

Joanna Kenanidis

Analiza molekularna regionu A/B receptora jądrowego z komara egipskiego (*Aedes aegypti*).

Streszczenie:

Komar *Aedes aegypti* jest wektorem flavowirusów wywołujących zakażenia dengą, chikunguną, żółtą febrą i ziką. Procesy rozmnażania, rozwoju i morfogenezy owada są w głównej mierze kontrolowane dwoma hormonami: hormonem juvenilnym i 20-hydroksyekdyzonem (20E) z udziałem receptorów jądrowych (NRs, ang. *nuclear receptors*) (Raikhel 2005). Owadzi hormon steroidowy 20E jest ligandem receptora 20-hydroksyekdyzonu (EcR, ang. *20-hydroxyecdysone receptor*) (Laudet and Gronemeyer 2001). Funkcjonalny receptor ekdyteroidowy jest heterodimerem dwóch białek należących do nadrodziny receptorów jądrowych: EcR oraz białka Ultraspiracle (Usp) (Cho, Kapitskaya *et al.* 1995, Kapitskaya, Wang *et al.* 1996). W wyniku użycia różnych promotorów oraz alternatywnemu splicingowi receptor Usp występuje w dwóch odmianach izomorficznych (UspA i UspB), różniących się w obrębie domeny końca N (Usp-NTD) (Wang, Li *et al.* 2000). W regionie tym typowego NR zlokalizowana jest domena aktywacyjna (AF-1, ang. *activation function 1*), która jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji niezależnie od obecności liganda (Bocquel, Kumar *et al.* 1989). Poprzez tworzenie płaszczyzny transaktywacyjnej, koniec N NRs (NTD) oddziałuje z czynnikami transkrypcji oraz koregulatorami (Wärnmark, Treuter *et al.* 2003). Mechanizm działania oraz struktura trzeciorzędowa NTD białka Usp z komara *A. aegypti* (*aaUsp-NTD*) nie są poznane. Ze względu na fakt, że *A. aegypti* jest wektorem śmiertelnych chorób, ważne jest gromadzenie wiedzy dotyczącej endokrynologicznej regulacji rozwoju tego komara - w celu ograniczenia jego populacji. Na ostre choroby zakaźne, przenoszone przez komary z rodzaju *Aedes*, nie ma ukierunkowanego leczenia przeciwwirusowego. Dlatego dużym wyzwaniem jest podjęcie próby wyjaśnienia funkcjonalnej roli *aaUsp-NTD* w działaniu białka Usp w kontekście specyficznego, funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego, tak ważnego w rozwoju i reprodukcji tego komara.

W związku z tym postanowiono scharakteryzować właściwości molekularne *aaUsp-NTD*. W ramach niniejszej rozprawy uzyskano konstrukt cDNA kodujący rekombinowaną NTD (*aaUsp-NTD*). Uzyskany konstrukt poddano ekspresji w komórkach *E. coli* w postaci białka fuzyjnego z umieszczonym na końcu N znacznikiem histydylowym. Następnie ustalono i zoptymalizowano procedurę izolacji rekombinowanego *aaUsp-NTD*. Procedura, dzięki której uzyskano oczyszczony preparat *aaUsp-NTD*, obejmowała chromatografię powinowactwa do immobilizowanego jonu

metal (IMAC, ang. *immobilized metal ion affinity chromatography*) oraz filtrację żelową (SEC, ang. *size-exclusion chromatography*). Dodatkowo, aby przeanalizować wpływ NTD na właściwości molekularne i funkcję białka pełnej długości, poszerzono układ eksperymentalny o białko Usp pełnej długości (*aaUsp*) oraz białko skrócone o NTD (*aaUsp-ΔNTD*). W tym celu otrzymano konstrukty *aaUsp* oraz *aaUsp-ΔNTD* również z umieszczonym na końcu N znacznikiem histydylowym. Procedura izolacji rekombinowanego *aaUsp-ΔNTD* obejmowała, podobnie jak w przypadku *aaUsp-NTD*, IMAC oraz filtrację żelową. Natomiast ta sama procedura zastosowana dla *aaUsp* nie pozwoliła otrzymać homogenego preparatu, dlatego przed filtracją żelową dodano etap chromatografii powinowactwa do złoża heparynowego. Tożsamość uzyskanych rekombinowanych białek potwierdzono w eksperymentach immunoblotingu oraz potwierdzono ich masy cząsteczkowe za pomocą spektrometrii mas (ESI-MS, ang. *electrospray ionisation mass spectrometry*).

