obarveném CBB vidět vůbec a na membráně po elektropřenosu jen velmi slabě. Pro produkci TEA domény byl tedy zvolen bakteriální kmen BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL.

Jako optimální koncentrace IPTG pro produkci TEA domény v CodonPlus RIPL buňkách bylo s ohledem na spotřebu induktoru zvoleno 0,2 mM.

### 5.2.1. Peptidové mapování

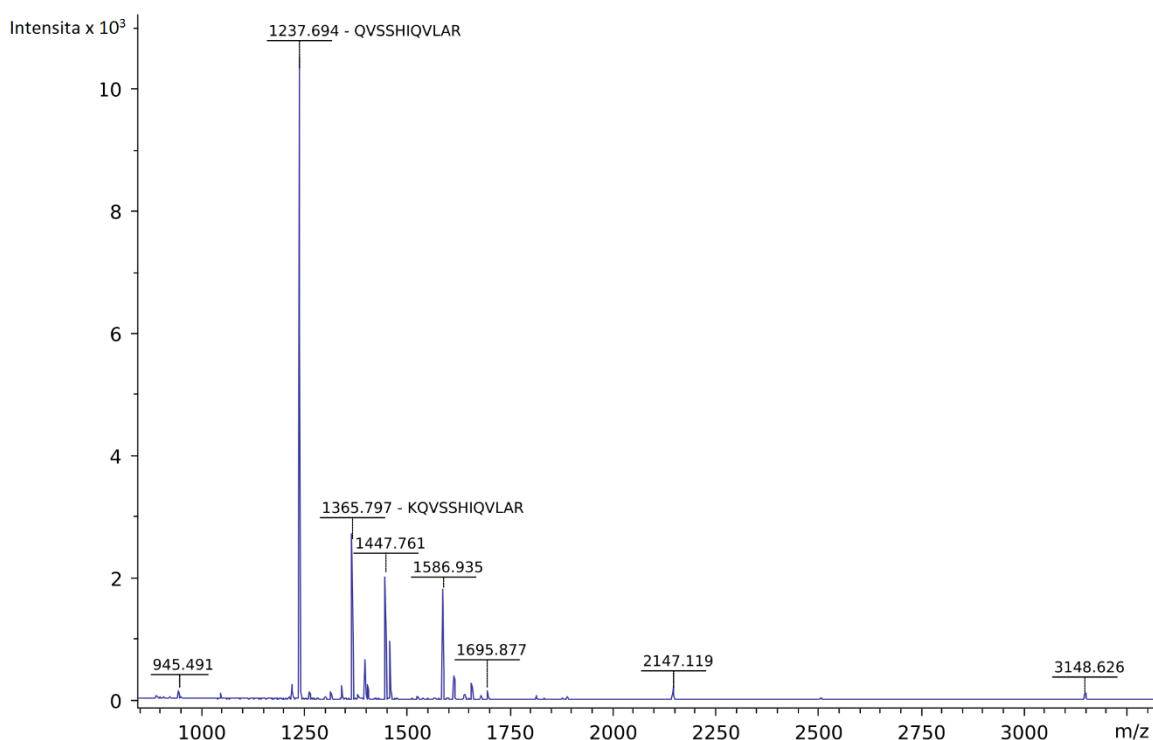
Nejsilnější proužek z SDS-PAGE gelu z optimalizace koncentrace IPTG v CodonPlus RIPL buňkách indukovaný 0,2 mM IPTG (obr. 27, str. 61) ležící mezi proužky markeru 6 a 16 kDa byl z gelu vyříznut a štěpen trypsinem. Vzniklé peptidy byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru v uspořádání MALDI-TOF/TOF. Výsledné spektrum bylo porovnáno s databází SwissProt pomocí algoritmu Mascot, která k němu přiřadila lidský

protein TEAD1.

Na obrázku 29 je zobrazena primární sekvence DNA vazebné domény s histidinovou kotvou. Vyznačeny jsou aminokyseliny lysin a arginin, za kterými štěpí trypsin. Dále jsou vyznačeny také peptidy, které byly nalezeny v získaném spektru (obr. 30).

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSADKPIDNDAEGVWSPDIEQSFQEALAIY  
PPCGRRKIILSDEGKMYGRNELIARYIKLRITGKTRTRQVSSHIQVLAR  
KSRD

Obr. 29: Primární sekvence připravované DNA vazebné domény proteinu TEAD1 s histidinovou kotvou. Zeleně jsou vyznačeny aminokyseliny lysin a arginin, za kterými je zásahové místo pro trypsin. Fialově jsou vyznačeny peptidy, které byly nalezeny v hmotnostním spektru

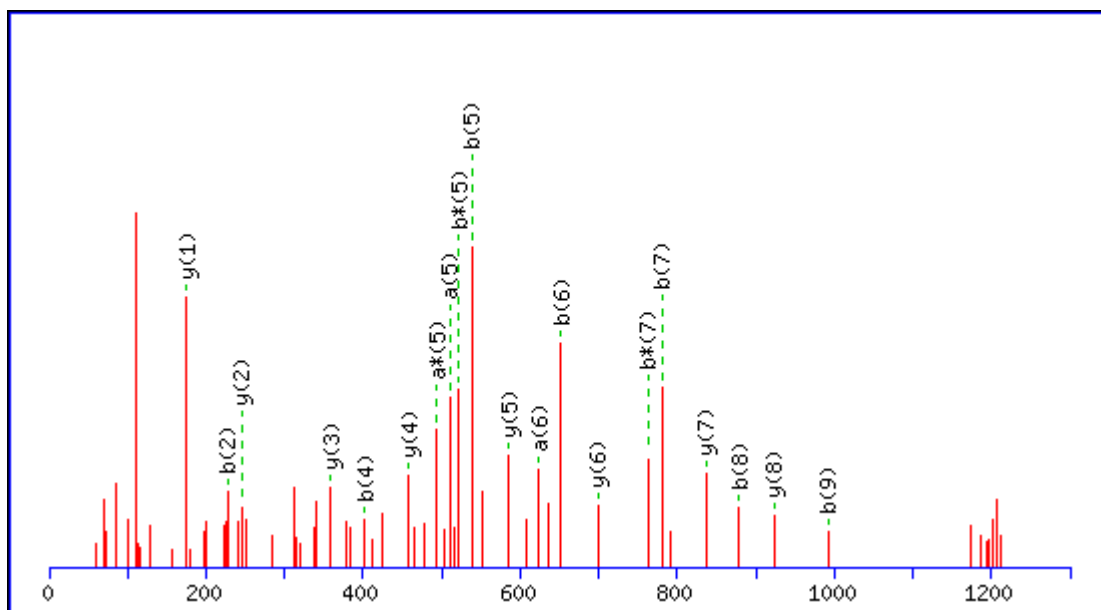


Obr. 30: Hmotnostní spektrum DNA vazebné domény TEAD1 po štěpení trypsinem

Identita peptidů QVSSHIQVLAR a KQVSSHIQLAR byla potvrzena také pomocí MS/MS. Kolizní spektra jsou zobrazena na obr. 31 a 32 (str. 64 a 65) a data k nim jsou uvedena v tab. 12 (str. 64) a 13 (str. 65) Tyto dva peptidy se liší pouze o jeden lysin na začátku, který v části případů byl a v části nebyl trypsinem odštěpen.

Ostatní peptidy, které by měly po štěpení trypsinem teoreticky vzniknout, nebyly ve spektru nalezeny proto, že byly pro měření za daných podmínek příliš malé nebo naopak příliš velké.

Ve spektru na obr. 30 jsou vidět i některé další píky, které proteinu TEAD1 nepatří. Nejspíš pocházejí z některého z bakteriálních proteinů, který putoval na SDS-PAGE stejně jako DNA vazebná doména proteinu TEAD1.

