

Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii
Zakład Biochemii
Politechnika Wrocławska

**ROLA C-TERMINALNEJ SEKWENCJI
DOMENY WIAŻĄCEJ DNA BIAŁKA EcR
W SPECYFICZNEJ INTERAKCJI Z ELEMENTEM
REGULATOROWYM**

Marek Orłowski

Rozprawa doktorska

PROMOTOR:

Dr hab. Andrzej Ożyhar, Prof. PWr

Wrocław 2004

Mamie

Promotorowi Profesorowi Dr. hab. Andrzejowi Ożyharowi pragnę podziękować za wybór interesującego tematu pracy, za dyskusje nad wynikami eksperymentów oraz cenne wskazówki udzielane mi podczas ich wykonywania, a także za czas poświęcony mi w trakcie pisania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Professorowi Dr. hab. Marianowi Kochmanowi dziękuję za możliwość realizacji doktoratu w Zakładzie Biochemii.

Professorowi Dr. hab. Jackowi Otlewskiemu i Dr. Danielowi Krowarschowi z Zakładu Inżynierii Białka Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego serdecznie dziękuję za możliwość wykonania pomiarów CD i pomoc w trakcie ich przeprowadzania.

Mgr. inż. Agnieszce Kowalskiej z całego serca dziękuję za udostępnienie preparatów UspDBD z *Drosophila melanogaster*, profilu denaturacyjnego UspDBD oraz pomoc i wsparcie okazane mi w trakcie redagowania niniejszej rozprawy.

Dr. Grzegorzowi Rymarczykowi bardzo dziękuję za poświęcony mi czas i pomoc w ostatnim okresie pisania pracy.

Dr. Anicie Niedzieli-Majce i Dr. Iwonie Grad pragnę podziękować za wprowadzenie w „warsztat” laboratorium biologii molekularnej.

Dr. Piotrowi Dobryszkiemu dziękuję za pomoc przy wykonywaniu pomiarów fluorescencji.

Mgr. inż. Monice Szysze serdecznie dziękuję za pomoc w uzyskaniu klonów cDNA mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD.

Pani Mirosławie Ostrowskiej bardzo serdecznie dziękuję za okazaną mi życzliwość i pomoc w trakcie przygotowywania eksperymentów.

Prof. K. Iatrou oraz Dr. L. Sweversowi (Institute of Biology, National Center for Scientific Research „Demokritos”, Athens, Greece) dziękuję za klon cDNA białka EcR z *Bombyx mori*.

Prof. G. Tzertzinisowi (New England BioLabs, USA) dziękuję za klon cDNA białka Usp z *Bombyx mori*.

Wyrazy wdzięczności z mojej strony należą się pozostałym osobom, których jest zbyt wiele, aby je wszystkie wymienić, za okazaną mi w trakcie realizacji pracy doktorskiej pomoc, wspianą atmosferę pracy; przede wszystkim,

Koleżankom i Kolegom z Zespołu.
Bardzo Wam z całego serca dziękuję.

„(...) droga, którą każą nam kroczyć, jest stroma i wyboista. I co z tego? Czy gładką drogą zdobywa się szczyty? W rzeczywistości nie jest wcale taka stroma ta droga, jak się niektórym wydaje. To tylko sam początek jest najeżony głazami i bryłami skalnymi i sprawia wrażenie, że jest nie do przebycia, podobnie jak niejedno miejsce, widziane z daleka, wydawać się zwykło urwistym i zrośniętym masywem tylko dlatego, że odległość w błąd wprowadza bystrość spojrzenia. W miarę jednak jak się zbliżamy, te same szczegóły terenu, które w jedną całość zespoliło złudzenie oczu, z wolna zarysowują się coraz wyraźniej, a wtedy to, co z oddalenia miało wygląd spadzistej skały, przybiera postać łagodnego wzniesienia (...)”

LUCIUS ANNAEUS SENECA

(Dialogi, ZIS, Poznań, 1996)

SPIS TREŚCI

1. SPIS SKRÓTÓW	1
2. STRESZCZENIE	9
3. WSTĘP	14
3.1. SZLAKI PRZEPŁYWU SYGNAŁÓW W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH	16
3.2. RECEPTORY JĄDROWE KRĘGOWCÓW	18
3.2.1. Nadrodzina receptorów jądrowych kręgowców	18
3.2.2. Budowa domenowa receptorów jądrowych	22
3.2.3. Lokalizacja jądrowa receptorów jądrowych	28
3.2.4. Rearanżacja chromatyny i inicjacja transkrypcji z udziałem receptorów jądrowych	29
3.3. ODDZIAŁYWANIE RECEPTORÓW JĄDROWYCH Z DNA	32
3.3.1. Sekwencje regulatorowe DNA wiążące receptory jądrowe	32
3.3.2. Domena wiążąca DNA receptorów jądrowych - reszty aminokwasowe biorące udział w wiązaniu DNA i dimeryzacji - definicja kaset P, D, T i A	39
3.3.3. Struktury przestrzenne domen wiążących DNA receptorów jądrowych i ich kompleksów z DNA	43
3.3.3.1. <i>Symetria ułożenia domen wiążących DNA receptorów hormonów steroidowych na elementach palindromowych</i>	43
3.3.3.2. <i>Homodimer receptora androgenowego wiąże asymetryczny element zorganizowany jako DR (ADR3) w konfiguracji typowej dla homodimerów receptorów steroidowych związanych z symetrycznymi HRE</i>	49
3.3.3.3. <i>Anizotropowe kompleksy receptorów jądrowych z elementami regulatorowymi zorganizowanymi w postaci bezpośrednich powtórzeń</i>	53
3.3.3.3.1. <i>Anizotropowa budowa homodimeru VDRDBD na naturalnie występujących sekwencjach typu bezpośrednio powtórzenie</i>	62

6.2.2.2. Przygotowanie zawiesin glicerolowych komórek BL21(DE3)pLysS transformowanych rekombinowanymi plazmidami pGEX-2T	96
6.2.2.3. Synteza białek fuzyjnych z GST w bakteriach BL21(DE3)pLysS	97
6.2.2.4. Przygotowanie ekstraktów komórek BL21(DE3)pLysS	98
6.2.2.5. Oczyszczanie białek EcRDBD _{XYZ} zawierających mutacje w regionie kasety T i α -helisy rozpoznającej element regulatorowy	98
6.2.2.5.1. Frakcjonowanie białek komórkowych przy pomocy siarczanu amonu	99
6.2.2.5.2. Chromatografia powinowactwa na złożu Heparin Sepharose™ CL-6B	100
6.2.2.5.3. Chromatografia powinowactwa na złożu Glutathione Sepharose™ 4B	100
6.2.2.5.4. Sączenie molekularne na kolumnie Superdex 75HR	100
6.2.2.6. Oczyszczanie białek EcRDBD _{ΔX} z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> zawierających mutacje delecyjne w C-końcowych sekwencjach oraz UspDBD z <i>B. mori</i>	101
6.2.3. Metody stosowane do analizy rekombinowanych białek	101
6.2.3.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE)	102
6.2.3.2. Określanie czystości preparatów białkowych	102
6.2.3.3. Oznaczanie stężenia białka	103
6.2.3.4. Badanie oddziaływań rekombinowanych białek z DNA	103
6.2.3.5. Pomiary widm dichroizmu kołowego (CD)	104
6.2.3.6. Denaturacja chemiczna z użyciem chlorowodoru guanidyny	104
6.2.3.7. Renaturacja	104
7. WYNIKI	105
7.1. ROLA C-TERMINALNEJ SEKWENCJI BIAŁKA EcRDBD W SPECYFICZNYM ODDZIAŁYWANIU Z ELEMENTEM REGULATOROWYM hsp27_{pal}	105
7.1.1. Mutacje białka EcRDBD w regionie przypuszczalnej kasety T	106
7.1.1.1. Otrzymanie zmutowanych białek EcRDBD _{XYZ} oraz EcRDBD _{WT}	107
7.1.1.2. Wpływ mutacji kasety T na homodimeryzację EcRDBD na elemencie regulatorowym hsp27 _{pal}	109
7.1.1.3. EcRDBD w kompleksie z UspDBD na elemencie regulatorowym hsp27 _{pal} wykazuje zaskakującą tolerancję na wprowadzone mutacje w kasecie T	112
7.1.1.4. Mutacje niektórych reszt aminokwasowych kasety T EcRDBD wprowadzają zmiany w jego strukturze	114
7.1.1.5. Właściwości mutantu EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> zawierającego charakterystyczną sekwencję kasety T pochodzącej z <i>B. mori</i>	117
7.1.2. Analiza oddziaływania z hsp27 _{pal} mutantów delecyjnych EcRDBD w regionie przypuszczalnej kasety A z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> pozwoliła na określenie minimalnej długości fragmentów sekwencji CTE wystarczających do tworzenia kompleksów na tym elemencie	120
7.1.2.1. Otrzymanie zmutowanych EcRDBD _{ΔX} oraz UspDBD	123
7.1.2.2. Analiza zdolności tworzenia kompleksów na hsp27 _{pal} przez mutanty delecyjne EcRDBD _{ΔX}	124

