1. STRESZCZENIE

 Ludzkie białko Yin Yang 1 (YY1) jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiadającym za specyficzną regulację poziomu ekspresji genów. Uważa się, że YY1 pełni dwie przeciwstawne funkcje, represora lub aktywatora transkrypcji. Białko to może także brać udział w specyficznym rozpoznaniu elementu Inr i inicjacji transkrypcji. Podejrzewa się, że u podstawy tej różnorodności leżą zróżnicowanie regulowanych elementów DNA i układu promotora (kontekst genetyczny), oddziaływania z innymi białkami lub modyfikacje potranslacyjne. Białko YY1 ma bowiem zdolność do oddziaływania różnymi sekwencjami na wielu promotorach a zgodna sekwencja DNA jest ściśle określona tylko na krótkim odcinku sekwencji rdzeniowej (CCAT). Wielość sekwencji rozpoznawanych przez czynnik YY1 rodzi pytanie o specyfikę rozpoznania i regulacji ekspresji
z różnych promotorów. W pracy tej podjęto pytanie o siłę rozpoznania specyficznego
i niespecyficznego DNA przez YY1 oraz kinetykę oddziaływania.

W pracy opisano wydajną procedurę uzyskiwania aktywnego, rekombinowanego białka YY1 oraz fragmentu YY1-DBD z bakterii *Escherichia coli*. Pokazano, że ekspresja YY1 w bakteriach *E. coli* była możliwa jedynie po dodaniu do N-końca sekwencji His6, oraz że poziom ekspresji białka nie zależy od obecności tzw. rzadkich kodonów. Następnie opracowano wydajną procedurę zwijania zdenaturowanego białka oraz oczyszczania na kolumnie z immobilizowanym, specyficznym DNA. Oczyszczone białko mogło być przechowywane przez długi czas w temperaturze -80 ºC bez utraty aktywności. Otrzymany preparat był monomeryczny, co wykazano przy pomocy techniki sączenia molekularnego oraz, jak pokazały pomiary MS, zawierał prawidłową ilość grup sulfhydrylowych. Dodatkowo w pracy wykazano, że białko YY1 zawiera fragmenty o niskiej zawartości struktury drugorzędowej, co przejawiało się zaniżonymi wartościami objętości elucji Ve podczas sączenia molekularnego oraz obecnością charakterystycznego pasma przy 200 nm na widmie dichroizmu kołowego. Oczyszczone białka nie zachowywały pełnej aktywności w stężeniach DTT niższych niż
5 mM lub w buforze zawierającym TCEP. W przypadku pełnej długości białka, aktywność była zachowana po usunięciu jonów cynku.

Oczyszczone białka posłużyły do wykonania pomiarów wiązania do fluorescencyjnie znakowanego DNA za pomocą techniki pomiaru zmian anizotropii fluorescencji. W rezultacie poznano wartości stałych dysocjacji *K*D dla czterech fragmentów promotorowego DNA. Dodatkowo zmierzono zależność siły wiązania do DNA od stężenia soli. Wykonano także pomiary kompetycyjne, które pozwoliły na określenie siły wiązania do niespecyficznego DNA. Otrzymane wyniki pokazały, że białko YY1 wiąże się do specyficznej sekwencji z wysoką jak dla czynnika transkrypcyjnego stałą dysocjacji, która wyniosła od 0.2 do 12 μM. Wyznaczone stałe dysocjacji do niespecyficznego DNA mieściły się w granicach od 30 do 40 μM, zaś określone na tej podstawie współczynniki specyficzności były niskie i wyniosły od 3 do 220. W pracy zawarto także wyniki pomiarów oddziaływania białka YY1 z DNA wykonanych z użyciem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów. Eksperymenty te pozwoliły na poznanie kinetyki badanych oddziaływań. W efekcie określono stałe szybkości asocjacji i dysocjacji dla białka YY1-DBD i trzech sekwencji DNA. Otrzymane wyniki pokazały, że fazy asocjacji i dysocjacji są szybkie co wskazuje na dynamiczną naturę kompleksu.

 Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że białko YY1 wiąże właściwe mu sekwencje DNA z niską siłą i specyficznością. Czynnik transkrypcyjny, aby mógł z powodzeniem regulować transkrypcję genów musi być w stanie rozpoznać specyficzną sekwencję od otaczającego niespecyficznego DNA. Sugeruje to, iż w komórce rozpoznanie właściwego miejsca wiązania przez YY1 musi być dodatkowo wspomagane przez inne białka, które mogą być związane z YY1 lub
w pobliżu rozpoznawanej sekwencji. Wykonane w tej pracy badania są istotne dla lepszego zrozumienia funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego YY1 w komórce.