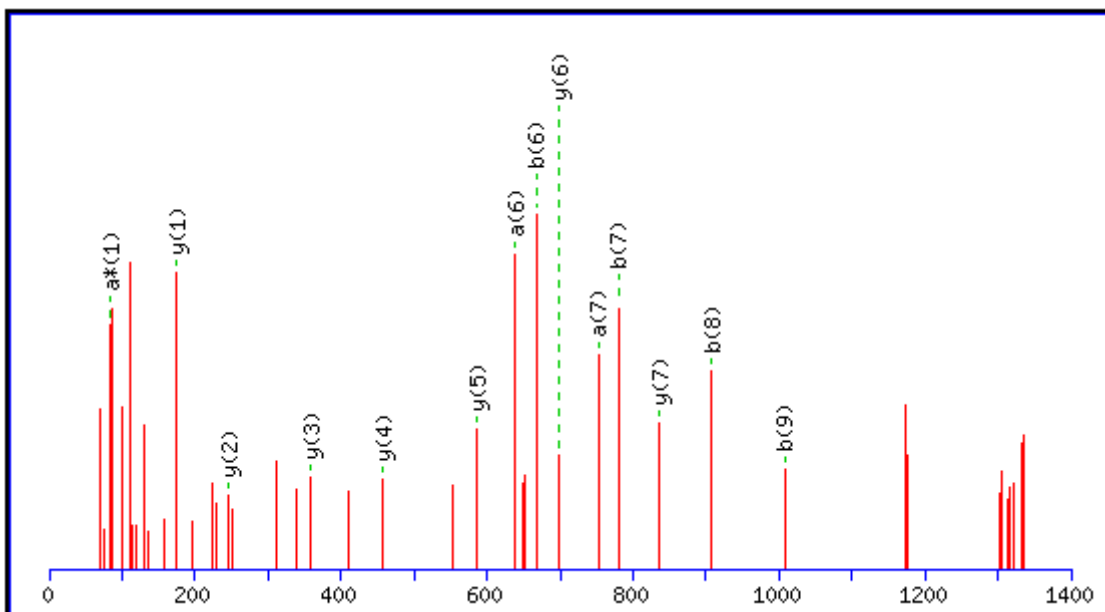


Obr. 31: Kolizní spektrum píky o  $m/z$  1237,7 (peptid QVSSHIQVLAR)

Tab. 12: Ionty, které měly teoreticky vzniknout v kolizním spektru peptidu QVSSHIQVLAR. Červeně jsou vyznačeny ty, které v něm byly opravdu nalezeny

Sekvence	Typ iontu	$m/z$	Typ iontu	$m/z$
Q	1	129.0659	11	1109.6426
V	2	<b>228.1343</b>	10	1010.5742
S	3	315.1663	9	<b>923.5421</b>
S	4	<b>402.1983</b>	8	<b>836.5101</b>
H	5	<b>539.2572</b>	7	<b>699.4512</b>
I	b 6	<b>652.3413</b>	y 6	<b>586.3671</b>
Q	7	<b>780.3999</b>	5	<b>458.3085</b>
V	8	<b>879.4683</b>	4	<b>359.2401</b>
L	9	<b>992.5524</b>	3	<b>246.1561</b>
A	10	1063.5895	2	<b>175.1190</b>
R	11		1	1109.6426





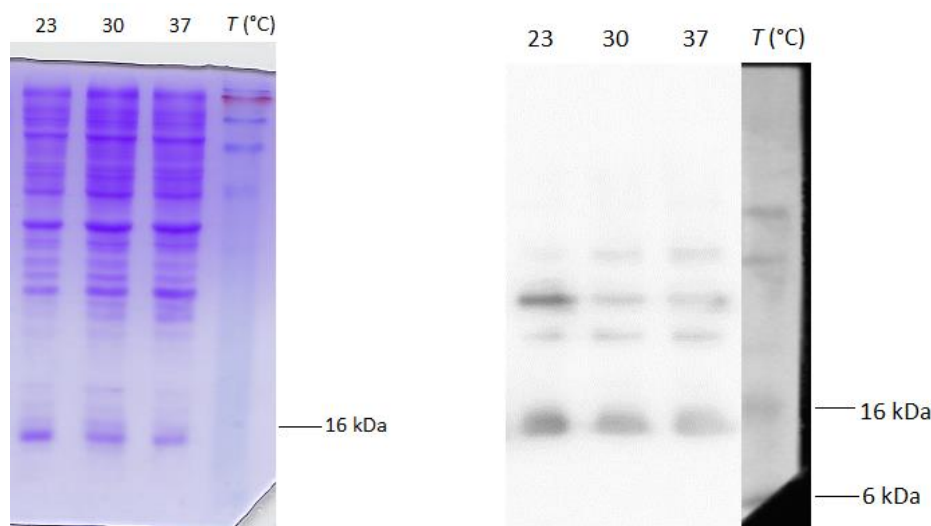
Obr. 32: Kolizní spektrum píku o  $m/z$  1365,8 (peptid KQVSSHIQVLAR)

Tab. 13: Ionty, které měly teoreticky vzniknout v kolizním spektru peptidu KQVSSHIQVLAR. Červeně jsou vyznačeny ty, které v něm byly opravdu nalezeny

Sekvence	Typ iontu	$m/z$	Typ iontu	$m/z$
Q	1	129.1022	11	1237.7011
V	2	257.1608	10	1109.6426
S	3	356.2292	9	1010.5742
S	4	443.2613	8	923.5421
H	5	530.2933	7	<b>836.5101</b>
I	b 6	<b>667.3522</b>	y 6	<b>699.4512</b>
Q	7	<b>780.4363</b>	5	<b>586.3671</b>
V	8	<b>908.4948</b>	4	<b>458.3085</b>
L	9	<b>1007.5633</b>	3	<b>359.2401</b>
A	10	1120.6473	2	<b>246.1561</b>
R	11		1	<b>175.1190</b>

### 5.2.2. Výběr vhodné produkční teploty

Testovány byly teploty 23, 30 a 37 °C. Vzorky získané při produkci TEA domény při těchto teplotách byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE a elektropřenosu s imunodetekcí (obr. 33). Stejně jako při optimalizaci koncentrace induktoru byla hledána teplota, při které se produkuje nejvíce připravovaného proteinu.

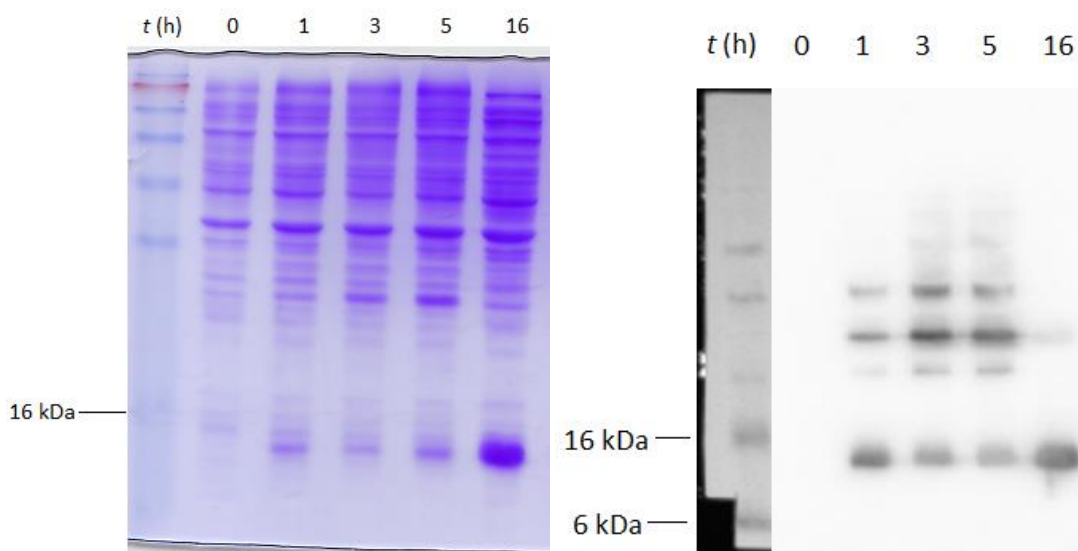


Obr. 33. Výběr vhodné produkční teploty. Vlevo je SDS-PAGE gel obarvený CBB, vpravo membrána po elektropřenosu a imunodetekci

Nejvíce proteinu se z testovaných teplot produkovalo při 23 °C. V gelu i na membráně po elektropřenosu je v této dráze vidět nejsilnější proužek o velikosti odpovídající TEA doméně (obr. 33). Tato teplota tedy byla zvolena jako nejvhodnější pro produkci připravovaného proteinu.

### 5.2.3. Výběr vhodné doby produkce

Poslední z testovaných podmínek produkce byla její doba trvání. Testována byla produkce dlouhá 0, 1, 3, 5 a 16 h. Stejným způsobem jako u předchozích parametrů, byla i v tomto případě hledána taková doba produkce, při které lze dosáhnout nejvyšších výtěžků. Vzorky byly, stejně jako v předchozích kapitolách, analyzovány pomocí SDS-PAGE a elektropřenosu s imunodetekcí (obr. 34, str. 67).