7.2. ANALIZA MUTANTÓW α-HELISY ROZPOZNAJĄCEJ ELEMENT REGULATOROWY EcRDBD W ZDOLNOŚCI DO SPECYFICZNEGO ODDZIAŁYWANIA I TWORZENIA KOMPLEKSÓW Z <i>hsp27_{pal}</i> PODKREŚLIŁA PLASTYCZNOŚĆ EcRDBD	127
7.2.1. Mutacje białka EcRDBD w regionie α -helisy rozpoznającej element regulatorowy	127
7.2.1.1. Otrzymanie zmutowanych EcRDBD _{XYZ}	129
7.2.1.2. Wpływ mutacji α -helisy rozpoznającej element regulatorowy na homodimeryzację EcRDBD na <i>hsp27_{pal}</i>	129
7.2.1.3. Mutanty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD wykazują plastyczność podczas tworzenia heterodimerów z UspDBD na <i>hsp27_{pal}</i>	132
7.2.1.4. Wpływ mutacji aminokwasów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy białka EcRDBD na jego strukturę	133
7.3. BADANIE STABILNOŚCI TERMODYNAMICZNEJ EcRDBD	135
7.3.1. Denaturacja chemiczna z użyciem chlorowodoru guanidyny pokazała, że EcRDBD jest białkiem niestabilnym	136
7.3.2. Renaturowany EcRDBD jest zdolny do wiązania <i>hsp27_{pal}</i>	138
8. DYSKUSJA	140
8.1. ROLA SEKWENCJI CTE BIAŁKA EcRDBD W SPECYFICZNYM ODDZIAŁYWANIU Z ELEMENTEM REGULATOROWYM <i>hsp27_{pal}</i>	142
8.1.1. Mutacje EcRDBD w regionie przypuszczalnej kasety T	142
8.1.1.1. Reszty C70, V71, V72 i P73, tworzące rdzeń kasety T EcRDBD, pełnią ważną rolę strukturalną	143
8.1.1.2. Wyjątkowa rola reszty P73 w utrzymywaniu prawidłowej konformacji CTE EcRDBD	143
8.1.1.3. Potencjalny region kasety T niektórych receptorów jądrowych nicienia <i>C. elegans</i> wykazuje podobieństwo w sekwencji aminokwasowej do kasety T EcRDBD	144
8.1.2. Minimalne fragmenty kasety A EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> wystarczające do wiązania <i>hsp27_{pal}</i> i kooperatywnego tworzenia kompleksów homo- i heterodimerycznych na tym elemencie	145
8.1.3. Czy sekwencja odpowiedzialna za lokalizację jądrową EcR może znajdować się w jego CTE w DBD ?	146
8.2. ANALIZA MUTANTÓW α-HELISY ROZPOZNAJĄCEJ ELEMENT REGULATOROWY EcRDBD POTWIERDZIŁA DUŻĄ TOLERANCJĘ BIAŁKA NA WPROWADZONE MUTACJE, SZCZEGÓLNIE W OBECNOŚCI UspDBD	147

8.3. PLASTYCZNOŚĆ EcRDBD	148
9. PODSUMOWANIE	152
10. LITERATURA	154
11. SPIS TABEL	179
12. SPIS RYSUNKÓW	180

DODATEK

I. Sekwencja genu <i>EcR</i> oraz białka EcR z <i>D. melanogaster</i>	i
II. Sekwencja genu <i>Usp</i> oraz białka Usp z <i>D. melanogaster</i>	iv
III. Sekwencja genu <i>EcR</i> oraz białka EcR z <i>B. mori</i>	vi
IV. Sekwencja genu <i>Usp</i> oraz białka Usp z <i>B. mori</i>	viii
V. Wektor ekspresyjny pGEX-2T	x

1

SPIS SKRÓTÓW

W tekście niniejszej pracy oraz na rysunkach posługiwano się następującymi skrótami:

- symbole podane w nawiasach kwadratowych przy objaśnianiu znaczenia skrótów receptorów są numerami identyfikacyjnymi wynikającymi z klasyfikacji i systemu nazewnictwa receptorów jądrowych, zaproponowanego przez Komitet Nomenklatury Receptorów Jądrowych (ang., *Nuclear Receptors Nomenclature Committee*) w 1999 roku; [NR χ Y ζ], gdzie χ oznacza podrodzinę receptorów jądrowych, Y- grupę, a ζ -określony receptor;

SKRÓTY	ZNACZENIE
A _{abc}	absorbancja, <i>abc</i> odpowiada długości fali w nm;
ACTR	(ang., <i>histone acetyltransferase nuclear coactivator</i>); koaktywator receptorów jądrowych należący do rodziny p160;
ADR3	sekwencja regulatorowa receptora androgenowego typu DR, którego półmiejscza oddzielone są „odstępnikiem” (ang., <i>spacer</i>) o długości 3 par zasad;
AF, AF-1; AF-2	(ang., <i>activation function</i>); sekwencja aminokwasowa w regionie A/B (AF-1, inaczej TAF-1) lub E (AF-2, inaczej TAF-2) receptorów jądrowych, posiadająca zdolność aktywacji transkrypcji;
AR	(ang., <i>androgen receptor</i>) [NR3C4]; receptor androgenowy;
ARDBD	domena wiążąca DNA białka AR;
ARE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na androgeny;
<i>B. m.</i>	<i>Bombyx mori</i> (jedwabnik morwowy);
CBP	(ang., <i>CREB-binding protein</i>); białko wiążące się z białkiem CREB;
CD	(ang., <i>circular dichroism</i>); dichroizm kołowy;
CoA	(ang., <i>coactivator complex</i>); kompleks koaktywatorów;

CoRN	(ang., <i>corepressor nuclear receptor box</i>); sekwencja występująca w korepresorach, za pośrednictwem której wiążą się one z receptorami jądrowymi;
COUP, COUP-TF	(ang., <i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>) [NR2F]; czynnik transkrypcyjny należący do sierocych receptorów jądrowych kręgowców;
CREB	(ang., <i>cAMP response element-binding protein</i>), jeden z czynników transkrypcyjnych aktywowany przez kinazę białkową A, zależną od cAMP;
CTE	(ang., <i>C-terminal extension</i>); przedłużenie (lub wydłużenie) C-końcowe; białkowy fragment receptora jądrowego obejmujący sekwencję aminokwasową bezpośrednio przyległą do DBD od strony C-końca, związany z dimeryzacją i oddziaływaniem receptorów sierocych i heterodimeryzujących z DNA;
Cy-5	(ang., <i>5-N-N'-diethyl-tetramethylindodicarbocyanine</i>); 5-N-N'-dietylotetrametyloindodikarbocyjanina; znacznik fluorescencyjny;
Da	dalton; atomowa jednostka masy;
DAX1	(ang., <i>dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene-1</i>) [NR0B1]; receptor sierocy nie zawierający klasycznej DBD;
DBD	(ang. <i>DNA-binding domain</i>); domena wiążąca DNA;
DHR38, DHR39 DHR78	(ang., <i>Drosophila hormone receptors</i>); grupa białek sierocych, należąca do rodziny receptorów jądrowych <i>D. melanogaster</i> ; [NR4A4], [NHR5B1] i [NR2D1], odpowiednio;
DHR38DBD	domena wiążąca DNA białka DHR38;
<i>D. m.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (wywilżna karłowka; zwana potocznie muszką owocową);
DNaza I	deoksyrybonukleaza I;
dNTP	trifosforan deoksyrybonukleozydu (A,T,G lub C);
DRIP	patrz TRAP;
DRX;	(ang., <i>direct repeat</i>); sekwencja regulatorowa DNA wiążąca receptory jądrowe zorganizowana w postaci bezpośredniego (lub prostego) powtórzenia, w której półmiejsca ułożone są tandemowo jedno za drugim i oddzielone „odstępnikami” o długości X par zasad;

