

ABSTRAKT

Integrativní strukturní biologie využívá nejen techniky s vysokým rozlišením, poskytující informaci o poloze jednotlivých atomů, i techniky s nízkým rozlišením nachází své uplatnění, protože informace o dynamických a heterogenních uspořádáních je konvenčními přístupy těžko dostupná. Díky senzitivě, specifitě a versilitě hmotnostní spektrometrie (MS) vznikla celá škála strukturních technik, založených právě na MS. Jedním ze směrů strukturní MS je nativní hmotnostní spektrometrie, která je založena na ionizaci nanoelektrosprejem z nedenaturujících rozpouštědel. Díky tomu je v plynné fázi zachována terciární i kvarterní struktura, a lze tudíž studovat nejen složení vzorku, ale s využitím iontové mobility (IM-MS) i konformaci biomolekul. Pomocí MS je tak možné přímo zachytit i perturbaci biomolekul, jako v případě aktivace zahříváním sprejovaného roztoku (vT-nESI).

Cílem diplomové práce bylo studovat teplotní stabilitu protein-DNA komplexů DNA-vazebných domén transkripčních faktorů TEAD1 a FOXO4. Komplexy byly charakterizovány nativní MS a IM-MS s využitím aktivace zahříváním sprejovaného roztoku, pomocí aparatury vyvinuté v naší laboratoři. Nejprve byly vT-nESI stanoveny teploty tavení dvouvláknové DNA, odpovídající teoreticky vypočteným i experimentálně stanoveným hodnotám. Byla též popsána tepelná denaturace TEAD1 a FOXO4 DNA-vazebných domén. Pomocí aktivace zahříváním sprejovaného roztoku byl studován vliv orientace M-CAT motivu na stabilitu TEAD1-DNA komplexů a byl zaznamenán rozdíl mezi TEAD1 a FOXO4 komplexy s DNA. TEAD1-DNA komplexy si při zahřívání zachovávaly jednu konformaci a docházelo k výrazné stabilizaci proteinu vazbou na DNA. Zatímco u FOXO4-DNA komplexu ke stabilizaci proteinu nedocházelo a při perturbaci byly pozorovány strukturní změny.