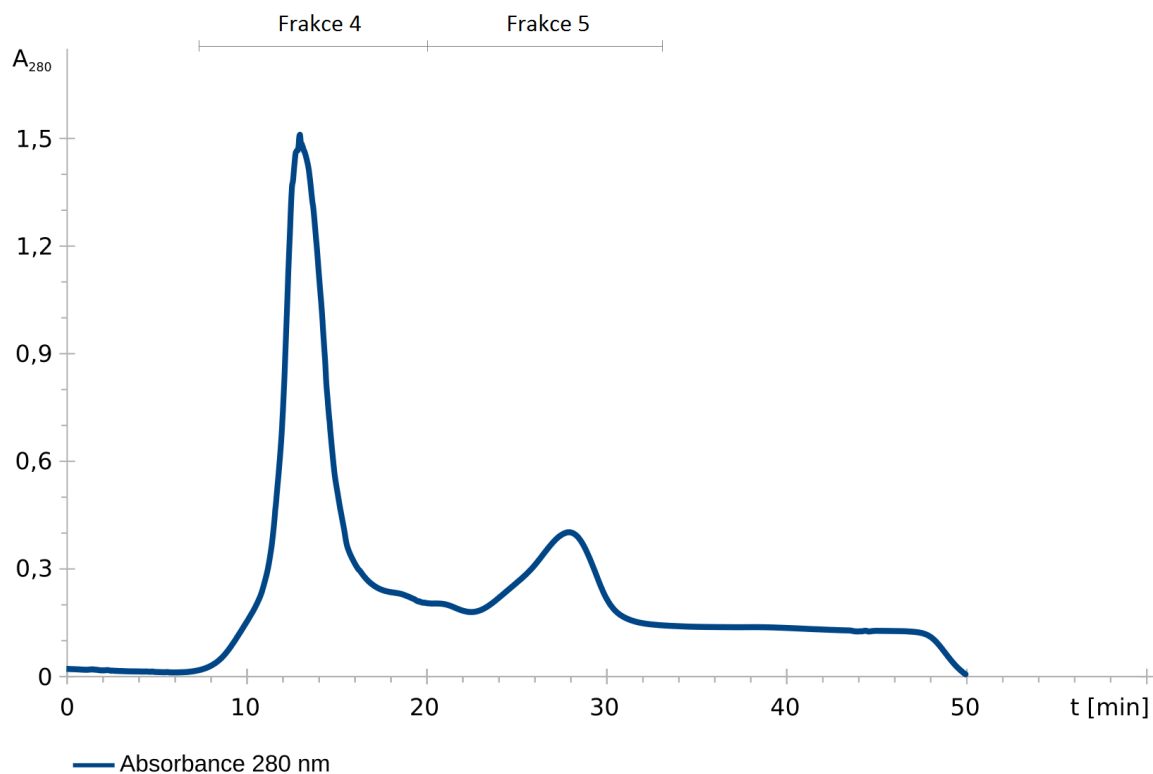
Obr. 34: Výběr vhodné doby produkce. Vlevo je SDS-PAGE gel obarvený CBB, vpravo membrána po elektropřenosu

Zdaleka nejvýraznější proužek odpovídající velikosti TEA domény se nachází v dráze se vzorkem po nejdelsí, šestnáctihodinové, produkci a tato doba byla proto zvolena jako nejvhodnější pro další práci.

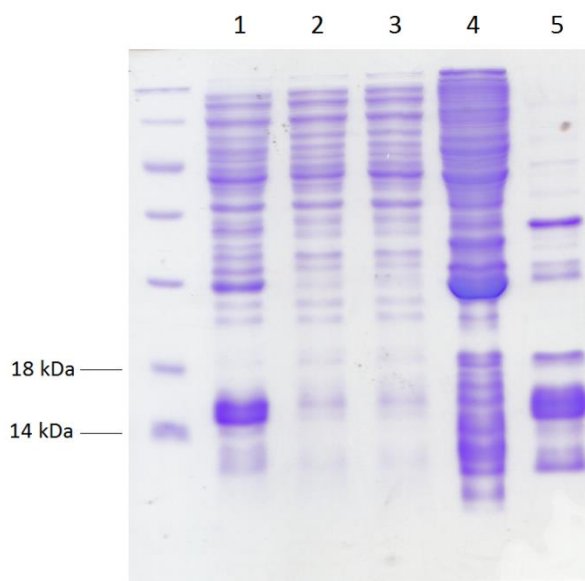
### 5.3. Purifikace

#### 5.3.1. Afinitní chromatografie

Protein byl za podmínek, které byly zvoleny jako nejvhodnější, produkován ve velkém objemu média, odkud byl následně izolován a vzniklý lyzát byl nanesen na chromatografickou kolonu Ni-NTA. Na tuto kolonu se přes  $\text{Ni}^{2+}$  ionty vázané na jejím nosiči selektivně vážou proteiny s polyhistidinovou kotvou, které lze později odtud zase uvolnit pomocí imidazolu. Byl vytvořen záznam průběhu eluce proteinů zachycených na koloně gradientem imidazolu měřením absorbance roztoku vycházejícího z kolony při 280 nm (obr. 35, str. 68). V průběhu celé chromatografie byly sbírány frakce a obsah proteinů v těchto frakcích byl vyhodnocen pomocí SDS-PAGE (obr. 36, str. 68).



Obr. 35: Záznam průběhu eluce proteinů z Ni-NTA kolony gradientem imidazolu



Obr. 36. Průběh afinitní chromatografie. **1** – nanáška na kolonu, **2, 3** – frakce, které se nezachytily na koloně, **4** – 10-20 min eluce gradientem imidazolu, **5** – 20-30 min eluce gradientem imidazolu

Na obrázku 36 je DNA vazebná doména proteinu TEAD1 přítomna v nanášce na kolonu (silný proužek mezi markery odpovídajícími velikostem 14 a 18 kDa) a ve frakci číslo 5, která byla eluována z kolony gradientem imidazolu a na obr. 35 odpovídá menšímu

z píků, který se z kolony uvolnil až později, při vyšší koncentraci imidazolu v mobilní fázi. Ve frakcích 2 a 3 jsou přítomny proteiny, které se na koloně nezachytily a byly tedy v tomto purifikačním kroku odděleny od připravovaného proteinu. Frakce 4 (vyšší z píků na obr. 35, str. 68) obsahuje proteiny, které se sice na koloně zachytily, ale protože neobsahovaly polyhistidinovou kotvu, byly snadno uvolněny už při nižší koncentraci imidazolu v mobilní fázi, čímž došlo k další purifikaci připravované TEA domény.

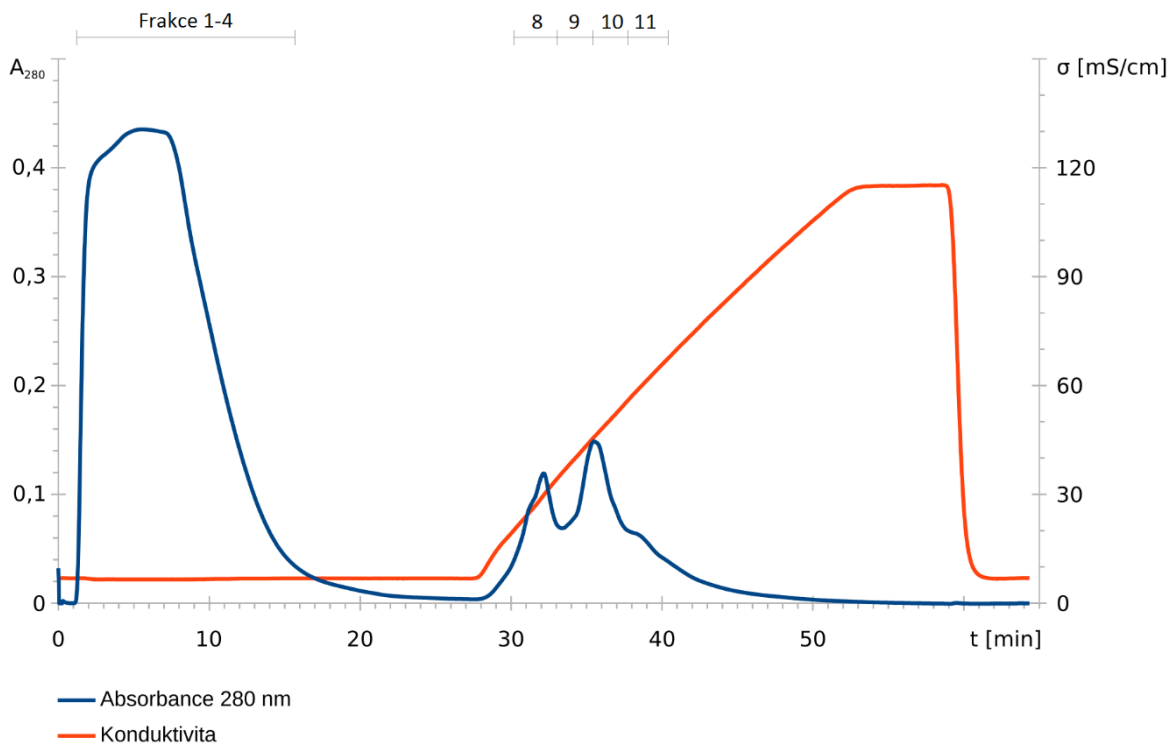
Přestože použitá chelatační chromatografie by za daných podmínek měla selektivně vychytávat pouze proteiny obsahující polyhistidinovou kotvu, obsahuje frakce 5 (obr. 36, str. 68) kromě TEA domény i několik dalších proužků různých velikostí. Některé z těchto proužků byly z gelu vyříznuty a po štěpení trypsinem identifikovány technikou peptidového mapování.

Identifikované bakteriální proteiny (SlyD, protein regulující příjem železa „ferric uptake regulation protein“ a 30S ribosomální protein S15) měly ve své sekvenci oblast obsahující několik histidinů jdoucích za sebou, což bylo zřejmě důvodem toho, proč se na Ni-NTA koloně zachytily. Těchto proteinů bylo potřeba se zbavit v dalších purifikačních krocích.