DTT	ditiotreitol;
20E	20-hydroksyekdyzon; hormon steroidowy stawonogów; ligand tzw. funkcjonalnego receptora ekdystteroidowego;
EcR	(ang., <i>ecdysone receptor</i>); produkt genu <i>EcR</i> ; jeden z receptorów jądrowych owadów; uważa się, że wspólnie z Usp tworzy funkcjonalny receptor ekdystteroidowy, wiążący ekdyzon; u <i>D. melanogaster</i> zidentyfikowano trzy izoformy: EcR-B1, EcR-B2 i EcR-A;
EcRDBD	domena wiążąca DNA białka EcR;
EcRDBD _{XYZ}	domena wiążąca DNA białka EcR zawierająca mutację reszty aminokwasowej X na resztę Z, znajdującą się w pozycji Y w białku;
EcRDBD _{ΔX}	domena wiążąca DNA białka EcR zawierająca mutację delecyjną w CTE, gdzie X jest ostatnią resztą aminokwasową pochodzącą z białka;
EcRE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na 20E;
EMSA	(ang., <i>electrophoretic mobility shift assay</i>); technika analizy oddziaływania białek z DNA wykorzystująca zmianę ruchliwości elektroforetycznej sondy DNA w żelu, po związaniu się białka;
EcRLBD	domena wiążąca ligand EcR;
<i>Eip28/29</i> EcRE	(ang., <i>ecdysone-induced protein 28/29 kDa</i>); EcRE z regionu regulatorowego genu <i>Eip28/29</i> ; gen białka <i>D. melanogaster</i> o masie 28 - 29 kDa, indukowany przez ekdyzon;
ER	(ang., <i>estrogen receptor</i>); receptor estrogenowy, nazwa obejmuje dwa białka kodowane przez dwa odrębne geny - ERα [NR3A1] i ERβ [NR3A2];
ERDBD	domena wiążąca DNA białka ER;
ERE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na hormony estrogenowe;
ERR	(ang., <i>estrogen receptor-related receptor</i>); nazwa obejmuje trzy białka: ERRα [NR3B1], ERRβ [NR3B2] i ERRγ [NR3B3], kodowane przez odrębne geny;
<i>Fbp1</i> EcRE	(ang. <i>fat body protein-1</i>); gen białka ciała tłuszczowego – 1; EcRE z regionu regulatorowego genu <i>Fbp1</i> <i>D. melanogaster</i> ;
FTZ-F1	(ang. <i>fushi tarazu factor 1</i>); jeden z receptorów jądrowych biorący udział w apoptozie u <i>D. melanogaster</i> ; [NR5A3];

FXR	(ang. <i>farnesoid X receptor</i>) [NR1H4]; receptor jądrowy kręgowców aktywowany pochodnymi farnezołu;
GCNF	(ang., <i>germ cell nuclear factor</i>) [NR1H4]; sierocy receptor jądrowy kręgowców;
GdmCl	chlorowodorek guanidyny;
GPCR	(ang., <i>G-protein coupled receptors</i>); receptory wykorzystujące jako przekaźnik białko G;
GR	(ang., <i>glucocorticoid receptor</i>) [NR3C1; receptor glukokortykoidowy;
GRDBD	domena wiążąca DNA białka GR;
GRE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na hormony glukokortykoidowe;
GRIP1	(ang. <i>GR-interacting protein 1</i>); jeden z koaktywatorów receptorów jądrowych;
GST	glutathiono-S-transferaza;
GTF	(ang., <i>general transcription factors</i>); główne czynniki transkrypcji ;
GST-EcRDBD	białko fuzyjne z GST umieszczoną na N-końcu;
HAT	(ang., <i>histone acetylase</i>); białko o aktywności acetylazy histonów;
HDAC	(ang., <i>histone deacetylase</i>); kompleks deacetylazy histonowej;
HNF4	(ang., <i>hepatocyte nuclear factor 4</i>) [NR2A]; sierocy receptor jądrowy kręgowców i bezkręgowców;
HRE	(ang., <i>hormone response element</i>); sekwencja DNA warunkująca odpowiedź na hormon, zlokalizowana w rejonie promotorowym docelowego genu;
HspX	(ang., <i>heat shock protein</i>); białko szoku termicznego; liczba w miejscu X oznacza masę w kilodaltonach;
<i>hsp27EcRE</i> <i>hsp27_{pal}</i> <i>hsp27_{ΔR}</i>	(ang., <i>heat shock protein 27-gene ecdysone response element</i>); sekwencja EcRE z regionu promotorowego genu <i>hsp27</i> białka Hsp27 z <i>D. melanogaster</i> ; <i>hsp27_{pal}</i> - dwuniciowy oligonukleotyd, który obejmuje pary zasad od pozycji -552 do -527 promotora genu <i>hsp27</i> , używany jako sonda w eksperymentach EMSA; <i>hsp27_{ΔR}</i> – pochodna sekwencji <i>hsp27_{pal}</i> , posiadająca tylko 5'-końcowe półmiejsce;
IPTG	izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd;

IRX	(ang., <i>inverted repeat</i>); sekwencja regulatorowa z półmiejscami ułożonymi palindromowo, zwana również odwróconym powtórzeniem; półmiejscza IR oddzielone są „odstępnikiem” długości X par zasad;
IUP	(ang., <i>intrinsically unstructured protein</i>); białko wykazujące szczątkową zawartość regularnych struktur drugo- i trzeciorzędowych w warunkach natywnych;
JH	(ang., <i>juvenile hormone</i>); hormon juwenilny;
LBD	(ang., <i>ligand-binding domain</i>); domena wiążąca ligand;
<i>Lsp2</i> EcRE	(ang., <i>larval serum protein-2</i>); EcRE z regionu regulatorowego genu <i>Lsp2</i> ; gen larwalnego białka surowicy 2 z <i>D. melanogaster</i> ;
LXR	(ang., <i>liver X receptor</i>) [NR1H]; receptor jądrowy wiążący oksysterole;
MR	(ang., <i>mineralocorticoid receptor</i>) [NR3C2]; receptor mineralokortykoidowy;
MRE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na hormony mineralokortykoidowe;
NBRE	(ang., <i>NGFI-B response element</i>); element regulatorowy wiążący receptor jądrowy NGFI-B;
<i>ng</i> EcRE	(ang., <i>new-glue protein 1 precursor</i>); sekwencja EcRE z regionu regulatorowego genu <i>ng-1</i> i <i>ng-2</i> z <i>D. melanogaster</i> ;
NCoR	(ang., <i>nuclear receptor corepressor</i>); korepresor receptorów jądrowych;
NFκB	(ang., <i>nuclear transcription factor κB</i>); prozapalny czynnik transkrypcyjny;
NGFI-B	(ang., <i>nerve growth factor - induced protein B</i>); receptor indukowany czynnikiem wzrostu komórek nerwowych; nazwa obejmuje trzy znane białka: NGFI-Bα [NR4A1], NGFI-Bβ [NR4A2] i NGFI-Bγ [NR4A3], które są kodowane przez odrębne geny;
NGFI-BDBD	domena wiążąca DNA białka NGFI-B;
NHR	(ang., <i>nuclear hormone receptor</i>); skrót wykorzystywany m.in. do określenia sierocych receptorów jądrowych zidentyfikowanych w genomie nicienia <i>Caenorhabditis elegans</i> ;
NLS	(ang., <i>nuclear localization signal</i>); sygnał lub sekwencja warunkująca jądrową lokalizację białka;
NURR1	inna nazwa receptora kręgowców NGFI-Bβ [NR4A2];

OD ₆₀₀	gęstość optyczna mierzona przy długości fali 600 nm;
OC	(ang., <i>osteocalcin</i>); sekwencja VDRE z promotora szczurzej osteokalcyny;
OctA	(ang., <i>octamer binding protein</i>); czynnik transkrypcyjny wiążący oktameryczny motyw;
PALX	sekwencja regulatorowa wiążąca receptory jądrowe, w której półmiejsca ułożone są palindromowo i oddzielone „odstępnikiem” o długości X par zasad; element wykazuje dwukrotną oś symetrii (C ²);
PB-ARE-2	(ang., <i>probasin androgen response element</i>); element regulatorowy odpowiadający na androgen, znajdujący się w promotorze genu probazyny szczura;
PCR	(ang., <i>polymerase chain reaction</i>); reakcja łańcuchowa polimeryzacji;
PDB	(ang., <i>protein data bank</i>); informatyczna baza danych, gdzie zdeponowane są m.in. struktury trzeciorzędowe białek (http://www.rcsb.org/pdb/);
PIC	(ang., <i>preinitiation complex</i>); tzw. kompleks “preinicjacyjny”, w którego skład wchodzi m.in. czynniki transkrypcyjne TF i polimeraza RNA II);
poli(dI-dC)	syntetyczny dwuniciowy polimer deoksyinozynodeoksycytozyny, wykorzystywany jako niespecyficzny kompetitor w EMSA;
PPAR	(ang., <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>); receptor aktywowany czynnikami wywołującymi proliferację peroksysomów; nazwa obejmuje trzy białka: PPARα [NR1C1], PPARβ [NR1C2] i PPARγ [NR1C3];
PR	(ang., <i>progesteron receptor</i>) [NR3C3]; receptor progesteronowy;
Pu	deoksyrybonukleotyd purynowy;
Py	deoksyrybonukleotyd pirymidynowy;
pz	para zasad;
RAR	(ang., <i>retinoid acid receptor</i>); receptor kwasu całkowicie- <i>trans</i> retinowego; nazwa obejmuje trzy białka: RARα [NR1B1], RARβ [NR1B2] i RARγ [NR1B3], kodowane przez odrębne geny;
RARDBD	domena wiążąca DNA białka RAR;
RARE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na kwas całkowicie- <i>trans</i> retinowy;
RelA	członek rodziny prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NFκB;

