

# Strukturní charakterizace interakce transkripčních faktorů s DNA

Mgr. Růžena Filandrová

## Abstrakt

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

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

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