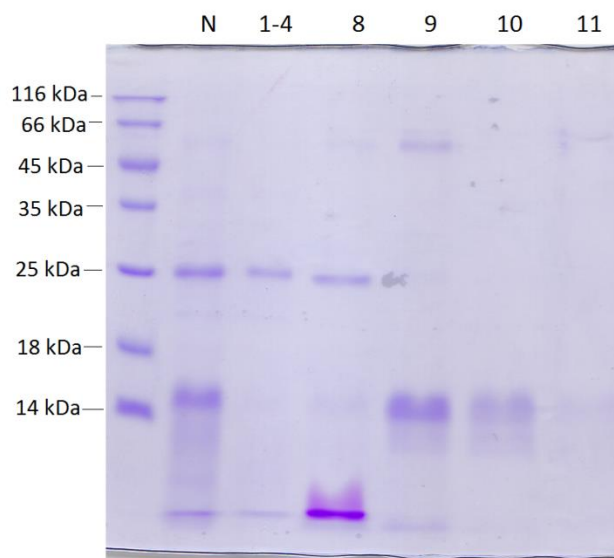
### 5.3.2. Iontově výměnná chromatografie

K odstranění proteinů, které se nespecificky zachytily na Ni-NTA koloně, bylo po odsolení dialýzou využito další chromatografické techniky, a to iontově výměnné chromatografie. Tato metoda rozděluje proteiny podle hodnoty jejich pI. Použitá Mono S kolona je silný katex a proto pevněji zadržuje proteiny, které mají v daném pH mobilní fáze kladný náboj, jako je právě TEA doména, jejíž pI je predikováno na 10, a v prostředí o pH 7,4 tedy bude kladně nabitá. Proteiny zachycené na Mono S koloně lze dále rozdělit jejich postupným uvolňováním gradientem NaCl v mobilní fázi. Proteiny, které na ní drží nejpevněji, budou uvolněny později, při vyšších koncentracích NaCl než proteiny, které tam drží jen slabě.

V průběhu celé chromatografie byla sledována absorbance při 280 nm a konduktivita roztoku vycházejícího z kolony (obr. 37, str. 70). Zároveň byly sbírány frakce, které byly poté analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 38, str. 70).



Obr. 37: Záznam průběhu iontové výměnné chromatografie. Konduktivita roztoku vycházejícího z kolony závisí na koncentraci NaCl v mobilní fázi a roste proto s jejím gradientem.



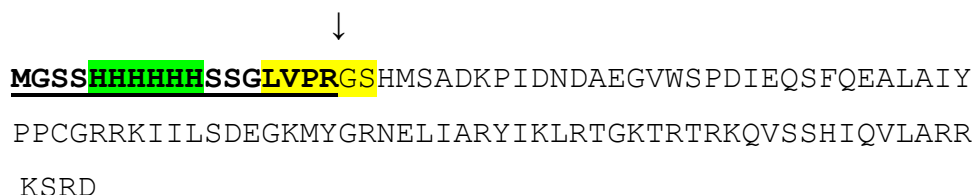
Obr. 38: Vybrané frakce zachycené v průběhu iontové výměnné chromatografie. **N** – nanáška na kolonu, **1-4** – frakce, které se na koloně nezachytily, **8**- 30-33 min, **9, 10** – 33-38 min, **11** – 38-41 min

Ve shodě s očekáváním se TEA doména na Mono S koloně opravdu držela silněji než ostatní proteiny. Na obrázku 38 je vidět v nanášce a ve frakcích 9 a 10, které odpovídají

vyššímu z píků na obr. 37 (str. 70), který se z kolony eluuje později (při vyšší koncentraci NaCl v mobilní fázi). Pomocí iontové výměnné chromatografie se podařilo oddělit všechny proteiny přítomné ve frakcích 1-4 a 8. Ve frakcích 9 a 10 je kromě TEA domény přítomno už jen nepatrné množství proteinu o velikosti přibližně 50 kDa. Tento protein byl později oddělen pomocí gelové permeační chromatografie.

### 5.3.3. Odštěpení histidinové kotvy

V dalším kroku byla odštěpena polyhistidinová kotva pomocí proteasy thrombin, která štěpí specifickou sekvencí vloženou mezi kotvu a připravovaný protein. Histidinová kotva i zásahové místo pro thrombin jsou v primární sekvenci DNA vazebné domény proteinu TEAD1 vyznačeny na obr. 39. Monoisotopická hmotnost připravovaného proteinu s histidinovou kotvou by měla být 11,817 kDa a po odštěpení kotvy pak 9,936 kDa.



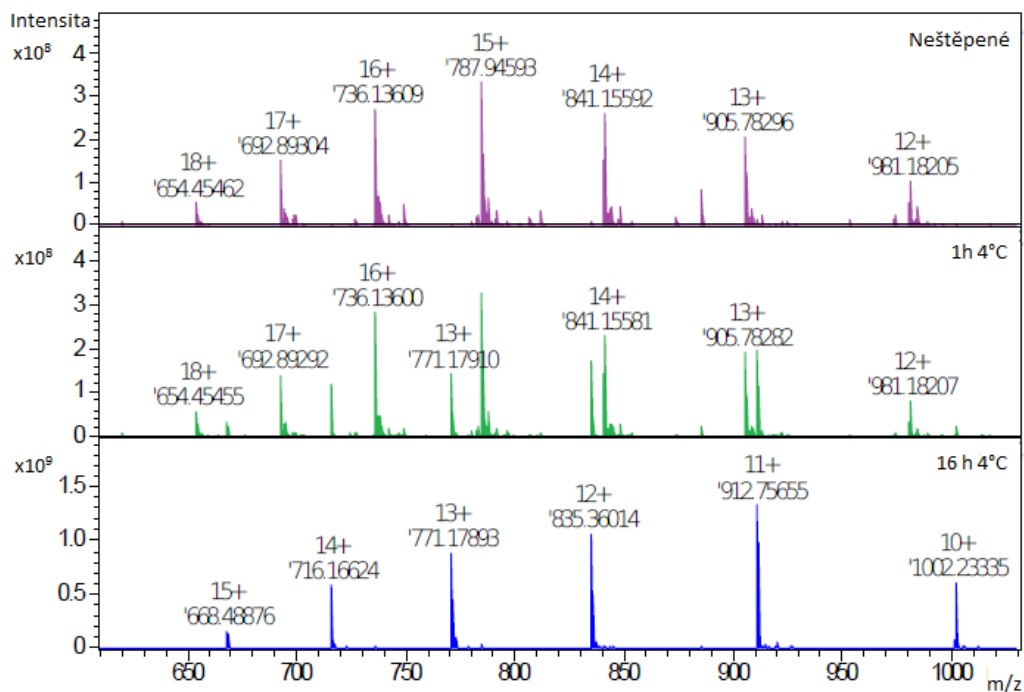
Obr. 39: Primární sekvence DNA vazebné domény TEAD1 s polyhistidinovou kotvou. **Zeleně** je vyznačena histidinová kotva, **žlutě** pak zásahové místo pro thrombin. Šipka označuje místo štěpení, podtržena je ta část proteinu, která se oddělí.

Vzorky štěpeného a neštěpeného proteinu byly nejprve analyzovány pomocí SDS-PAGE, ale rozdíl v jejich velikosti byl příliš malý na to, aby šly jednotlivé formy na gelu rozlišit. Bylo proto využito hmotnostní spektrometrie o vysokém rozlišení k určení přesné hmotnosti proteinů ve vzorcích. Hmotnostní spektra neštěpeného vzorku, vzorku po 1 h štěpení a vzorku štěpeného 16 h jsou uvedena na obr. 40 (celé spektrum) a 41 (přiblížené) (oba str. 72).

