

Małgorzata Kozłowska

Streszczenie

„Charakterystyka molekularna białka kalponino-podobnego Chd64 i immunofiliny FKBP”

Rozwój i wzrost owadów regulowany jest poprzez wspólne działanie dwóch lipofilnych hormonów, ekdysteroidu, 20-hydroksyekdyzonu (20E) oraz hormonu juwenilnego (JH). Podczas gdy funkcja biologiczna i mechanizm działania 20E są dość dobrze opisane, mechanizm działania JH wciąż jest słabo poznany. Nie jest wiadomo również jak łączą się ze sobą ścieżki przekazywania sygnału związane z 20E i JH, od których zależny jest poprawny rozwój owadów.

Dość niedawno zidentyfikowano dwa białka, które mogą wiązać się do fragmentu DNA będącego elementem odpowiedzi na hormon juwenilny (ang. *juvenile hormone response element*, JHRE), a także tworzyć kompleksy z receptorem ekdyzonu (ang. *ecdysteroid receptor*, EcR), białkiem *Ultraspiracle* (Usp) oraz białkiem Met (ang. *methoprene-tolerant protein*). Białkami tymi były pochodzące z *Drosophila melanogaster*: Chd64 opisywane w literaturze jako białko kalponinopodobne oraz FKBP39 należące do rodziny immunofilin o aktywności peptydylo-prolilowej izomerazy *cis-trans*. Zaproponowano hipotetyczny model regulacji transkrypcji genów zawierających JHRE z udziałem Chd64 i FKBP39. Wydaje się, że Chd64 i FKBP39 mogą pełnić ważną rolę jako czynniki transkrypcyjne pośredniczące między ścieżkami przekazywania sygnału hormonalnego, zapewniającymi prawidłowy rozwój u *Drosophila melanogaster*, który stanowi organizm modelowy. Jak dotąd właściwości molekularne Chd64 i FKBP39 nie zostały scharakteryzowane, nie określono również jak białka te wpływają na kontrolę ekspresji genów. Dlatego też, celem niniejszej rozprawy było przeprowadzenie analizy właściwości molekularnych białek Chd64 i FKBP39, w szczególności pod kątem ich uwarunkowań strukturalnych, które umożliwiłyby im sprawowanie ich

potencjalnej funkcji, jaką jest udział w tworzeniu wielobiałkowego kompleksu biorącego udział w regulacji przekazywania sygnałów hormonalnych u owadów.

W ramach niniejszej rozprawy opracowano system bakteryjny pozwalający na wydajną produkcję oraz oczyszczanie rekombinowanych pochodnych Chd64 i FKBP39. Dzięki temu możliwe było otrzymanie preparatów białkowych Chd64 i FKBP39, których stopień czystości pozwalał na przeprowadzenie analiz właściwości molekularnych badanych białek. Wyczerpujące analizy biochemiczne i biofizyczne rekombinowanych Chd64 i FKBP39, uzupełnione badaniami *in silico* wykazały, że oba białka cechuje wydłużony, elipsoidalny kształt. Chd64 można scharakteryzować jako monomeryczne białko o dualnej naturze. Zbudowane jest ono z globularnego rdzenia oraz oskrzydlających go regionów o inherentnie nieuporządkowanej strukturze (ang. *intrinsically disordered regions*, IDRs). Proces denaturacji Chd64 można opisać za pomocą modelu trzystanowego, z wyraźnie zaznaczonym stanem pośrednim, podczas którego białko przyjmuje konformację o cechach stopionej globuli (ang. *molten globule*, MG). Cząsteczka FKBP39, podobnie jak Chd64, składa się z regionów uporządkowanych i nieuporządkowanych. Na budowę FKBP39 składają się trzy charakterystyczne regiony, dwie uporządkowane domeny N- i C-końcowe, które odpowiadają odpowiednio domenie NPL (ang. *nucleoplasmin-like domain*) i FKBD (ang. *FK506-binding domain*) oraz nieuporządkowany, obdarzony ładunkiem region środkowy. FKBP39 występuje w roztworze w formie tetrameru, a płaszczyznę oligomeryzacji stanowią N-końcowe domeny NPL, które tworzą sztywny rdzeń. Do rdzenia przyłączone są za pomocą elastycznych łączników domeny FKBD. Cząsteczki Chd64 i FKBP39 cechuje duża elastyczność i zdolność do przyjmowania różnych alternatywnych form konformacyjnych. Duża plastyczność cząsteczek Chd64 i FKBP39 oraz obecność IDRs mogą stanowić platformę do licznych oddziaływań z wieloma partnerami.