

Analiza roli N-terminalnej domeny jako czynnika modulującego funkcję domen globularnych receptora *Ultraspiracle*

Krzysztof Wycisk

STRESZCZENIE

Obiektem badań w niniejszej pracy był receptor jądrowy *Ultraspiracle* z *Helicoverpa armigera* (HaUsp). Usp to występujący u bezkręgowców receptor jądrowy będący homologiem ssaczego receptora kwasu 9-cis retinowego (RXR, ang. *retinoid X receptor*). Głównym celem pracy było zbadanie czy domena N-terminalna (NTD, ang. *N-terminal domain*) Usp jest czynnikiem modulującym strukturę i tym samym funkcje pozostałych domen Usp. Teoretycznie NTD rolę taką może pełnić w dwojaki sposób. Po pierwsze, co wydaje się oczywiste, NTD może oddziaływać bezpośrednio z różnymi związkami lub koaktywatorami i tym samym wpływać na funkcje całego NR. Po drugie, co już nie jest takie oczywiste, regulatorowa rola NTD może być skutkiem jej interakcji z pozostałymi domenami globularnymi.

Aby zrealizować cel pracy przygotowano wektory ekspresyjne umożliwiające ekspresję rekombinowanego HaUsp pełnej długości oraz HaUsp pozbawionego NTD (HaUsp_ΔNTD). Następnie określono optymalne warunki ekspresji obu białek w systemie bakteryjnym oraz opracowano wydajne procedury ich oczyszczania. Pozwoliło to na otrzymanie dużych ilości preparatów białkowych o wysokiej czystości niezbędnych do przeprowadzenia dalszych analiz.

Wstępem do badań *in vitro* była kompleksowa analiza *in silico*. Pozwoliła ona, na identyfikację regionów inherentnie nieuporządkowanych (IDRs, ang. *intrinsically disordered regions*) w HaUsp oraz określenie ich zakresu. Otrzymane w wyniku pomiarów spektroskopii dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) widmo było widmem charakterystycznym dla białek globularnych, jednakże jego dekonwolucja pozwoliła na stwierdzenie obecności znacznej ilości fragmentów nieuporządkowanych (około 25%). Ostatecznie, za pomocą techniki wymiany proton-deuter połączonej ze spektrometrią masową (HDX-MS, ang. *hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*), udało się określić na drodze eksperymentalnej lokalizację fragmentów nieuporządkowanych. Zważywszy na kompleksową, częściowo nieuporządkowaną budowę HaUsp postanowiono również zbadać proces rozfałdowywania tego białka w obecności soli chaotropowej jaką jest GdmCl. Spektroskopia CD oraz sączenie molekularne (SEC, ang. *size-exclusion chromatography*) w obecności GdmCl pokazały, że białko jest stabilne do stężenia GdmCl wynoszącego 1,5 M. Destabilizacja struktury rozpoczyna się od stężenia 1,75 M. Ponadto, analiza za pomocą SEC pokazała, że w wyniku rozfałdowywania w próbce obecne są populacje trzech różnych konformerów, będących prawdopodobnie wynikiem rozpoczęcia rozfałdowywania od jednej bądź drugiej domeny globularnej.

Wszystkie otrzymane wyniki były zgodne i pokazały, że HaUsp posiada typową dla NRs budowę domenową i w związku z tym może posłużyć z powodzeniem jako modelowy NR do dalszych badań.

Wpływ obecności NTD na funkcje HaUsp postanowiono określić poprzez zbadanie wpływu tej domeny na dwie główne funkcje NRs jakimi są: oddziaływanie z DNA oraz oligomeryzacja. Analiza zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA, ang. *electrophoretic mobility shift assay*) pokazała, że HaUsp podobnie jak Usp z *Drosophila melanogaster* (DmUsp) tworzy specyficzne kompleksy z DNA w formie monomeru oraz dimeru. Jednakże w przypadku HaUsp oddziaływanie to wydaje się być słabsze niż w przypadku DmUsp. Co więcej, obecność NTD w HaUsp pełnej długości wyraźnie wpływa na oddziaływanie ze specyficzną sekwencją DNA zmieniając wzór oddziaływania białko-DNA. W celu zbadania wpływu NTD na proces oligomeryzacji posłużono się kilkoma niezależnymi technikami. Eksperymenty z wykorzystaniem szybkościowego ultrawierowania równowagowego (SV-AUC, ang. *sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*) pokazały, że zarówno HaUsp jak i HaUsp_ΔNTD wykazują tendencję do zależnej od stężenia, szybkiej i odwracalnej samoasocjacji i tworzenia dimerów, ale w przypadku HaUsp pełnej długości dimery te wydawały się stabilniejsze. Eksperymenty z wykorzystaniem równowagowego ultrawierowania analitycznego (SE-AUC, ang. *sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation*) potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, że NTD stabilizuje formowane dimery w przypadku białka pełnej długości. Kolejne eksperymenty z wykorzystaniem sączenia molekularnego z wielokątowym rozpraszaniem promieni światła laserowego (SEC-MALS, ang. *size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering*) również pokazały zależny od stężenia proces dimeryzacji oraz zależne od NTD formowanie stabilniejszych dimerów w przypadku białka pełnej długości. Eksperymenty z wykorzystaniem techniki małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS, ang. *small-angle X-ray scattering*) pozwoliły na doprecyzowanie roli NTD. W tym przypadku również obserwowano zależną od stężenia dimeryzację, ale otrzymane dane umożliwiły stworzenie modeli HaUsp oraz HaUsp_ΔNTD. Na ich podstawie udało się zaobserwować, że obecna w białku pełnej długości NTD może zaginać się w kierunku domeny wiążącej ligand (LBD, ang. *ligand-binding domain*) tworząc tzw. strukturę *scorpion-like* i poprzez oddziaływanie z tą domeną wpływać na jej strukturę oraz na płaszczyznę dimeryzacji.