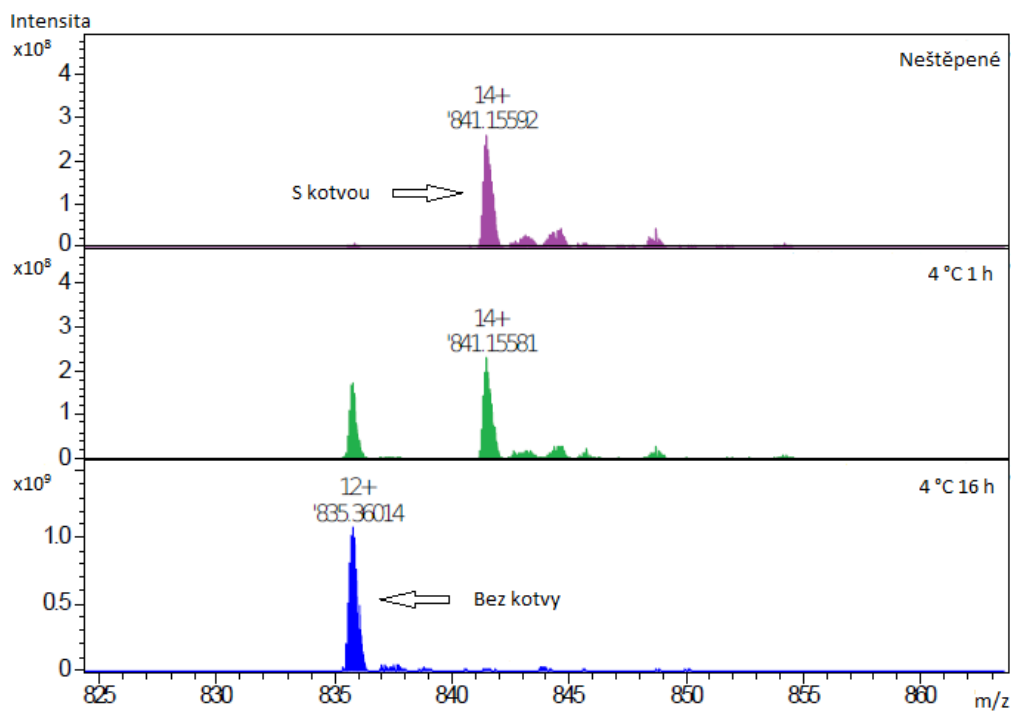
Po dekonvoluci byla vypočtena přesná hmota v jednotlivých vzorcích. V neštěpeném vzorku byla nejčastější hmota 11763,08 Da. Hmotnost TEA domény s histidinovou kotvou a bez koncového methioninu je 11686,02 Da. Rozdíl těchto dvou hmot je 77,06 Da, což odpovídá molekulové hmotnosti 2-merkptoethanolu použitému k redukci -SH skupiny cysteinu při afinitní chromatografii, který na této skupině zůstal navázaný. Druhá nejčastější hmota v neštěpeném vzorku (11805,09 Da) se od té nejčastější liší o 42 Da, což

je posun odpovídající acetylaci.

Ve štěpených vzorcích byla nejčastější hmota 10013,24 Da, která se od 9936 Da opět liší o 77,06 Da (2-merkapt ethanol). Acetylace se ve štěpených vzorcích už nevyskytuje, odštěpila se s N-koncem.



Obr. 40: Hmotnostní spektrum mapující průběh odštěpení histidinové kotvy thrombinem



Obr. 41: Přibližná část hmotnostního spektra z obr. 40 v oblasti 800 – 900 m/z



Na obr. 40 (str. 72) je vidět, že po odštěpení histidinové kotvy klesá množství píků ve spektru. Tyto malé píky jsou nejspíš produktem rozpadu proteinu od N-konce a s odštěpením kotvy, která se na tomto konci nachází, vymizí.

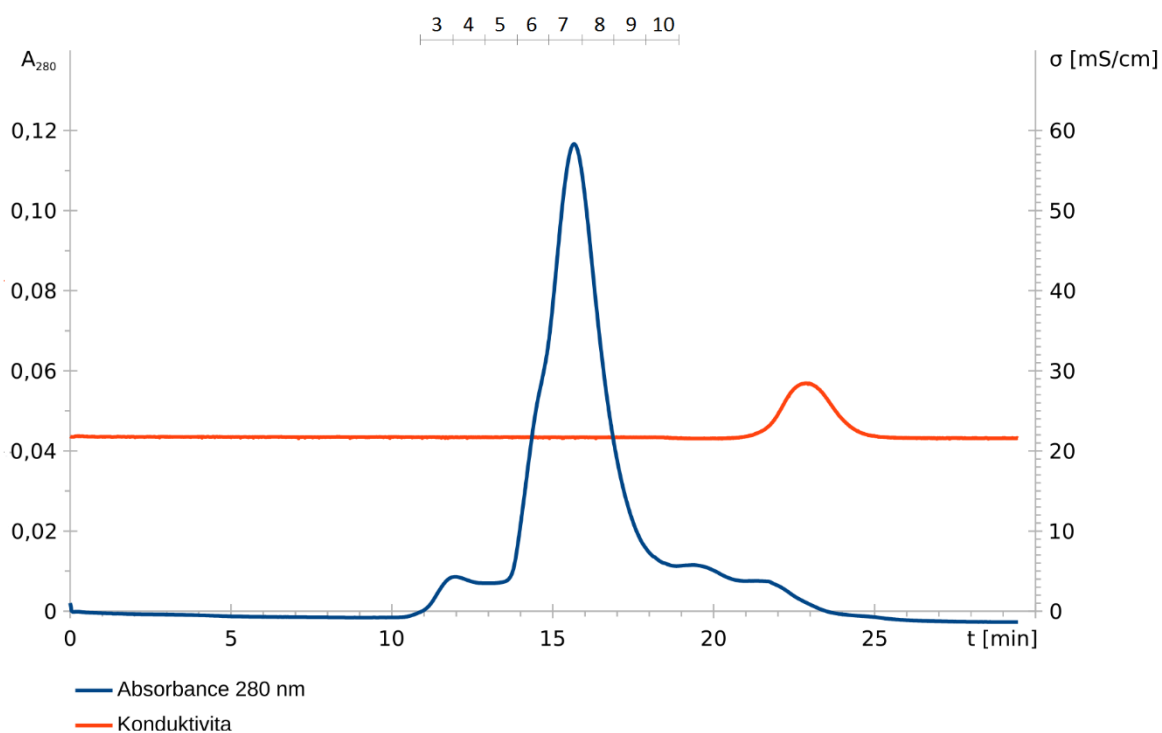
Obrázek 41 (str. 72) pak dokumentuje postupné ubývání vyšší hmoty (protein s histidinovou kotvou) a přibývání hmoty nižší (po odštěpení kotvy). Už po jedné hodině štěpení thrombinem intenzita píků neštěpeného proteinu výrazně klesá a po 16 h je prakticky všechen připravovaný protein zbaven histidinové kotvy.

#### 5.3.4. Gelová permeační chromatografie

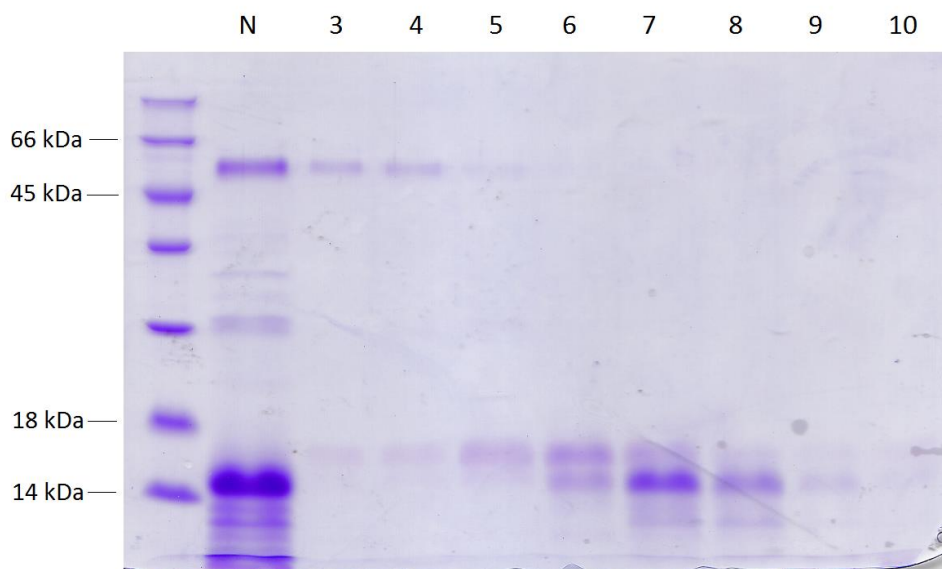
Posledním purifikačním krokem, ve kterém byla od připravované DNA vazebné domény proteinu TEAD1 oddělena odštěpená histidinová kotva, thrombin a zbývající bakteriální proteiny, byla gelová permeační chromatografie. Tato metoda rozděluje proteiny podle jejich velikosti. Největší proteiny vyjdou z kolony jako první, zatímco menší jsou zadržovány v pórech gelu a vycházejí proto až později.

Po štěpení thrombinem byl vzorek koncentrován a nanesen na kolonu. Stejně jako u iontové výměnné chromatografie, byla i v tomto případě sledována absorbance při 280 nm a konduktivita roztoku vytékajícího z kolony (obr. 42, str. 74). Zároveň byly v průběhu chromatografie sbírány frakce, ve kterých bylo následně složení proteinů analyzováno pomocí SDS-PAGE (obr. 43, str. 74).

Z obrázků 42 a 43 (str. 74) je patrné, že pomocí gelové permeační chromatografie se podařilo oddělit prakticky všechny zbývající bakteriální proteiny. Ve frakcích 7 a 8 zůstává čistá DNA vazebná doména proteinu TEAD1, kterou bude možné později využít k analýze strukturní podstaty její interakce s DNA.



Obr. 42: Záznam průběhu gelové permeační chromatografie. Pík na konci záznamu konduktivity značí čas, kdy z kolony vycházejí soli.



