

Anna Więch-Walów

Analiza molekularna regionu F receptora ekdysteroidowego z *Aedes aegypti*.

Streszczenie:

Funkcjonowanie wielokomórkowych organizmów wymaga precyzyjnej kontroli i koordynacji wielu zachodzących w nich procesów. Przykładem białek, które regulują transkrypcję genów istotnych dla procesów rozwoju czy zachowania homeostazy poprzez oddziaływanie na poziomie molekularnym są receptory jądrowe (NRs, ang. *nuclear receptors*). NRs stanowią grupę czynników transkrypcyjnych (TFs, ang. *transcription factors*) o działaniu uzależnionym od wiązania cząsteczek sygnałowych, natomiast ich zaburzone działanie skutkuje szeregiem niepożądanych efektów.

W strukturze NRs wyróżnia się domenę końca N (NTD, ang. *N-terminal domain*) – najczęściej wykazującą cechy regionów inherentnie nieuporządkowanych (IDRs, ang. *intrinsically disordered regions*) i odpowiedzialną za transaktywację procesu transkrypcji, domenę wiążącą DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*), region zawiasowy stanowiący elastyczny łącznik i domenę wiążącą ligand (LBD, ang. *ligand binding domain*). Niektóre NRs posiadają, zlokalizowany na ich końcu C – region F. Dotychczasowa wiedza na temat struktury i funkcji regionu F była fragmentaryczna a opublikowane wyniki wykazały jego udział w rekrutacji cząsteczek sygnałowych przez LBD, wpływ na rekrutację korepresorów i koaktywatorów transkrypcji oraz umożliwianie procesu dimeryzacji NRs.

Pochodzący z komara egipskiego, *Aedes aegypti*, receptor ekdysteroidowy (EcR, ang. *ecdysteroid receptor*) posiada jedną z najdłuższych sekwencji aminokwasowych odpowiadających regionowi F (AaFEcR). Struktura i funkcja poprzedzających AaFEcR domen stanowiła już wcześniej obiekt zainteresowania naukowców, ze względu na znaczną rolę AaEcR w procesie rozmnażania *A. aegypti*. Oddziałując z *Ultraspiracle* (Usp), kolejnym przedstawicielem nadrodziny NRs, AaEcR tworzy funkcjonalny receptor ekdysteroidowy (Usp/EcR). Usp/EcR jest odpowiedzialny m. in. za kontrolę ekspresji genu kodującego witelogeninę (Vg, ang. *vitellogenin*) – białko wczesnego żółtka ulegające akumulacji w oocytach komarów. W kontekście zaangażowania *A. aegypti* w proces transmisji wirusów dengi czy gorączki Zika, dokładna wiedza o molekularnym mechanizmie działania AaFEcR może stanowić klucz do kontrolowanego ograniczenia populacji komara.

Cel niniejszej pracy stanowiła analiza molekularna, nieopisanego do tej pory, regionu F EcR (AaFEcR). Aby go zrealizować opracowana została wydajna procedura nadekspresji rekombinowanego AaFEcR, w fuzji z białkiem czaperoninowym TF (ang. *trigger factor*) oraz otrzymania jego homogennego preparatu. Dla AaFEcR przeprowadzone zostały analizy *in silico*, wykazujące przynależność izolowanego AaFEcR do białek inherentnie nieuporządkowanych (IDPs, ang. *intrinsically disordered proteins*). Brak stabilnej struktury trzeciorzędowej AaFEcR w warunkach fizjologicznych został potwierdzony m.in. analizą zawartości struktur drugorzędowych z wykorzystaniem techniki dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*). Uzyskane rezultaty pozwoliły określić, że w strukturze AaFEcR znajdują się zarówno struktury nieuporządkowane, które w warunkach indukowanego fałdowania mogą ulegać strukturyzacji, jak również struktury globularne – podatne na denaturację chemiczną. Powyższe cechy pozwoliły określić, że AaFEcR posiada konformację prawie stopionej globuli (PMG, ang. *pre-molten globule*). Analiza właściwości hydrodynamicznych AaFEcR początkowo sugerowała, że ulega on oligomeryzacji, jednak eksperyment sączenia molekularnego (SEC, ang. *size-exclusion chromatography*) i szybkościowego ultrawirowania analitycznego (SV-AUC, ang. *sedimentation*

velocity – analytical ultracentrifugation) wykazały, że wysoka wartość jego promienia Stokes'a (R_s) jest efektem przynależności do IDPs a białko funkcjonuje jako monomer o wydłużonym kształcie.

Kolejne analizy *in silico* sekwencji AaFEcR wykazały obecność dwóch charakterystycznych motywów (HGPHPHPHG oraz QQLTPNQQQHQQHSQLQQVHANG), które zostały wcześniej opisane jako zdolne do koordynacji jonów metali. Potencjalna zdolność AaFEcR do wiązania jonów Zn^{2+} , Cu^{2+} oraz Ca^{2+} została zbadana z wykorzystaniem CD, SEC, SV-AUC, techniką spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*) i techniką spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*). Pokazano, że AaFEcR zdolny jest do oddziaływania z jednym, bądź dwoma, jonami Zn^{2+} , jednym, dwoma lub trzema jonami Cu^{2+} oraz jednym jonem Ca^{2+} oddziałującym z karboksylowym końcem AaFEcR lub grupą karbonylową w cząsteczce. Wiązanie powyższych jonów nie skutkuje zmianą zawartości struktur drugorzędowych w AaFEcR a zmniejszeniem objętości jego cząsteczki. Koordynacja jonów Zn^{2+} przez pełnej długości AaFEcR najprawdopodobniej zachodzi w obrębie aminokwasowego motywu HGPHPHPHG o czym świadczy obserwacja delikatnego przesunięcia chemicznego sygnału 74. reszty glicylowej techniką NMR, jednak nie skutkuje ona zmianami struktury trzeciorzędowej AaFEcR. Tym samym, koordynacja jonów przez AaFEcR powinna odbywać się poziomie pojedynczych reszt aminokwasowych, skutkująca kompensacją jego cząsteczki.

Badania z wykorzystaniem syntetycznych peptydów Ac-HGPHPHPHG-NH₂ oraz Ac-QQLTPNQQQHQQHSQLQQVHANG-NH₂ wykazały, że oba motywy zdolne są do koordynacji jonów Zn^{2+} oraz Cu^{2+} poprzez atomy azotu pochodzące z pierścieni imidazolowych obecnych reszt histydylowych. O ile, ze względu na wysoką zawartość reszt glutamin zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych w peptydzie Ac-QQLTPNQQQHQQHSQLQQVHANG-NH₂, oddziaływania uznawane były za stabilniejsze, tak wyjątkowe odkrycie stanowiła koordynacja jonu Cu^{2+} przez Ac-HGPHPHPHG-NH₂ skutkująca utworzeniem unikalnej struktury lewoskrętnej polipropylowej helisy typu II (PPII, ang. *poly-l-proline type II*).