

Abstrakt

Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují expresi genů v různých typech buněk. Hrají tak důležitou roli v mnoha buněčných procesech od regulace buněčného cyklu až po buněčnou diferenciaci. Pomocí DNA vazebné domény rozpoznávají a váží specifické sekvence DNA. Jedním z typů DNA vazebné domény je doména „forkhead“, která se skládá ze 100–110 aminokyselinových zbytků. Tato sekvence je označována jako DBD FOX a připomíná tvar „okřídleného helixu“. Proteiny z rodiny FOX interagují s dvouvláknovou DNA pomocí α -helixu H3, který je pro tuto rodinu sekvenčně konzervován. Na vazbě s DNA se dále podílejí i další oblasti DBD, které však sekvenčně konzervovány nejsou a odlišné strukturní rysy přispívají k rozdílné afinitě FOX proteinů k DNA. Odlišnosti v trojrozměrné struktuře mohou také mít vliv na různorodost biologických funkcí proteinů FOX v organismu. Proteiny FOX se dělí do 19 podrodin, mezi které patří i podrodina FOXK, kterou tvoří dva členové FOXK1 a FOXK2. Proteiny FOXK regulují aerobní glykolýzu, buněčnou proliferaci a také karcinogenezi. Jejich zvýšená exprese byla popsána v rakovinných buňkách kosterní tkáně, žaludku, tlustého střeva, prsu, plic, vaječníků aj. Funkce proteinů FOXK v různých typech rakoviny však není dosud velmi prozkoumána.

Cílem práce bylo připravit nativní protein DBD FOXK1, který rozpoznává a váže specifický vazebný motiv dvouvláknové DNA. Ke studiu vazby DBD FOXK1 s dvouvláknovou DNA bylo využito pět oligonukleotidů (CRTC 2_14, CRTC 2_16, INSR_13, S16 a S1FLC) o délce 13, 14 a 16 párů bazí. Interakce připraveného proteinu s oligonukleotidy byla sledována s využitím nativní hmotnostní spektrometrie. Purifikací byl získán velmi čistý funkční protein DBD FOXK1, který váže všechny vybrané oligonukleotidy obsahující specifickou vazebnou sekvenci. Při nativní elektroforéze byla při vyšších koncentracích proteinu pozorována další forma komplexu o nižší mobilitě, která pravděpodobně přísluší druhé molekule DBD FOXK1 navázané mimo vysoce konzervovaný motiv.

Klíčová slova

transkripční faktory, DNA vazebná doména, oligonukleotid, trojrozměrná struktura, karcinogeneze