Obr. 43: SDS-PAGE gel frakcí zachycených v průběhu gelové permeační chromatografie. N – nanáška. **3,4** – malý pík mezi 11 a 13 min (obr. 42). **5, 6** – první polovina vysokého píku (13 – 15 min). **7, 8, 9** – druhá polovina vysokého píku (15 – 18 min), **10** – 18 – 19 min

## 6. Diskuse

V rámci této práce byla připravována DNA vazebná doména lidského proteinu TEAD1. TEAD proteiny jsou transkripční faktory, které ve spolupráci se svými koaktivátory v organismu zodpovídají za regulaci exprese proteinů ovlivňujících růst a diferenciaci buněk nebo brání apoptose<sup>51,61</sup>. Aktivita TEAD proteinů je přísně regulována prostřednictvím Hippo signalizační dráhy a tvorby komplexů s jejich koaktivátory<sup>45,51,56,58</sup>. Přestože je funkce TEAD transkripčních faktorů nezbytná pro správný vývoj velké části tkání a orgánů, vede jejich deregulace v dospělosti k rozvoji nádorových onemocnění<sup>84-86</sup>.

Výše zmíněné vlastnosti činí z TEAD proteinů zajímavý cíl pro vývoj nových látek určených k léčbě rakoviny. Jednou z možností, jak snížit aktivitu TEAD proteinů je zabránit tvorbě jejich komplexů s koaktivátory pomocí vhodného inhibitoru a bylo už nalezeno několik molekul, které tuto schopnost mají<sup>92-95</sup>. Další možností, jak inhibovat expresi TEAD proteiny regulovaných proteinů, by mohlo být zabránění vazbě TEAD transkripčních faktorů na DNA. K navržení léčiva fungujícího na tomto principu je potřeba nejprve znát přesný způsob, jakým se TEAD na DNA váže. Přestože struktura samotné TEA domény byla vyřešena pomocí NMR spektroskopie a rentgenové krystalografie, přesná strukturní podstata dynamiky její vazby na DNA stále ještě známa není<sup>38,39</sup>. TEA doména připravená v této práci bude následně využita právě pro strukturní charakterizaci jejích interakcí s DNA pomocí metod strukturní hmotnostní spektrometrie, které by v kombinaci s již dříve publikovanými NMR a krystalografickými daty měly být dostatečným podkladem pro vývoj léčiva schopného inhibovat vznik komplexu proteinu TEAD s DNA.

Na začátku práce byly připraveny dva plasmidy s inserty kódujícími protein TEAD1 a jeho DNA vazebnou doménu. Pomocí polymerasové řetězové reakce byly nejprve oba inserty amplifikovány a délka produktů PCR reakce byla ověřena agarosovou elektroforézou.

Protože se nepodařilo inserty po štěpení restrikcími enzymy, jejichž zásahová místa byla součástí primerů využitých pro PCR amplifikaci, vložit rovnou do expresního vektoru pET-28a(+), byla použita složitější cesta přes klonovací vektor pBluescript. Výhodou tohoto vektoru je možnost zvolit z kolonií vyrostlých na misce po transformaci takové, které obsahují vložený insert a ne jen prázdný vektor, metodou zvanou modro-bílá selekce. Zároveň bylo možné sem insert vložit bez předchozího štěpení restriktasami v jednom

kroku za využití enzymu *SmaI*, který vytváří tupé konce. Restriční endonukleasa *NdeI*, jejíž zásahové místo bylo součástí jednoho z primerů, totiž potřebuje pro svou optimální funkci přítomnost šesti dalších párů bází mezi jejím zásahovým místem a koncem štěpeného řetězce DNA. Tento přesah po PCR amplifikaci s využitím primerů uvedených na počátku kapitoly 4 v insertu chyběl, což bylo nejspíš příčinou neúspěchu při pokusech vložit inserty rovnou do expresního vektoru.

Po ligaci do vektoru pBluescript byly restriční analýzou zvoleny bakteriální klony se správným insertem. Z těchto klonů bylo izolováno větší množství plasmidů, které byly následně štěpeny restričními endonukleasami *EcoRI* a *NdeI*. V tomto případě už problém s chybějícím přesahem odpadl (přesah byl tvořen vektorem pBluescript). Následně byly inserty úspěšně vloženy do expresního vektoru pET-28a(+), což bylo ověřeno restriční analýzou s několika různými endonukleasami a také DNA sekvenováním.

Byl zvolen vhodný produkční bakteriální kmen pro přípravu DNA vazebné domény proteinu TEAD1. Testovány byly buňky BL21-Gold (DE3), které jsou běžně v naší laboratoři používány k produkci rekombinantních proteinů a buňky BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, které byly použity autory článku o strukturní charakterizaci TEA domény pomocí NMR k její přípravě<sup>38</sup>. Ukázalo se, že buněčný kmen BL21-Gold (DE3), ve kterém proběhl pokus o produkci nejdříve, pro přípravu TEA domény vhodný není. Výtěžky byly v těchto buňkách tak malé, že ani po afinitní purifikaci na Ni-NTA koloně nebyl na SDS-PAGE gelu po obarvení CBB ani stříbrem žádný proužek o velikosti TEA domény vidět a pro jeho zobrazení musel být využit elektropřenos s imunodetekcí, který má vyšší citlivost.

Optimalizace koncentrace induktoru proto byla rovnou spojena s porovnáním výtěžků při produkci v původních buňkách (BL21-Gold (DE3)) a v buněčném kmeni BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, použitém autory článku o NMR struktuře TEA domény. V tomto buněčném kmeni se připravovaného proteinu produkovalo již o poznání více a další produkce proto probíhaly už jen v něm. Rozdíl mezi oběma použitými buněčnými kmeny je v tom, že BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL ve svém genomu obsahuje více kopií genů kódujících tRNA s kodony obvyklými v lidských genech, kterých by bakterie v normálním stavu mohla mít nedostatek. TEAD1 je lidský protein a opravdu ve své DNA sekvenci obsahuje několik těchto kodonů, což nejspíš limitovalo jeho produkci v buňkách BL21-Gold (DE3).

Na SDS-PAGE gelu se proužek, který by měl odpovídat TEA doméně, pohyboval stejně jako marker o velikosti 15 kDa. Protože velikost TEA domény s histidinovou kotvou měla být jen 11,8 kDa, byl tento proužek z gelu vyříznut a po štěpení trypsinem identifikován metodou peptidového mapování. Po porovnání získaného hmotnostního spektra s databází SwissProt pomocí algoritmu Mascot byl k vyříznutému proužku přiřazen lidský protein TEAD1. Zdánlivě jiná velikost připravovaného proteinu tedy byla pouze nepřesně určena elektroforézou

Pro produkci v buněčném kmeni BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL byly poté hledány vhodné podmínky. Jako optimální koncentrace IPTG bylo zvoleno 0,2 mM. Při 2 mM je sice v gelu na obr. 27 (str. 61) vidět ještě o něco málo silnější proužek, ale při využití tak vysoké koncentrace by byla také vysoká spotřeba IPTG, jehož cena není zanedbatelná. Z ostatních testovaných produkčních podmínek se jako nejvhodnější ukázala delší doba produkce při nižší teplotě a to konkrétně 16 h při 23 °C.

Za těchto podmínek byl protein produkován ve velkém objemu média a následně purifikován pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA koloně, což bylo umožněno přítomností polyhistidinové kotvy na N-konci oddělitelné proteasou thrombinem. Při prvních pokusech o afinitní purifikaci se na koloně zachytávalo společně s připravovaným proteinem i velké množství bakteriálních proteinů. To bylo nejspíš způsobeno přítomností jednoho volného cysteinu v primární sekvenci připravované TEA domény, který se tvorbou disulfidových můstků vázal na ostatní proteiny, a ty se kvůli tomu přes něj zachytávaly na koloně. Tento problém se podařilo vyřešit přidáním 2-merkptoethanolu, který funguje jako redukční činidlo, do mobilní fáze. Po přidání 2-merkptoethanolu se na koloně opravdu zachytávalo méně bakteriálních proteinů než předtím. Při eluci proteinů z Ni-NTA kolony gradientem imidazolu jsou z ní nejprve eluovány bakteriální proteiny, které na koloně nedrží tak pevně, a až při vyšší koncentraci imidazolu v mobilní fázi i TEA doména.

Protein byl dále purifikován pomocí iontově výměnné chromatografie, kde se podařilo díky vysoké hodnotě pI TEA domény oddělit většinu zbývajících bakteriálních proteinů. Tomuto purifikačnímu kroku muselo předcházet odstranění soli a 2-merkptoethanolu z roztoku proteinu. V roztoku o vysoké koncentraci soli by se proteiny na koloně ionexu nezachytily a 2-merkptoethanol zase inhibuje aktivitu thrombinu, který byl po tomto purifikačním kroku použit k odštěpení histidinové kotvy.