RevErb	represor transkrypcji, sierocy receptor jądrowy kręgowców; nazwa obejmuje dwa białka: RevErb α [NR1D1] i RevErb β [NR1D2], kodowane przez odrębne geny;
RevErDBD	domena wiążąca DNA białka RevErb;
RNaza A	rybonukleaza A;
RXR	(ang., <i>retinoid X receptor</i>); receptor kwasu 9 całkowicie- <i>cis</i> retinowego; nazwa obejmuje trzy białka: RXR α [NR2B1], RXR β [NR2B2] i RXR γ [NR2B3], kodowane przez odrębne geny;
RXRDBD	domena wiążąca DNA białka RXR;
SDS	dodecylosiarczan sodu;
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w obecności SDS;
SDS-PAG	żel wykorzystywany w eksperymencie SDS-PAGE;
SF1	(ang., <i>steroidogenic factor 1</i>) [NR5A1]; sierocy receptor jądrowy kręgowców; homologiem białka u bezkręgowców jest FTZ-F1;
SMRT	(ang., <i>silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors</i>); korepresor dla RAR i TR;
sgs EcRE	(ang. <i>salivary gland secretion protein</i>); EcRE z regionu regulatorowego genu białka kleju wydzielanego przez gruczoły ślinowe <i>D. melanogaster</i> ;
SPP	sekwencja VDRE z promotora mysiej osteopontyny (ang., <i>osteopontin</i>);
SRC-1	(ang., <i>steroid receptor coactivator</i>); koaktywator należący do grupy TIF;
TBP	(ang., <i>TATA-binding protein</i>); białko z grupy GTF wiążące sekwencję DNA, zwaną kasetą TATA; podstawowy czynnik transkrypcyjny;
TEMED	1,4-N,N,N',N'-tetrametylenodiamina;
TFIIA (B, D, E, F, H)	(ang., <i>RNA polymerase II transcription factor A, B, D, E, F, H</i>); podstawowe czynniki transkrypcyjne polimerazy RNA II;
TFE	trifluoroetanol;
TIF2	(ang., <i>transcription intermediary factor 2</i>); grupa koregulatorów pośredniczących w transaktywacji z udziałem receptorów jądrowych;

TRAP	(ang., <i>thyroid hormone receptor-associated protein complex</i>); kompleks białek pośredniczących w werbowaniu polimerazy RNA II w wyniku transaktywacji z udziałem receptorów jądrowych; inna nazwa: DRIP (ang., <i>vitamin D receptor - interacting protein complex</i>);
TR	(ang., <i>thyroid hormone receptor</i>); receptor hormonów tarczycy; nazwa obejmuje dwa białka: TR α [NR1A1] i TR β [NR1A2], kodowane przez odrębne geny;
TRE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na hormony tarczycy;
TRDBD	domena wiążąca DNA białka TR;
Usp	(ang., <i>ultraspiracle</i>) [NR2B4]; produkt genu <i>Usp</i> ; receptor jądrowy bezkręgowców; razem z EcR tworzy funkcjonalny receptor ekdysteroidowy;
UspDBD	domena wiążąca DNA białka Usp;
VDR	(ang., <i>vitamin D₃ receptor</i>) [NR1I1]; receptor 1,25-dihydroksywitaminy D ₃ ;
VDRDBD	domena wiążąca DNA białka VDR;
VDRE	sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na 1,25-dihydroksyvitaminę D ₃ ;

2

STRESZCZENIE

Funkcjonalny receptor 20-hydroksyekdyzonu (20E), owadziego hormonu steroidowego zaangażowanego w kontrolę metamorfozy i reprodukcji owadów, jest heterodimerem dwóch białek należących do nadrodziny receptorów jądrowych: receptora 20E (EcR) oraz białka Ultraspiracle (Usp). Stanowi on szczególnie atrakcyjny obiekt badawczy. Z uwagi na to, że 20E jest hormonem nietoksycznym dla organizmu człowieka, zbadanie molekularnych podstaw działania funkcjonalnego receptora 20E, może przyczynić się do zaprojektowania minimalnych czynników transkrypcji zdolnych do modulowania ekspresji genów będących pod kontrolą 20E. Czynniki te mogą znaleźć zastosowanie w terapiach genowych i agrochemii do kontroli populacji owadów. Domeny wiążące DNA (DBD) funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego wiążą specyficzne sekwencje DNA zwane elementami regulatorowymi. Większość naturalnie występujących elementów regulatorowych funkcjonalnego receptora 20E (EcRE) stanowią niedoskonałe palindromy. Najczęściej badanym EcRE jest sekwencja pochodząca z promotora genu białka szoku cieplnego *hsp27* z *Drosophila melanogaster* (*hsp27_{pal}*). Przeprowadzone wcześniej badania oddziaływania oczyszczonych DBD białek EcR i Usp z *D. melanogaster* (EcRDBD i UspDBD) z *hsp27_{pal}* pokazały, że heterodimer UspDBD/EcRDBD wiąże kooperatywnie *hsp27_{pal}* z określoną orientacją. UspDBD pełni rolę domeny predefiniującej architekturę heterokompleksu i obsadza 5'-końcowe półmiejsce *hsp27_{pal}*, natomiast EcRDBD wiąże się do półmiejsca 3'-końcowego. W nieobecności UspDBD, EcRDBD wiąże się do *hsp27_{pal}* również w postaci homodimeru. Pokazano ponadto, że C-końcowe wydłużenia (CTE) obu DBD wnoszą różny wkład w formowaniu kompleksów na *hsp27_{pal}*. W przypadku EcRDBD zasugerowano, że w tworzeniu homo- i heterodimeru istotna jest jego sekwencja CTE, w szczególności reszty wchodzących w jej skład przypuszczalnych kaset: kasety T i kasety A. Badania mutacyjne oraz analizy struktur krystalicznych DBD receptorów jądrowych związanych z asymetrycznymi elementami regulatorowymi zorganizowanymi w postaci bezpośredniego

powtórzenia (DR) podkreśliły istotne znaczenie CTE w tworzeniu kompleksów na DNA. Region CTE, w którego skład wchodzi kaseta T i kaseta A, stanowi unikalny i charakterystyczny element strukturalny, który pośredniczy w dimeryzacji na elementach typu DR i wnosi znaczący wkład w specyficzność wiązania DNA. W przeciwieństwie do kasety A, oddziałującej głównie z elementem regulatorowym, kaseta T posiada wiele funkcji, takich jak np. udział w tworzeniu specyficznych kontaktów z parami zasad DNA, tworzenie płaszczyzny dimeryzacyjnej i co najważniejsze, zapewnia ona odpowiednią orientację w stosunku do DNA dalej położonej kaseci A.

Celem niniejszej pracy było zbadanie roli C-terminalnej sekwencji EcRDBD w specyficznym rozpoznawaniu elementu regulatorowego. W szczególności postanowiono zidentyfikować reszty aminokwasowe kasety T EcRDBD istotne dla tworzenia homodimeru EcRDBD i heterodimeru UspDBD/EcRDBD na *hsp27_{pal}*. Ponadto dążono do określenia minimalnego fragmentu kasety A z CTE EcRDBD wystarczającego dla wiązania *hsp27_{pal}* i tworzenia na nim kompleksów homo- i heterodimerycznych.

W tym celu:

- Otrzymano serię mutantów EcRDBD posiadających mutacje punktowe w obszarze kasety T. Poszczególne reszty aminokwasowe zamieniono na alaninę. Białka oczyszczono, następnie zbadano wpływ wprowadzonych mutacji na homodimeryzację przy wykorzystaniu techniki EMSA. Mutanty R67A i V71A wiązały się z obniżonym powinowactwem do *hsp27_{pal}*, zarówno jako monomery i homodimery. Najsilniejszy defekt wiązania DNA zaobserwowano w przypadku, kiedy druga z reszt prolinylowych (P73) została zastąpiona alaniną. W przypadku reszty V72, podstawienie w jej miejsce alaniny spowodowało istotny wzrost powinowactwa obu kompleksów: monomeru i homodimeru do *hsp27_{pal}*. Ponadto wyniki uzyskane z analiz tworzenia heterodimerów z UspDBD pokazały, że EcRDBD wykazywał dużą tolerancję na wprowadzone mutacje w kaseci T, szczególnie w obecności UspDBD. Zakres zmian w sile wiązania DNA, w porównaniu ze zdolnością tworzenia kompleksów homodimerycznych, był zdecydowanie mniejszy. Największy defekt wiązania DNA zaobserwowano dla mutacji reszty P73. Aby sprawdzić, czy zaobserwowane zmiany w powinowactwie mutantów do *hsp27_{pal}* były efektem utraty danej reszty, czy też był to wpływ wprowadzonej mutacji, wykonano pomiary widm dichroizmu kołowego (CD). Okazało się, że niektóre mutacje wprowadziły zmiany w strukturze EcRDBD. Mutanty R67A, P68A i E74A posiadało widma CD bardzo zbliżone do widma CD białka typu „dzikiego”. Natomiast widma CD czterech innych mutantów (E69A, C70A, V71A, V72A) wykazywały mniejsze intensywności w

porównaniu z widmem CD białka typu „dzikiego”. Z kolei porównanie ze sobą widma CD białka P73A i EcRDBD typu „dzikiego” pokazało, że podstawienie reszty P73 alaniną spowodowało wzrost zawartości struktur α -helikalnych. Porównanie wyników eksperymentów EMSA i analiz widm CD sugeruje, że reszty C70, V71, V72 i P73, tworzące hydrofobowy rdzeń kasety T, pełnią ważną rolę strukturalną w utrzymywaniu właściwej konformacji regionu CTE. Uzyskane wyniki pokazują, że EcRDBD jest białkiem wykazującym plastyczność.

- Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych DBD białek EcR pochodzących z różnych organizmów wskazuje, że reszty aminokwasowe kasety T są bardzo dobrze zachowane w toku ewolucji. Wyjątek stanowi sekwencja pochodząca z *Bombyx mori*. W celu zbadania, czy kaseta T zachowuje strukturalno-funkcjonalną integralność w rodzinie, skonstruowano potrójnego mutantu EcRDBD z *D. melanogaster*, posiadającego sekwencję kasety T z *B. mori* (EcRDBD_{V72VP73Q/N75P}). Stwierdzono nieznaczne obniżenie jego zdolności do tworzenia homodimerów. Ponadto obecność trzech reszt aminokwasowych z *B. mori* nie wpłynęła znacząco na tworzenie kompleksów heterodimerycznych z UspDBD. Analiza widma CD pokazała brak znaczącego wpływu podstawień na strukturę białka. Uzyskane wyniki sugerują, że charakterystyczne aminokwasowe substytucje dla sekwencji *B. mori* zachowują strukturalno-funkcjonalną integralność regionu kasety T.
- W obrębie modułów cynkowych DBD receptorów jądrowych wykazują wysoką homologię sekwencji, jednakże w regionie CTE występują bardzo małe sekwencyjne i strukturalne podobieństwa w rodzinie. Decyduje to o unikalności i specyficzności oddziaływań białko-białko i białko-DNA tej części DBD. Region CTE domen wiążących DNA białek EcR pochodzących z różnych organizmów charakteryzuje się zdumiewającym zachowaniem w toku ewolucji. Wyjątkiem są sekwencje kasety T i kasety A z *B. mori*, odmienne od tej z *D. melanogaster* i innych przedstawicieli rodziny białek EcR. Wcześniejsze badania biochemiczne pokazały, że kaseta A jest niezbędna dla EcRDBD z *D. melanogaster* do tworzenia kompleksów homo- i heterodimerycznych na *hsp27_{pat}*. Jednakże nie określono, jak długi fragment tej kasety A jest zaangażowany w specyficzne rozpoznawanie *hsp27_{pat}*. Aby zatem określić minimalny fragment kasety A białka EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* niezbędny do specyficznego oddziaływania i tworzenia kompleksów z *hsp27_{pat}*, otrzymano szereg mutantów delecyjnych w regionie CTE obu DBD. Pokazano, że w przypadku CTE z EcRDBD *D. melanogaster* minimalny fragment ograniczony jest resztami N75 i K92. Co więcej, fragment pomiędzy K85 a K92

wyduje się być istotny dla tworzenia homodimerów EcRDBD na *hsp27_{pal}*. Natomiast w EcRDBD z *B. mori* kaseta A, która okazała się być niezbędna dla wiązania *hsp27_{pal}* i tworzenia na nim kompleksów, obejmuje reszty P75 i G89.

- Zaskakująca tolerancja EcRDBD na podstawienia reszt aminokwasowych kasety T alaniną, zrodziła ważne pytanie, czy efekt ten dotyczy tylko regionu CTE, czy też jest to właściwość, która może być obserwowana również dla innego fragmentu DBD. Aby odpowiedzieć na pytanie dotyczące plastyczności EcRDBD, otrzymano dziewięć mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD z *D. melanogaster* w których poszczególne reszty aminokwasowe zamieniono na alaninę. Wchodzące w jej skład reszty odpowiedzialne są za specyficzność wiązania receptorów jądrowych do DNA. Wyniki pokazały, że powinowactwo homodimerów do *hsp27_{pal}* zostało wyraźnie obniżone w wyniku podstawienia alaniny w pozycjach G20, K22, R26, R27, S28 i K31. Mutanty K22A, R26A, R27A i K31A wykazywały największy defekt w wiązaniu DNA, podczas gdy zdolność tworzenia homodimerów przez mutanty G20A i S28A uległa nieznacznemu, w porównaniu do EcRDBD typu „dzikiego”, osłabieniu. Zastąpienie glicyny w pozycji 23 i treoniny w pozycji 30 alaniną spowodowało wzrost powinowactwa kompleksów homodimerycznych tych mutantów do *hsp27_{pal}*. Mutacja jednej z kluczowych reszt kasety P - E19 nie zmieniła znacząco siły wiązania DNA. Eksperymenty przeprowadzone z użyciem pochodnej elementu *hsp27_{pal}*, posiadającej wyłącznie 5'-końcowe półmiejsce *hsp27_{pal}* (*hsp27_{ΔR}*), pokazały, że reszty G20 i S28 mogą być zaangażowane w wiązanie 3'-końcowego półmiejsca elementu *hsp27_{pal}*. Mutanty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD wykazywały tolerancję na podstawienia reszt alaniną podczas tworzenia heterodimerów z UspDBD na *hsp27_{pal}*. Zakres zmian w powinowactwie heterodimerów do DNA w porównaniu do homodimerów był zdecydowanie mniejszy. Kluczowe dla tworzenia heterodimeru z UspDBD okazały się być reszty K22, R26 i R27. Jednakże tylko reszta R27 EcRDBD wydaje się być niezbędna w tworzeniu heterodimeru. Wprowadzone mutacje wyidukowały w niektórych mutantach zmiany w strukturze, co pokazały analizy widm CD. Widma CD mutantów K22A, R26A, S28A i T30A były zasadniczo porównywalne z widmem CD białka typu „dzikiego”. Zaobserwowane zmiany aktywności wiązania DNA dla tych białek mogą być zinterpretowane jako utrata kontaktu danych reszt z *hsp27_{pal}*. Widma CD pozostałych mutantów różniły się od widma CD typu „dzikiego”. Mogłoby to oznaczać, że zaobserwowane funkcjonalne efekty dla reszt E19, G20, G23, R27 i K31 mogą być

interpretowane zarówno jako konsekwencja strukturalnych zmian wywołanych wprowadzoną mutacją lub utraty poszczególnych reszt. Analizy eksperymentów EMSA i widm CD pokazały, że tylko reszty K22, R26 i S28 EcRDBD są odpowiedzialne za oddziaływanie z *hsp27_{pal}*, nie uczestniczą one natomiast w stabilizacji zarówno α -helisy jak i całej cząsteczki EcRDBD. Natomiast pozostałe reszty, istotne dla efektywnego wiązania *hsp27_{pal}*, włączając R27, są w pewnej mierze zaangażowane w stabilizację EcRDBD. Ponadto otrzymane wyniki potwierdziły przypuszczenie, iż EcRDBD wykazuje dużą plastyczność w obecności partnera - białka UspDBD.

- Aby sprawdzić, czy plastyczność EcRDBD jest odzwierciedlona w jego stabilności, przeprowadzono eksperymenty denaturacji chemicznej przy użyciu chlorowodoru guanidyny. Wyniki pokazały, że w przeciwieństwie do UspDBD, EcRDBD jest białkiem niestabilnym. Wcześniejsze doniesienia literaturowe dotyczące eksperymentów denaturacji chemicznej DBD ssaczych receptorów jądrowych pokazały, że białka te, pozbawione zasadowego CTE, wykazywały większą stabilność. W celu zbadania, czy stabilność EcRDBD jest zależna od obecności regionu CTE, wykonano pomiary dla mutanta pozbawionego naładowanych dodatnio reszt aminokwasowych kasety A. Okazało się, że sekwencja kasety A nie destabilizuje EcRDBD. Jak się wydaje, brak stabilności jest inherentną cechą rdzenia domeny.
- Zbadano, czy zdenaturowany chlorowodorkiem guanidyny EcRDBD zdolny jest do odtworzenia swojej aktywnej struktury po renaturacji. Zaobserwowano, że homodimer utworzony przez EcRDBD z *D. melanogaster* odzyskał około 79% aktywności wiązania *hsp27_{pal}*, homodimer EcRDBD z *B. mori* około 75%, natomiast w przypadku heterodimerów UspDBD/EcRDBD z *D. melanogaster* utworzonych przez niedenaturowane i renaturowane DBD, zaobserwowano prawie identyczne powinowactwo do elementu regulatorowego, które wynosiło około 90% aktywności wiązania DNA przez heterodimer typu „dzikiego” nie poddany działaniu denaturanta.

WSTĘP

3

Organizmy wielokomórkowe wymagają specyficznej komunikacji międzykomórkowej, aby właściwie zorganizować podczas stadium embriogenezy plan budowy całego organizmu i później, żeby utrzymać jego właściwości i funkcje w ciągu całego okresu życia. Wzrost komórek organizmów eukariotycznych, ich różnicowanie się, organizacja w odpowiednie tkanki, specyficzne odpowiedzi na zmiany środowiska zewnętrznego oraz inne ważne funkcje, niejednokrotnie decydujące o życiu lub śmierci organizmu, modulowane są i koordynowane przez tzw. „chemicznych posłańców”, którymi są cząsteczki sygnałowe (Tata, 2002). Ponad sto lat temu, Bayliss i Starling (1902) użyli po raz pierwszy słowa „hormon” (gr., *hormao*, „pobudzam, stymuluję, poruszam”¹), aby określić wydzielinę trzustkową. Do substancji sygnałowych zaliczyć można: hormony steroidowe (glukokortykoidy, mineralokortykoidy, estrogeny, progesteron, androgeny), hormony niesteroidowe, hormony tarczycy, pochodne witaminy D₃ i kwasy retinowe, hormony peptydowe, neurotransmitery, cytokiny oraz wiele innych cząsteczek przekąźnikowych (Alberts i wsp., 1994; Rosen i wsp., 1995).