Przeprowadzone analizy biochemiczne i biofizyczne rekombinowanej NTD, uzupełnione badaniami *in silico* wykazały, że wykazuje ona cechy charakterystyczne dla białek o inherentnie nieuporządkowanej strukturze (IDPs, ang. *intrinsically disordered proteins*). IDPs to grupa białek, które w warunkach natywnych pozbawione są struktury trzeciorzędowej. Dzięki temu łatwo przyjmują różnorodne stany konformacyjne i mogą oddziaływać z wieloma partnerami (Tompa 2005). Z wyżej wymienionych powodów, NTD wydaje się być niezwykle interesującym obiektem badawczym. Za pomocą dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) pokazano niewielką zawartość uporządkowanych struktur drugorzędowych. Zaniżona ruchliwość elektroforetyczna, jak i zawyżony promień hydrodynamiczny *aaUsp-NTD*, obserwowany w eksperymentach filtracji żelowej i szybkościowym ultrawirowaniu analitycznym (SV-AUC, ang. *analytical ultracentrifugation sedimentation velocity*), wskazują na cechy białka inherentnie nieuporządkowanego (ID, ang. *intrinsically disordered*). Duży promień hydrodynamiczny oznacza słabsze upakowanie i mniej zwartą konformację, niż w białku globularnym. Ponadto pokazano za pomocą SV-AUC, że *aaUsp-NTD* jest cząsteczką asymetryczną o eliptycznym kształcie. Na podstawie prezentowanych w niniejszej pracy wyników nie jest możliwe jednoznaczne zakwalifikowanie tej domeny do jednej, konkretnej grupy konformacyjnej IDPs. Możliwe, że *aaUsp-NTD* wykazuje w odpowiednich warunkach cechy zarówno PMG (ang. *pre-molten globule*) jak i MG (ang. *molten globule*). Filtracja żelowa i CD w obecności denaturanta wykazały, że *aaUsp-NTD* może występować także w pośrednich stanach konformacyjnych, o czym świadczy kształt krzywej denaturacyjnej. Co więcej, NTD ma skłonność do przyjmowania bardziej uporządkowanej struktury w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, co zbadano za pomocą CD w obecności 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE). Okazało się, *aaUsp-NTD* jest cząsteczką dynamiczną, posiadającą potencjał do tworzenia szerokiego spektrum różnych stanów konformacyjnych pod wpływem zarówno warunków denaturujących, jak i w warunkach

indukujących fałdowanie. Taka cecha świadczy o możliwości formowania powierzchni oddziaływania z wieloma białkami.

Nieoczekiwanie, analiza chromatogramów zarejestrowanych podczas oczyszczania aaUsp-NTD ujawniła, że NTD wykazuje tendencję do dimeryzacji, co potwierdzono za pomocą trzech metod tj. SEC, sieciowania chemicznego i SV-AUC. Stwierdzono, że izolowana NTD występuje w roztworze głównie w formie monomeru i w niewielkiej ilości w postaci dimeru. Tendencja do dimeryzacji jest w różnym stopniu zachowana wśród Usp-NTD. Usp-NTDs pochodzących od *Drosophila* and *Bombyx mori* również dimeryzują, jednak aaUsp-NTD wykazuje największy potencjał do oligomeryzacji. Zjawisko homodimeryzacji nie jest powszechne wśród IDPs, jednak coraz częściej opisywane w literaturze. Dodatkowo zbadano również wpływ NTD na strukturę białka pełnej długości. W tym celu przeprowadzono eksperyment wymiany proton-deuter monitorowany za pomocą spektrometrii mas (HDX-MS, ang. *hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*). Wyniki dla aaUsp-NTD potwierdziły jej nieuporządkowaną strukturę, a wyniki dla białka aaUspB odtworzyły powszechnie znaną organizację domen globularnych i ich łącznika w strukturze NRs. NTD pozostała nieuporządkowana w białku aaUspB. Eksperymenty SEC i SV-AUC przeprowadzone na białkach aaUsp i aaUsp-ΔNTD pokazują, że NTD nie wpływa znacząco na parametry hydrodynamiczne białka pełnej długości, sugerując umiejscowienie NTD pomiędzy domeną wiążącą DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*) a domeną wiążącą ligand (LBD, ang. *ligand binding domain*). Ponadto, wyniki HDX-MS sugerują istnienie międzydomenowej interakcji pomiędzy NTD a DBD, ze względu na zaobserwowaną zmianę konformacyjną w DBD w białku pełnej długości.

W ramach realizacji tematu rozprawy postanowiono również zbadać rolę NTD w wiązaniu do DNA białka pełnej długości. Wyniki mikrotermoforezy (MST, ang. *microscale thermophoresis*) pokazały, że obecność NTD wzmacnia interakcję z DNA białka Usp. Ponadto wyniki EMSA sugerują, że obecność NTD może zmniejszać tendencję aaUsp do dimeryzacji na sekwencji regulatorowej warunkującej odpowiedź na hormon (HRE, ang. *hormone response element*).

Zaobserwowana strukturalna i funkcjonalna charakterystyka aaUsp-NTD czyni zasadnym przypuszczenie o potencjalnej roli aaUsp-NTD jako platformy do rozmaitych interakcji typu białko-białko, tym bardziej, że białko Usp bierze udział w koordynacji różnych szlaków, związanych z aktywnością różnych NRs, regulowanych różnymi cząsteczkami sygnałowymi.

Bibliografia:

Bocquel, M. T., et al. (1989). "The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific." Nucleic Acids Res **17**(7): 2581-2595.

Cho, W. L., et al. (1995). "Mosquito ecdysteroid receptor: analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis." Insect Biochem Mol Biol **25**(1): 19-27.

Kapitskaya, M., et al. (1996). "The mosquito ultraspiracle homologue, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis." Mol Cell Endocrinol **121**(2): 119-132.

Laudet, V. and H. Gronemeyer (2001). The Nuclear Receptor FactsBook, Elsevier Science.

Raikhel, A. S., Brown, M.R., Belles, X (2005). Hormonal control of reproductive processes. Comprehensive molecular insect science , **3**: 433-491.

Tompa, P. (2005). "The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins." FEBS Letters **579**(15): 3346-3354.

Wang, S. F., et al. (2000). "Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ultraspiracle isoforms." Dev Biol **218**(1): 99-113.

Wärnmark, A., et al. (2003). "Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation." Mol Endocrinol **17**(10): 1901-1909.