

Analiza złożoności strukturalnej Chd64 i FKBP39 z *Tribolium castaneum*

Aneta Tarczewska

Streszczenie

Cechą charakterystyczną większości gatunków owadów jest zmienność postaci morfologicznych w trakcie rozwoju. Cykl życiowy owadów regulowany jest poprzez wspólne działanie dwóch lipofilowych hormonów, ekdysteroidu, 20-hydroksyekdyzonu (20E) oraz seskwiterpenoidu, hormonu juvenilnego (JH). O ile hormonalne ścieżki sygnalizacyjne są dość dobrze poznane niewiele wiadomo na temat sposobu ich krzyżowania. Spory postęp w zrozumieniu zawiłych mechanizmów regulacyjnych przyniosły niedawne badania na modelowym organizmie owadzie *Drosophila melanogaster* (wywilżna karłowata). Zidentyfikowano dwa białka, które wiążą fragment DNA, będący elementem odpowiedzi na JH (ang. *juvenile hormone response element*, JHRE): kalponino-podobne Chd64 oraz immunofilinę FKBP39. Wykazano, że Chd64 i FKBP39 oddziałują z receptorem ekdysteroidowym (ang. *ecdysteroid receptor*, EcR), białkiem *Ultraspiracle* (Usp) oraz Met (ang. *methoprene-tolerant protein*). W oparciu o uzyskane wyniki, zaproponowano hipotetyczny model regulacji transkrypcji genów zawierających JHRE z udziałem Chd64 i FKBP39. Model zakłada, że Chd64 i FKBP39 regulują formowanie i aktywność, wielobiałkowego kompleksu składającego się z wyżej wymienionych białek oraz innych czynników transkrypcyjnych. Kompleks ten poprzez oddziaływanie z odpowiednimi elementami regulatorowymi umożliwia prawidłowe przejście do postępujących po sobie stadiów larwalnych, tym samym zapewniając prawidłowy rozwój *D. melanogaster*. Jak dotąd właściwości molekularne Chd64 i FKBP39 pozwalające na tak złożone interakcje nie zostały poznane. Wiadomo natomiast, że podstawowe mechanizmy regulacji rozwoju owadów są takie same dla gatunków pochodzących z niespokrewnionych gatunków. Zakłada się, że w *Tribolium castaneum* (trojszyk gryzący) istnieje taki sam mechanizm regulatorowy, a zatem białka homologiczne do Chd64 i FKBP39 pełnią analogiczną rolę do roli w *D. melanogaster*.

Dlatego też celem prezentowanych w tej rozprawie badań było przeprowadzenie analizy złożoności strukturalnej, aby zidentyfikować cechy, które umożliwiłyby Chd64 i FKBP39 pochodzącym z *T. castaneum* sprawowanie ich potencjalnej funkcji, jaką jest udział w tworzeniu wielobiałkowego kompleksu, biorącego udział w regulacji ekspresji genów zależnych od JH i 20E.

Aby zrealizować cel pracy, konieczne było opracowanie systemu bakteryjnego pozwalającego na wydajną ekspresję, oraz oczyszczanie rekombinowanych pochodnych Chd64 i FKBP39. Otrzymanie preparatów białkowych o wysokim stopniu czystości pozwoliło na przeprowadzenie analiz fizykochemicznych zmierzających do ustalenia ich właściwości molekularnych. Wstępem do badań *in vitro* była kompleksowa analiza *in silico*, na podstawie której zebrano informacje o potencjalnym występowaniu zdefiniowanych motywów strukturalnych oraz domen. Ponadto analiza składu oraz sekwencji aminokwasowej pozwoliła na wyznaczenie miejsc, które wykazują duże prawdopodobieństwo występowania inherentnego nieuporządkowania.

Analizy *in silico* ujawniły, że Chd64 może posiadać globularny rdzeń, korespondujący do domeny CH, oraz inherentnie nieuporządkowane regiony (ang. *intrinsically disordered regions*, IDRs) terminalne. Analiza właściwości hydrodynamicznych z użyciem analitycznego sączenia molekularnego (ang. *size exclusion chromatography*, SEC) oraz analitycznego ultrawierowania typu prędkości sedymentacji (ang. *sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*, SV-AUC) wykazała, że eksperymentalnie wyznaczone wartości parametrów hydrodynamicznych, różnią się znacząco od wielkości teoretycznych obliczonych dla białka globularnego, którego skład aminokwasowy odpowiada Chd64. Dodatkowo, analiza za pomocą małokątowego rozpraszania promieniowania X (ang. *small angle X-ray scattering*, SAXS) ujawniła, że cząsteczki Chd64 mają asymetryczny, wydłużony kształt. W oparciu o uzyskane wyniki analiz strukturalnych, oraz dane literaturowe na temat struktury domen CH, zakłada się, że wydłużony kształt Chd64 wynika z obecnych na obu jego końcach IDRs. Studia denaturacyjne wykazały, że rozfałdowanie łańcucha polipeptydowego Chd64, przez GdmCl jest procesem odwracalnym i zachodzi z udziałem wyraźnie zaznaczonego stanu pośredniego. Analiza zmierzająca do scharakteryzowania Chd64 w stanie pośrednim wykazała, że cząsteczki białka przyjmują konformację przypominającą stopioną globulę (ang. *molten globule*, MG).

FKBP39, w środkowym fragmencie łańcucha polipeptydowego posiada dwa regiony kwaśne oraz jeden zasadowy. Analizy *in silico* wykazały, że środkowy, obdarzony ładunkiem fragment jest z wysokim prawdopodobieństwem inherentnie nieuporządkowany. Wyszukiwanie domen i zdefiniowanych motywów z użyciem narzędzi bioinformatycznych wskazało, że białko posiada dwie globularne domeny. N-końcowa wykazuje podobieństwo do rdzeniowej domeny nukleoplazminy (ang. *nucleoplasmin-like*, NPL), natomiast C-końcowa posiada charakterystykę domeny białek wiążących FK506 (ang. *FK506-binding protein*, FKBP). W oparciu o dane literaturowe, sugerujące, że domeny rdzeniowe nukleoplazmin tworzą oligomery, wykonano SEC w warunkach denaturujących. Analiza wykazała, że przejście białka ze stanu natywnego do rozfałdowanego jest typowe dla białek oligomerycznych, które ulegają dysocjacji na podjednostki. Eksperymentalnie wyznaczona masa cząsteczkowa, z użyciem trzech niezależnych metod ujawniła, że FKBP39, podobnie jak inne białka z grupy nukleoplazmin tworzy pentameryczne kompleksy. Badania właściwości hydrodynamicznych FKBP39 wykazały, że pentamery posiadają wydłużony kształt i luźną strukturę, co wynika z obecności struktury nieuporządkowanej.

Ze względu na brak stabilnej struktury i dużą swobodę rotacyjną regiony nieuporządkowane cechują się dużą plastycznością oraz zdolnością do występowania w różnorodnych formach konformacyjnych. Możliwe, zatem że ze względu na swoje cechy, regiony nieuporządkowane Chd64 i FKBP39 mogą stanowić platformę do licznych oddziaływań z wieloma partnerami białkowymi. Dlatego też, ich obecność zdaje się być ważna dla pełnionej przez te białka potencjalnej funkcji regulatorowej w tworzeniu wielobiałkowego kompleksu krzyżującego hormonalne szlaki sygnałowe.

