

Abstract (In Czech)

Mapování povrchu proteinů je jednou z metod strukturní biologie, které poskytují důležité informace o struktuře, dynamice, funkci a vazebných interakcích proteinů. V této práci jsme se k mapování povrchu proteinů rozhodli využít unikátní přístup, kterým je kombinace hmotnostní spektrometrie s rychlou fotochemickou oxidací proteinů (FPOP, z anglického Fast Photochemical Oxidation of Proteins), která k tomuto účelu využívá reaktivní radikály kyslíku.

Konkrétně byla v této práci metoda FPOP využita ke studiu interakce proteinu s DNA a to přesněji komplexu DNA-vázající domény proteinu FOXO4 s oligonukleotidem DAF16. V první fázi projektu byl produkován a purifikován protein, jehož vazba na DNA byla ověřena nativní elektroforézou a nativní hmotnostní spektrometrií. Dále byly optimalizovány podmínky oxidace proteinu, a to jak v přítomnosti DNA, tak samostatně a modifikace proteinu byly analyzovány hmotnostní spektrometrií pomocí přístupů top-down a bottom-up.

Přístupem bottom-up byla identifikována a kvantifikována modifikovaná residua, což odhalilo rozdíly v oxidaci jednotlivých aminokyselin v přítomnosti a nepřítomnosti DNA. Aby se předešlo možným artefaktům způsobených analýzou vícenásobně oxidovaného proteinu, byla kromě hmotnostně spektrometrické analýzy standardním přístupem bottom-up provedena rovněž analýza v tomto směru pokrokovým přístupem top-down, při kterém byl izolován a fragmentován kolizně indukovanou disociací a disociací záchytem elektronu pouze jedenkrát modifikovaný protein. Rovněž top-down přístup odhalil rozdíly v oxidaci proteinu, které nastaly

v důsledku vazby proteinu na DNA, ale pouze na úrovni jednotlivých regionů, které ovšem naprosto korelovali s výsledky z přístupu bottom-up a ukázaly na regiony, které se nalézají na interakčním rozhraní protein-DNA. Naše data jsou rovněž ve shodě s již dříve publikovanou krystalovou strukturou a s daty z vodík-deuteriové výměny komplexu DNA-vázající domény proteinu FOXO4 s oligonukleotidem DAF16.

Naše výsledky ukazují, že oba přístupy bottom-up i top-down jsou užitečnými nástroji při zkoumání interakčního rozhraní mezi proteinem a nukleovou kyselinou. Zatímco bottom-up přístup umožňuje získat informaci o modifikaci s prostorovým rozlišením na úrovni jedné aminokyseliny, přístup top-down naproti tomu dovoluje analýzu pouze jedenkrát modifikovaného proteinu.

Klíčová slova: rychlá fotochemická oxidace proteinu, protein-DNA komplexy, FOXO4, transkripční faktory, kapilární průtokový reaktor, excimerový laser, bottom-up přístup, top-down přístup.