Polyhistidinová kotva byla následně odštěpena thrombinem. Průběh štěpení byl sledován nejprve pomocí SDS-PAGE, ale rozdíl hmotností štěpené a neštěpené formy byl nejspíš moc malý na to, aby šly od sebe v gelu odlišit. Přesná hmotnost proteinů v jednotlivých vzorcích průběhu štěpení byla proto stanovena hmotnostní spektrometrií o vysokém rozlišení. Z výsledků bylo zjištěno, že se kotvu podařilo úspěšně odštěpit a po 16 h štěpení byl prakticky všechen protein ve formě s odštěpenou kotvou. Největší část proteinu v neštěpeném vzorku se nacházela ve stavu s odštěpeným N-koncovým methioninem a s 2-merkaptoethanolem navázaným na -SH skupině cysteinu. Část proteinů v neštěpeném vzorku byla také acetylována na N-konci. 2-merkaptoethanol byl nalezen i na proteinu ve vzorku po štěpení thrombinem.

Posledním purifikačním krokem pak byla gelová permeační chromatografie, v jejímž průběhu se podařilo oddělit všechny zbývající bakteriální proteiny i odštěpenou polyhistidinovou kotvu. Do mobilní fáze byl také přidán TCEP k odstranění 2-merkaptoethanolu navázaného na cysteinu.

Po posledním purifikačním kroku byl získán přibližně 1 mg DNA vazebné domény proteinu TEAD1. Výtěžek by nejspíš bylo možné ještě zvýšit změnou podmínek při výměně pufrů dialýzou a následném koncentrování, kde docházelo k největším ztrátám kvůli precipitaci proteinu ve chvíli, kdy ho byla vysoká koncentrace v roztoku o malé koncentraci soli. Vyprodukované množství i čistota připraveného proteinu jsou nicméně dostatečné pro strukturní analýzu jeho interakce s DNA, což bylo cílem této práce.

## 7. Závěr

Byly připraveny dva konstrukty pro rekombinantní přípravu proteinu TEAD1 a jeho DNA vazebné domény. Pro produkci DNA vazebné domény proteinu TEAD1 byl nalezen vhodný produkční bakteriální kmen a to BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Dále byly nalezeny vhodné podmínky produkce. Protein byl produkován 16 h při 23 °C a jeho produkce byla indukována přidáním IPTG o konečné koncentraci v médiu 0,2 mM. Získaný protein, jehož identita byla potvrzena peptidovým mapováním, byl purifikován pomocí afinitní chromatografie, iontově výměnné chromatografie a po odštěpení polyhistidinové kotvy také gelové permeační chromatografie. Získané množství DNA vazebné domény proteinu TEAD1 i jeho čistota je dostatečná pro strukturní analýzu její interakce s DNA.

## Použitá literatura:

- (1) Normanno, D.; Dahan, M.; Darzacq, X. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1819* (6), 482–493.
- (2) Vaquerizas, J. M.; Kummerfeld, S. K.; Teichmann, S. A.; Luscombe, N. M. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10* (4), 252–263.
- (3) Johnston, S. J.; Carroll, J. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1855* (2), 183–192.
- (4) Lenhard, B.; Sandelin, A.; Carninci, P. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (4), 233–245.
- (5) Spitz, F.; Furlong, E. E. M. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (9), 613–626.
- (6) Kadonaga, J. T. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2012**, *1* (1), 40–51.
- (7) Fuda, N. J.; Ardehali, M. B.; Lis, J. T. *Nature* **2009**, *461* (7261), 186–192.
- (8) Zaret, K. S.; Mango, S. E. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2016**, *37*, 76–81.
- (9) Müller, F.; Tora, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1839* (3), 118–128.
- (10) Carrera, I.; Treisman, J. E. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2008**, *18* (5), 397–403.
- (11) Andersson, R.; Sandelin, A.; Danko, C. G. *Trends Genet.* **2015**, *31* (8), 426–433.
- (12) Gruss, P.; Dhar, R.; Khoury, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78* (2), 943–947.
- (13) Erokhin, M.; Vassetzky, Y.; Georgiev, P.; Chetverina, D. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (12), 2361–2375.
- (14) Plank, J. L.; Dean, A. *Mol. Cell* **2014**, *55* (1), 5–14.
- (15) Voss, T. C.; Hager, G. L. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15* (2), 69–81.
- (16) Guertin, M. J.; Lis, J. T. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2013**, *23* (2), 116–123.
- (17) Eguchi, A.; Lee, G. O.; Wan, F.; Erwin, G. S.; Ansari, A. Z. *Biochem. J.* **2014**, *462* (3), 397–413.
- (18) Charoensawan, V.; Wilson, D.; Teichmann, S. A. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (21), 7364–7377.
- (19) Wingender, E.; Schoeps, T.; Dönitz, J. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (Database issue), D165–D170.
- (20) Pavletich, N. P.; Pabo, C. O. *Science* **1991**, *252* (5007), 809–817.
- (21) Pavletich, N. P.; Pabo, C. O. *Science* **1993**, *261* (5129), 1701–1707.
- (22) Luscombe, N. M.; Austin, S. E.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. *Genome Biol.* **2000**, *1* (1), reviews 1–37.
- (23) Ferré-D'Amaré, A. R.; Prendergast, G. C.; Ziff, E. B.; Burley, S. K. *Nature* **1993**, *363* (6424), 38–45.
- (24) Xiao, J. H.; Davidson, I.; Ferrandon, D.; Rosales, R.; Vigneron, M.; Macchi, M.; Ruffenach, F.; Chambon, P. *EMBO J.* **1987**, *6* (10), 3005–3013.
- (25) Liu, F.; Wang, X.; Hu, G.; Wang, Y.; Zhou, J. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (6), 3308–3316.
- (26) Andrianopoulos, A.; Timberlake, W. E. *Plant Cell* **1991**, *3* (8), 747–748.
- (27) Yoshida, T. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28* (1), 8–17.
- (28) Jacquemin, P.; Hwang, J. J.; Martial, J. A.; Dollé, P.; Davidson, I. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (36), 21775–21785.
- (29) Kaneko, K. J.; DePamphilis, M. L. *Dev. Genet.* **1998**, *22* (1), 43–55.
- (30) Kaneko, K. J.; Cullinan, E. B.; Latham, K. E.; DePamphilis, M. L. *Development* **1997**, *124* (10), 1963–1973.
- (31) Yagi, R.; Kohn, M. J.; Karavanova, I.; Kaneko, K. J.; Vullhorst, D.; DePamphilis, M. L.; Buonanno,



- A. Development* **2007**, *134* (21), 3827–3836.
- (32) Chen, Z.; Friedrich, G. A.; Soriano, P. *Genes Dev.* **1994**, *8* (19), 2293–2301.
- (33) Sawada, A.; Kiyonari, H.; Ukita, K.; Nishioka, N.; Imuta, Y.; Sasaki, H. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (10), 3177–3189.
- (34) Jacquemin, P.; Sapin, V.; Alsat, E.; Evain-Brion, D.; Dollé, P.; Davidson, I. *Dev. Dyn.* **1998**, *212* (3), 423–436.
- (35) Kaneko, K. J.; Kohn, M. J.; Liu, C.; DePamphilis, M. L. *Genesis* **2007**, *45* (9), 577–587.
- (36) Yasunami, M.; Suzuki, K.; Ohkubo, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *228* (2), 365–370.
- (37) Pobbati, A. V.; Hong, W. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14* (5), 390–398.
- (38) Anbanandam, A.; Albarado, D. C.; Nguyen, C. T.; Halder, G.; Gao, X.; Veeraraghavan, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (46), 17225–17230.
- (39) Lee, D.-S.; Vonrhein, C.; Albarado, D.; Raman, C. S.; Veeraraghavan, S. *J. Mol. Biol.* **2016**, 1–12.
- (40) Mar, J. H.; Ordahl, C. P. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10* (8), 4271–4283.
- (41) Xiao, J. H.; Davidson, I.; Matthes, H.; Garnier, J. M.; Chambon, P. *Cell* **1991**, *65* (4), 551–568.
- (42) Tian, W.; Yu, J.; Tomchick, D. R.; Pan, D.; Luo, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (16), 7293–7298.
- (43) Li, Z.; Zhao, B.; Wang, P.; Chen, F.; Dong, Z.; Yang, H.; Guan, K.-L.; Xu, Y. *Genes Dev.* **2010**, *24* (3), 235–240.
- (44) Chen, L.; Chan, S. W.; Zhang, X.; Walsh, M.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. *Genes Dev.* **2010**, *24* (3), 290–300.
- (45) Vassilev, A.; Kaneko, K. J.; Shu, H.; Zhao, Y.; DePamphilis, M. L. *Genes Dev.* **2001**, *15* (10), 1229–1241.
- (46) Hilman, D.; Gat, U. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28* (8), 2403–2417.
- (47) Cao, X.; Pfaff, S. L.; Gage, F. H. *Genes Dev.* **2008**, *22* (23), 3320–3334.
- (48) Yagi, R.; Chen, L. F.; Shigesada, K.; Murakami, Y.; Ito, Y. *EMBO J.* **1999**, *18* (9), 2551–2562.
- (49) Macias, M. J.; Hyvönen, M.; Baraldi, E.; Schultz, J.; Sudol, M.; Saraste, M.; Oshkinat, H. *Nature* **1996**, *382* (6592), 646–649.
- (50) Oh, H.; Slattery, M.; Ma, L.; Crofts, A.; White, K. P.; Mann, R. S.; Irvine, K. D. *Cell Rep.* **2013**, *3* (2), 309–318.
- (51) 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. *Genes Dev.* **2008**, *22* (14), 1962–1971.
- (52) Stanger, B. Z. *Genes Dev.* **2012**, *26* (12), 1263–1267.
- (53) Hao, Y.; Chun, A.; Cheung, K.; Rashidi, B.; Yang, X. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (9), 5496–5509.
- (54) Zhao, B.; Li, L.; Tumaneng, K.; Wang, C.-Y.; Guan, K.-L. *Genes Dev.* **2010**, *24* (1), 72–85.
- (55) 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. *EMBO J.* **2000**, *19* (24), 6778–6791.
- (56) Mahoney, W. M.; Hong, J.-H.; Yaffe, M. B.; Farrance, I. K. G. *Biochem. J.* **2005**, *388* (1), 217–225.
- (57) Zhu, C.; Li, L.; Zhao, B. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2015**, *47* (1), 16–28.
- (58) Vaudin, P.; Delanoue, R.; Davidson, I.; Silber, J.; Zider, A. *Development* **1999**, *126* (21), 4807–4816.