Informacja o zasadach prawidłowego funkcjonowania organizmu - można w tym miejscu pokusić się o filozoficzne stwierdzenie „przepis na życie”- zapisana jest w genach. Owe tajemnicze „zarodki” przenoszone między rodzicami spędzały sen z powiek starożytnym filozofom, starającym się przekazać swoim uczniom ówczesne rozumowanie praw rządzących naturą:

(...) A gdy się miesza nasienie, to jeśli wtedy kobieta
Nagłym atakiem zwycięży moc męską i nią zawładnie,

¹ Wielka Encyklopedia Powszechna, Tom 4, PWN, Warszawa 1994.

Z nasienia matek się rodzą dzieci podobne do matek,
Jak z ojcowego do ojców. Jeżeli zaś widzisz w dzieciach
Obraz podwójny, łączący twarze obojga rodziców,
Te rodzą się z krwi i ciała zarówno ojca, jak matki,
Kiedy wzajemny i zgodny żar zderzył z sobą zarodki,
Dobytą się z członków za sprawą bodźców Wenery,
I żadne z nich nie zostało zwycięzcą ni zwyciężonym.
I bywa też, iż niekiedy rodzą się dzieci podobne
Do dziadów, bywa, że czasem przypominają pradziadów;
A dzieje się tak dlatego, że często rodzice kryją
W swych ciałach wiele zmieszanych na różny sposób zarodków,
Które dziedzictwem są rodu, przechodząc z ojca do ojca.
Stąd Wenus przez różny wybór wytwarza różne postacie,
Mając oblicza przodków, a także ich głos i włosy;
Bo one też nie powstają z przypadkowego nasienia,
Tak samo jak nasze twarze, jak nasze ciała i członki.
Następnie, jak z ojcowskiego nasienia może się rodzić
Płeć żeńska, tak z matczynego rodzą się również mężczyźni;
Albowiem płód zawsze składa się z dwoistego nasienia (...)

(T. Lucretius Carus „O naturze rzeczy”, IV; 1208-1229, PIW, W-wa 1994)

W regulacji ekspresji genów biorą m.in. udział czynniki transkrypcyjne, do których zalicza się receptory jądrowe. Należą one do wyspecjalizowanej grupy białek odbierających informacje ze środowiska zewnętrznego komórki i przekazujących je do odpowiednich systemów efektorowych znajdujących się w komórce. Obiektem badawczym niniejszej pracy jest receptor owadziego hormonu 20-hydroksyekdyzonu, należący do nadrodziny receptorów jądrowych, będących czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez związanie się odpowiedniego liganda, którym mogą być hormony lub też inne małe lipofilowe cząsteczki sygnałowe. Receptory jądrowe posiadają w domenie wiążącej DNA zachowane w toku ewolucji osiem reszt cysteinyłowych koordynujących dwa atomy Zn^{2+} , tworząc charakterystyczną strukturę przestrzenną modułów cynkowych, która wiąże tzw. elementy regulatorowe DNA. Szczegółowe poznanie molekularnych podstaw oddziaływania domen wiążących DNA receptorów jądrowych z tymi specyficznymi sekwencjami przyczyni się do zrozumienia mechanizmu kontroli transkrypcji genów będących pod kontrolą specyficznych hormonów. Może też dostarczyć niezbędnych informacji do konstruowania sztucznych czynników transkrypcyjnych mogących znaleźć zastosowanie w medycynie, np. w terapiach genowych oraz w przemyśle biotechnologicznym, który w dużej mierze opiera się na nowoczesnych technikach biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Intensywny w ostatnich latach rozwój nowych gałęzi nauk biologicznych, takich jak: *proteomika* - nauka

zajmująca się kompleksowym badaniem struktury i funkcji białek (proteomu) (ang. „proteome = *protein* + *genome*”) (Pandey i Mann, 2000; Lockhart i Winzeler, 2000), otwiera przed naukowcami nowe możliwości eksperymentalne w biochemii i biologii molekularnej, które pozwolą poznać mechanizm kontroli ekspresji genów i tym samym przepływu informacji genetycznej od DNA do białka, podstawy czegoś, co nazywamy *życiem*. Niniejsza praca stanowi skromny wkład w tym procesie poznawczym.

Wstęp poświęcony będzie strukturze, funkcjom i mechanizmom działania receptorów jądrowych kręgowców, z uwzględnieniem elementów strukturalnych kompleksów receptorów z DNA. Szczególna uwaga poświęcona będzie receptorowi ekdsteryoidowemu owadów.

3.1. SZLAKI PRZEPŁYWU SYGNAŁÓW W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH

Organizmy żywe koordynują swoje aktywności na każdym poziomie organizacyjnym poprzez kompleks chemicznych systemów sygnalizacyjnych. W przekazywaniu sygnałów płynących ze środowiska zewnętrznego komórki do jej systemów docelowych znajdujących się wewnątrz komórki pośredniczą receptory. U wyższych eukariotów wyróżnia się dwa główne szlaki przekazywania sygnałów. Pierwszy opiera się na obecności „zakotwiczonych” w błonie cytoplazmatycznej receptorów, które w wyniku związania się czynnika sygnałowego indukują kaskadę reakcji prowadzących do aktywacji czynników transkrypcyjnych. Drugi szlak wykorzystuje obecność w jądrze komórkowym tzw. „receptorów jądrowych”, które po związaniu odpowiedniego liganda regulują transkrypcję wybranych genów (Gronemeyer i Laudet, 1995).

Ogólny mechanizm przekazywania sygnału można opisać w uproszczeniu następująco: (1) wytworzenie sygnału, który może być pochodzenia endokrynnego, parakrynnego lub, co jest możliwe, autokrynnego; (2) jego transport do wnętrza (i/lub wewnątrz) docelowych komórek ekspresjonujących odpowiedni receptor (transport ułatwiony przez białka wiążące); (3) związanie z białkiem receptorowym; (4) regulacja transkrypcji określonej grupy genów (Gronemeyer i Laudet, 1995). Należy jednak pamiętać, że chociaż przedstawione powyżej szlaki przekazywania sygnału różnią się, nie są one od siebie niezależne i mogą one wzajemnie wpływać na siebie, co określane jest jako porozumiewanie się kaskad

przekazywania sygnałów lub tzw. sygnalizacja krzyżowa (ang., *cross-talk*²) (Göttlicher i wsp., 1998; Arzt i wsp., 2000; Favre-Young i wsp., 2000; Doppler i wsp., 2000; Kato i wsp., 2000; Harnish i wsp., 2000; Widen i wsp., 2000; Herrlich, 2001; Wong i wsp., 2001; Xu i wsp., 2001; Fiebeler i wsp., 2001). Przykładów sygnalizacji krzyżowej dostarczają rezultaty badań otrzymane dla czynników transkrypcyjnych, przykładowo dla Oct2A (ang., *octamer binding protein*) i RelA (członek rodziny NFκB; ang., *nuclear transcription factor κB*), podczas których zaobserwowano, że aktywności tych czynników są regulowane przez receptory jądrowe (Göttlicher i wsp., 1998).

Ze względu na budowę receptorów, szybkość przekazywania sygnału oraz sposób przenoszenia informacji z receptora na system efektorowy, receptory podzielono na cztery grupy. Pierwsze trzy grupy obejmują białka związane z błoną komórkową. Do grupy pierwszej zaliczono receptory bezpośrednio związane z kanałem jonowym i przenoszące sygnały w transmisji synaptycznej. Pobudzenie receptora przez związki sygnałowe (neuroprzekaźniki lub neuromodulatory) prowadzi do przejściowego zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej dla określonych jonów prowadząc do depolaryzacji lub hiperpolaryzacji błony. Drugą grupę stanowią receptory wykorzystujące jako przekaźnik białko G (receptory GPCR; ang., *G-protein coupled receptors*). GPCR należą do największej i najbardziej zróżnicowanej grupy receptorów, do której należą receptory dla większości neuroprzekaźników i neuromodulatorów, np. receptory dopaminowe, receptory adrenergiczne, receptory opioidowe i histaminowe (Nowak i Zawilska, 2004). Do grupy trzeciej zaliczono receptory związane z kinazą tyrozylową (receptory takich hormonów jak insulina, prolaktyna, hormon wzrostu oraz receptory cytokin), biorące udział w fosforylacji szeregu białek wewnątrzkomórkowych. Czwartą grupę stanowią białka wewnątrzkomórkowe, niezwiązane z błoną komórkową. Receptory wewnątrzkomórkowe są receptorami jądrowymi (Gronemeyer i Laudet, 1995; Nowak i Zawilska, 2004). Receptory jądrowe modułują ekspresję określonych genów wiążąc się, po przyłączeniu specyficznego liganda, bezpośrednio z określonymi sekwencjami DNA, umiejscowionymi w regionach regulatorowych genów (Kwiatkowska i Kwiatkowska-Korczak, 2000; Laudet i Gronemeyer, 2002).

² Przy tłumaczeniu nazw z języka angielskiego starano się stosować terminologię najczęściej występującą w literaturze polskojęzycznej (Stryer, 1997; Kwiatkowska i Kwiatkowska-Korczak, 2000; Kwiatkowska-Korczak i Kwiatkowska, 2000; Nowak i Zawilska, 2004). W nawiasach podawano termin przyjęty w języku angielskim. Gdy bezpośrednie tłumaczenie było niemożliwe, posługiwano się terminem angielskim. Autor niniejszej pracy pragnie przeprosić za ewentualne błędy językowe lub zbyt dosłowne tłumaczenie niektórych terminów, wynikłe z trudności w znalezieniu odpowiedniej terminologii polskiej.

3.2. RECEPTORY JĄDROWE KRĘGOWCÓW

3.2.1. Nadrodzina receptorów jądrowych kręgowców

Przekazywanie sygnałów z udziałem receptorów jądrowych jest jednym z głównych paradygmatów transdukcji sygnału wytworzonym w toku ewolucji przez organizmy wielokomórkowe w celu regulacji transkrypcji genów (Robinson-Rechavi i wsp., 2001). Receptory jądrowe są ważnymi, zależnymi od liganda, czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w wielu istotnych procesach życiowych komórki, takich jak np. wzrost, różnicowanie się, rozwój i homeostaza organizmu (Evans, 1988). Zlokalizowane są głównie w jądrze komórkowym (Welshons i wsp., 1984). Ich charakterystyczną cechą odróżniającą je od innych czynników transkrypcyjnych jest właśnie zdolność do specyficznego wiązania małych, hydrofobowych cząsteczek. Badania molekularne i strukturalne pokazały, że ligandy modyfikują aktywność transkrypcyjną receptorów jądrowych poprzez zmiany konformacyjne, prowadzące do rozpadu kompleksu korepresorów, co z kolei umożliwia przyłączenie koaktywatorów i aktywację transkrypcji (Schwabe, 1996; Kamei i wsp., 1996; Glass i wsp., 1997; McKenna i wsp., 1999; Kingston i Narlikar, 1999; Egea i wsp., 2000; Renaud i Moras, 2000; Lee i Lee Kraus, 2001). Receptory jądrowe poddawane są licznym modyfikacjom, które modulują ich aktywność. Oprócz zmian konformacji indukowanych przyłączeniem liganda, modyfikacje wywoływane są również oddziaływaniami z innymi białkami (koregulatorami, innymi receptorami jądrowymi lub czynnikami transkrypcyjnymi) lub oddziaływaniami z elementami regulatorowymi (Laudet i Gronemeyer, 2002). Receptory jądrowe mogą także ulegać fosforylacji (Rauch i wsp., 1998; Tremblay i wsp., 1999; Yudt i wsp., 1999; Song i wsp., 2003) katalizowanej przy udziale kinaz aktywowanych przez hormony białkowe lub białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego. Stanowi to przykład sygnalizacji krzyżowej z udziałem receptorów jądrowych. Jednym z godnych uwagi przykładów jest fosforylacja receptora estrogenowego (ER α) (Yudt i wsp., 1999). Receptor ten ulega fosforylacji przez kinazę A na reszcie Ser537, w wyniku czego dochodzi do takich zmian konformacyjnych wyindukowanych przez fosfoserynę, które powodują, że receptor ER α staje się konstytutywnie aktywny.

Ligandami receptorów jądrowych mogą być naturalne związki sygnałowe lub związki egzogenne posiadające strukturę zbliżoną do naturalnych, umożliwiającą im wiązanie się do receptora. W wyniku związania się specyficznego liganda z receptorem, dochodzi do jego aktywacji lub represji. Ligandy aktywujące receptor to agoniści, natomiast ligandy hamujące

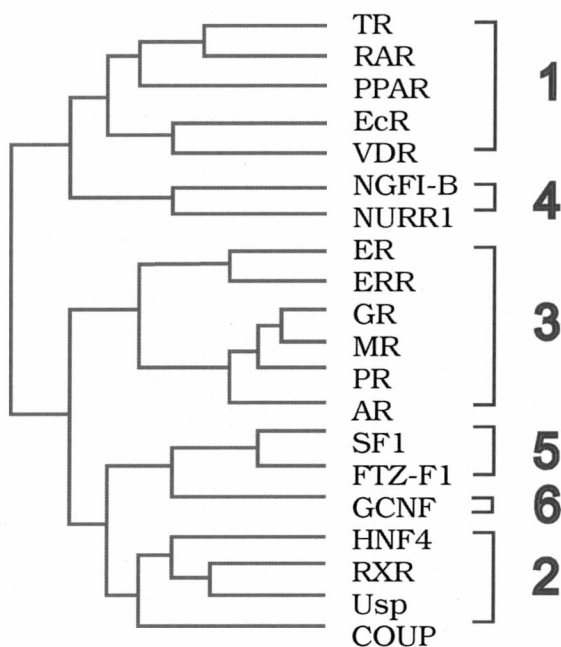
ich aktywność to antagoniści (Renaud i Moras, 2000). Zasadniczą cechą odróżniającą agonistę od antagonisty jest tzw. aktywność wewnętrzna związku, czyli zdolność do aktywacji receptora (Nowak i Zawilska, 2004). Wiązanie przez receptory jądrowe cząsteczek sygnałowych i modulowanie w wyniku tego procesu aktywności receptorów, wykorzystywane jest w farmakologii i medycynie jako potencjalne narzędzie w walce m.in. z chorobami nowotworowymi i w różnego rodzaju terapiach hormonalnych (Laudet i Gronemeyer, 2002).

Do rodziny receptorów jądrowych zalicza się receptory hormonów steroidowych kręgowców: glukokortykoidów (GR) (Hollenberg i wsp., 1985), estrogenów (ER) (Green i wsp., 1986), progesteronu (PR) (Conneely i wsp., 1986), mineralokortykoidów (MR) (Patel i wsp., 1989), androgenów (AR) (Chang i wsp., 1988) oraz inne receptory jądrowe hormonów, takich jak receptory hormonów tarczycy (TR) (Weinberger i wsp., 1996), 1,25-dihydroksywitaminy D₃ (VDR) (Baker i wsp., 1988), kwasu całkowicie-*trans*-retinowego (RAR) (Giguere i wsp., 1987) oraz kwasu 9-*cis*-retinowego (RXR) (Mangelsdorf i wsp., 1990). Do rodziny receptorów jądrowych należy także produkt genu *EcR* u owadów, receptor wiążący jedyny znany hormon steroidowy stawonogów (20-hydroksyekdyzon) (*EcR*) [*NR1H1*]³ (Koelle i wsp., 1991). Ligandami receptorów jądrowych mogą być również pochodne metabolitów, takich jak np. prostaglandyny, kwasy tłuszczowe, farnesol czy cholesterol. Białka te mogą ponadto odpowiadać na sygnały pochodzenia niehormonalnego od kinaz białkowych lub cytokin (Denner i wsp., 1990; Weigel, 1996; Tremblay i wsp., 1999; de Urquiza i wsp., 2000; Repa i Mangelsdorf, 1999; Speirs i wsp., 2000; Yamamoto i wsp., 2001; Laudet i Gronemeyer, 2002). Receptory jądrowe, dla których nie znaleziono liganda należą do klasy tzw. receptorów „sierocych” (ang., *orphan receptors*) (Sladek i wsp., 1990; Sher i wsp., 1993; Seol i wsp., 1995; Enmark i Gustafsson, 1996; Laudet i Gronemeyer, 2002). Występują one zarówno u prymitywnych nicieni (*Caenorhabditis elegans*) (Kostrouch i wsp., 1995), owadów (Segraves, 1994), jak i u kręgowców (Mangelsdorf i Evans, 1995). Pomimo iż cząsteczki sygnałowe dla tych receptorów nie są znane, białka te biorą udział w regulacji rozwoju organizmu. Są one ekspresjonowane w różnych stadiach życia i jak zaobserwowano, wyłączenie ich genów prowadzi do zaburzeń prawidłowych funkcji w tych procesach (Segraves, 1994; Kostrouch i wsp., 1995). Istnieje pogląd, że receptory jądrowe wyeluwowały od wspólnego „sierocego” przodka, a następnie dopiero później wykształciły

³ W nawiasie podano numer identyfikacyjny *EcR* wynikający z klasyfikacji i systemu nazewnictwa zaproponowanego przez Komitet Nomenklatury Receptorów Jądrowych (ang., *Nuclear Receptors Nomenclature Committee*) w 1999 roku.

zdolność wiązania związków sygnałowych (Escriva i wsp., 1997). Tym niemniej, tak długo jak ligandy dla uprzednio sklasyfikowanych jako sieroce receptorów są identyfikowane, nie można wykluczyć, że wszystkie receptory jądrowe mogą posiadać odpowiednie ligandy. Możliwe jest również, że pewna grupa receptorów sierocych funkcjonuje w komórkach jako konstytutywne koaktywatory lub korepresory transkrypcji (Laudet i Gronemeyer, 2002).