- (59) Pobbati, A. V.; Chan, S. W.; Lee, I.; Song, H.; Hong, W. *Structure* **2012**, *20* (7), 1135–1140.
- (60) Jiao, S.; Wang, H.; Shi, Z.; Dong, A.; Zhang, W.; Song, X.; He, F.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wang, W.; Wang, X.; Guo, T.; Li, P.; Zhao, Y.; Ji, H.; Zhang, L.; Zhou, Z. *Cancer Cell* **2014**, *25* (2), 166–180.
- (61) Milewski, R. C.; Chi, N. C.; Li, J.; Brown, C.; Lu, M. M.; Epstein, J. a. *Development* **2004**, *131* (4), 829–837.
- (62) Watt, K. I.; Turner, B. J.; Hagg, A.; Zhang, X.; Davey, J. R.; Qian, H.; Beyer, C.; Winbanks, C. E.; Harvey, K. F.; Gregorevic, P. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (6048), 1–13.
- (63) Creemers, E. E.; Sutherland, L. B.; McAnally, J.; Richardson, J. A.; Olson, E. N. *Development* **2006**, *133* (21), 4245–4256.
- (64) Schütte, U.; Bisht, S.; Heukamp, L. C.; Kebschull, M.; Florin, A.; Haarmann, J.; Hoffmann, P.; Bendas, G.; Buettner, R.; Brossart, P.; Feldmann, G. *Transl. Oncol.* **2014**, *7* (2), 309–321.
- (65) Xia, Y.; Zhang, Y.-L.; Yu, C.; Chang, T.; Fan, H.-Y. *PLoS One* **2014**, *9* (11), publikováno online.
- (66) Zhang, H.; Pasolli, H. A.; Fuchs, E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (6), 2270–2275.
- (67) Shimomura, T.; Miyamura, N.; Hata, S.; Miura, R.; Hirayama, J.; Nishina, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443* (3), 917–923.
- (68) Lai, D.; Ho, K. C.; Hao, Y.; Yang, X. *Cancer Res.* **2011**, *71* (7), 2728–2738.
- (69) 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. *Oncogene* **2011**, *30* (10), 1229–1240.
- (70) Dong, J.; Feldmann, G.; Huang, J.; Wu, S.; Zhang, N.; Comerford, S. A.; Gayyed, M. F.; Anders, R. A.; Maitra, A.; Pan, D. *Cell* **2007**, *130* (6), 1120–1133.
- (71) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (1), E89–E98.
- (72) Xie, Q.; Chen, J.; Feng, H.; Peng, S.; Adams, U.; Bai, Y.; Huang, L.; Li, J.; Huang, J.; Meng, S.; Yuan, Z. *Cancer Res.* **2013**, *73* (12), 3615–3624.
- (73) Landin Malt, A.; Cagliero, J.; Legent, K.; Silber, J.; Zider, A.; Flagiello, D. *PLoS One* **2012**, *7* (9), publikováno online.
- (74) Landin Malt, A.; Georges, A.; Silber, J.; Zider, A.; Flagiello, D. *FEBS Lett.* **2013**, *587* (19), 3216–3223.
- (75) Nishioka, N.; Inoue, K.; 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. *Dev. Cell* **2009**, *16* (3), 398–410.
- (76) Ralston, A.; Cox, B. J.; Nishioka, N.; Sasaki, H.; Chea, E.; Rugg-Gunn, P.; Guo, G.; Robson, P.; Draper, J. S.; Rossant, J. *Development* **2010**, *137* (3), 395–403.
- (77) 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. *Cancer Res.* **2014**, *74* (15), 4170–4182.
- (78) Tamm, C.; Böwer, N.; Annerén, C. *J. Cell Sci.* **2011**, *124* (7), 1136–1144.
- (79) Kim, M.; Kim, T.; Johnson, R. L.; Lim, D.-S. *Cell Rep.* **2015**, *11* (2), 270–282.

- (80) Gupta, M. P.; Amin, C. S.; Gupta, M.; Hay, N.; Zak, R. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17* (7), 3924–3936.
- (81) Iwaki, H.; Sasaki, S.; Matsushita, A.; Ohba, K.; Matsunaga, H.; Misawa, H.; Oki, Y.; Ishizuka, K.; Nakamura, H.; Suda, T. *PLoS One* **2014**, *9* (4), publikováno online.
- (82) Zhao, P.; Caretti, G.; Mitchell, S.; McKeenan, W. L.; Boskey, A. L.; Pachman, L. M.; Sartorelli, V.; Hoffman, E. P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (1), 429–438.
- (83) Teng, A. C. T.; Kuraitis, D.; Deeke, S. a; Ahmadi, A.; Dugan, S. G.; Cheng, B. L. M.; Crowson, M. G.; Burgon, P. G.; Suuronen, E. J.; Chen, H.-H.; Stewart, A. F. R. *FASEB J.* **2010**, *24* (12), 4825–4834.
- (84) 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. *Genes Dev.* **2007**, *21* (21), 2747–2761.
- (85) Overholtzer, M.; Zhang, J.; Smolen, G. A.; Muir, B.; Li, W.; Sgroi, D. C.; Deng, C.-X.; Brugge, J. S.; Haber, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (33), 12405–12410.
- (86) Zender, L.; Spector, M. S.; Xue, W.; Flemming, P.; Cordon-Cardo, C.; Silke, J.; Fan, S.-T.; Luk, J. M.; Wigler, M.; Hannon, G. J.; Mu, D.; Lucito, R.; Powers, S.; Lowe, S. W. *Cell* **2006**, *125* (7), 1253–1267.
- (87) Lamar, J. M.; Stern, P.; Liu, H.; Schindler, J. W.; Jiang, Z.-G.; Hynes, R. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (37), E2441–E2450.
- (88) Wang, Y.; Dong, Q.; Zhang, Q.; Li, Z.; Wang, E.; Qiu, X. *Cancer Sci.* **2010**, *101* (5), 1279–1285.
- (89) 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. *Genes Dev.* **2010**, *24* (11), 1106–1118.
- (90) Siew, W. C.; Chun, J. L.; Guo, K.; Chee, P. N.; Lee, I.; Hunziker, W.; Zeng, Q.; Hong, W. *Cancer Res.* **2008**, *68* (8), 2592–2598.
- (91) Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A. R.; Poletti, A.; Daidone, M. G.; Dupont, S.; Basso, G.; Bicciato, S.; Piccolo, S. *Cell* **2011**, *147* (4), 759–772.
- (92) Liu-Chittenden, Y.; Huang, B.; Shim, J. S.; Chen, Q.; Lee, S.; Anders, R. A.; Liu, J. O.; Pan, D. *Genes Dev.* **2012**, *26* (12), 1300–1305.
- (93) Brodowska, K.; Al-Moujahed, A.; Marmalidou, A.; Meyer Zu Horste, M.; Cichy, J.; Miller, J. W.; Gragoudas, E.; Vavvas, D. G. *Exp. Eye Res.* **2014**, *124*, 67–73.
- (94) Zhang, Z.; Lin, Z.; Zhou, Z.; Shen, H. C.; Yan, S. F.; Mayweg, A. V.; Xu, Z.; Qin, N.; Wong, J. C.; Zhang, Z.; Rong, Y.; Fry, D. C.; Hu, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (9), 993–998.
- (95) Pobbati, A. V.; Han, X.; Hung, A. W.; Weiguang, S.; Huda, N.; Chen, G. Y.; Kang, C.; Chia, C. S. B.; Luo, X.; Hong, W.; Poulsen, A. *Structure* **2015**, *23* (11), 2076–2086.
- (96) Agilent Technologies. *pBluescript II Phagemid Vectors Instruction Manual*; 2008.
- (97) Geneaid. *Maxi Plasmid Kit Instruction Manual*; 2015.
- (98) Geneaid. *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*; 2014.
- (99) Agilent Technologies. *BL21-CodonPlus Competent Cells Instruction Manual*; 2005.