Postęp jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w dziedzinie odkrywania nowych genów receptorów i jednocześnie bogactwo ich nazw sprawiły, że dotychczasowe oznaczenia stawały się coraz bardziej zawiłe i wprowadzały chaos w klasyfikacji receptorów. Istnienie kilku nazw dla tego samego genu stanowi ważny problem w przypadku receptorów sierocych, które często nie mogą być scharakteryzowane pod względem pełnionych funkcji.



Rys.3.1. Schemat drzewa filogenetycznego nadrodziny receptorów jądrowych.

Zamieszczony uproszczony schemat nie obejmuje wszystkich białek należących do przedstawionych sześciu podgrup. Podrodzina pierwsza obejmuje receptory tworzące heterodimery z RXR lub Usp⁴, do grupy tej należy również receptor RevErb; druga to receptory z grupy RXR; trzecia obejmuje receptory hormonów steroidowych oraz ERR; do czwartej należy podgrupa NGFI-B; piątą stanowią receptory sieroce grupy SF1; szósta - GCNF. Receptory, które posiadają tylko jedną z dwóch zachowanych ewolucyjnie domen (domenę wiążącą DNA lub domenę wiążącą ligand) zostały przyporządkowane do podrodziny 0 (siódmej), nie uwzględnionej na schemacie. W tej grupie znajdują się receptory pozbawione klasycznej domeny wiążącej DNA lub klasycznej domeny wiążącej ligand. Schemat wykonano na podstawie Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999) oraz Renaud i Moras (2000). Regularne uaktualnienia zamieszczane są na stronie <http://www.ens-lyon.fr/LBMC/laudet/nomenc.html> (Laudet i Gronemeyer, 2002).

⁴ Skróty nazw receptorów, które nie zostały dotąd wprowadzone, wyjaśniono w spisie skrótów.

Na podstawie zdeponowanych w bazach informatycznych sekwencji cDNA receptorów jądrowych skonstruowano dotychczas kilka tzw. „drzew filogenetycznych” (Amero i wsp., 1992; Laudet i wsp., 1992; Detera-Wadleigh i Fanning, 1994). W roku 1999 postanowiono uporządkować zgromadzone dane i wprowadzono ujednolicony system nazewnictwa nadrodziny receptorów jądrowych, używany do dnia dzisiejszego (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Według tego systemu, receptory jądrowe podzielono na siedem podrodziny (Rys.3.1.). Receptory, które posiadają tylko jedną z dwóch zachowanych ewolucyjnie domen (domenę wiążącą DNA lub domenę wiążącą ligand) zostały dodatkowo przyporządkowane do podrodziny 0, nie uwzględnionej na Rysunku 3.1.. W tej grupie znajdują się receptory pozbawione klasycznej domeny wiążącej DNA lub klasycznej domeny wiążącej ligand (Renaud i Moras, 2000). Do tej pory zidentyfikowano 21 genów receptorów jądrowych w genomie *Drosophila melanogaster* (Adams i wsp., 2000; Rubin i Lewis, 2000) i ponad 270 w *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Sluder i Maina, 2001). Szacowanie liczby genów receptorów jądrowych w genomie człowieka (Venter i wsp., 2001; Sachidanandam i wsp., 2001), wykonane na podstawie analiz filogenetycznych i porównania sekwencji, wykazało obecność u *Homo sapiens* 49 genów receptorów i 3 pseudogenów (Robinson-Rechavi i wsp., 2001). Interesujący jest fakt, iż nie znaleziono dotąd liganda dla żadnego z poznanych receptorów jądrowych nicieni. Godna uwagi jest też wyjątkowa liczba genów (ponad 270(!)) jak na tak prymitywny organizm, jakim jest *C. elegans*. Sugeruje się, iż tak niespotykane zróżnicowanie rodziny receptorów jądrowych u nicieni może być wynikiem ewolucyjnej adaptacji środowiskowej (Sluder i Maina, 2001). Fenomen ten może mieć znaczenie w tworzeniu farmaceutyków i w dokładnym poznaniu tych pasożytów (Enmark i Gustafsson, 2001).

Wśród receptorów jądrowych wyróżnia się wiele podtypów i izoform dla poszczególnych rodzajów białek. Przykładowo w komórkach mysich, ekspresjonowany jest TR α (izoformy $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), TR β (Wood i wsp., 1991), RAR α , β , γ (izoformy 1, 2 dla wszystkich podtypów i dodatkowo 3, 4 dla RAR γ) (Pemrick i wsp., 1994) oraz RXR α , β , γ (Mangelsdorf i wsp., 1992; Pemrick i wsp., 1994). W komórkach ludzkich obok ER α (Green i wsp., 1986), występuje ER β (Mosselman i wsp., 1996). Oba podtypy białek receptora estrogenowego nie są izoformami lecz odrębnymi białkami kodowanymi przez różne geny (Ogawa i wsp., 1998). Ponadto ekspresjonowanych jest wiele izoform receptorów sierocych takich jak np. FTZ-F1 (ang., *fushi tarazu factor 1*) z *Drosophila melanogaster* (Lavorgna i wsp., 1993). Poszczególne izoformy receptorów powstają w wyniku alternatywnego składania

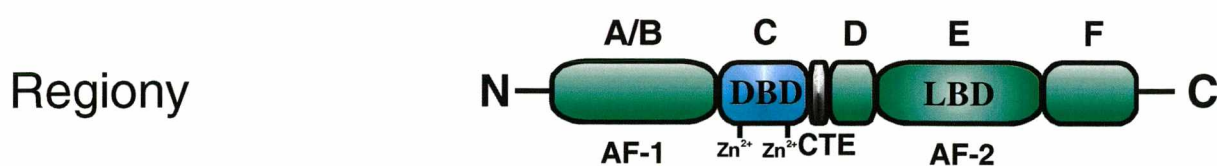
(ang., *splicing*), wykorzystywania różnych promotorów oraz różnych miejsc inicjacji translacji (Gronemeyer i Laudet, 1995). Jak zaobserwowano, podtypy i izoformy mogą być w sposób specyficzny ekspresjonowane w różnych typach komórek, stadiach rozwojowych organizmu, co sugeruje, iż mogą pełnić odmienne role fizjologiczne (Lavorgna i wsp., 1993; Gronemeyer i Laudet, 1995; Luo i wsp., 1996; Keightley, 1998). Ponadto uważa się, że różnorodność form receptorów może wynikać z tkankowej, genowej i rozwojowej specyficzności złożonego działania hormonów (Kuiper i wsp., 1996; Mansen i wsp., 2001; Cheng i wsp., 2001). Podtypy i izoformy mogą również pośrednio lub bezpośrednio oddziaływać ze sobą, co pokazano wykonując eksperymenty blokowania genów (ang., *knockout*), w których aby uzyskać wyraźną zmianę fenotypu blokowano transkrypcję genów kilku izoform. Ten aspekt różnorodności izoform lub podtypów receptorów generujący różnorodność odpowiedzi na określony hormon zilustrowano dobrze na przykładzie mysich TR α i TR β (Gauthier i wsp., 1999; Mansen i wsp., 2001).

3.2.2. Budowa domenowa receptorów jądrowych

Receptory jądrowe zbudowane są z 5-6 regionów (od A do F), posiadających strukturę modułarną (Rys.3.2.) (Krust i wsp., 1986; Laudet i Gronemeyer, 2002).

Region A/B obejmuje N-koniec łańcucha polipeptydowego i posiada najmniejszy stopień homologii sekwencji w rodzinie. Nie jest on zachowany w toku ewolucji nawet w obrębie izoform danego receptora. Region ten należy do najbardziej zmiennych pod względem sekwencji pierwszorzędowych oraz długości, która waha się od 23 reszt aminokwasowych w receptorze VDR do 602 w MR (Krust i wsp., 1986; Arriza i wsp., 1987). W wyniku wykorzystywania różnych promotorów, alternatywnemu składaniu wczesnych transkryptów oraz wyborowi różnych miejsc inicjacji startu translacji, dochodzi do powstawania różnych subtypów i izoform receptorów jądrowych (Tora i wsp., 1988; Nagpal i wsp., 1992). Region A/B posiada reszty aminokwasowe ważne dla aktywacji transkrypcji docelowych genów. Tworzą one domenę transaktywacyjną 1 (AF-1, ang., *activation function 1* lub TAF-1, ang., *transactivation function 1*), która jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji niezależnie od obecności liganda i specyficznie dla różnych izoform receptorów (Hollenberg i Evans, 1988; Tora i wsp., 1988; Tora i wsp., 1989; Bocquel i wsp., 1989; Sartorius i wsp., 1994; Laudet i Gronemeyer, 2002). Jak do tej pory nie jest znana struktura trzeciorzędowa tego regionu; również szacowanie zawartości struktury drugorzędowej

sprawia dużo kłopotów, ze względu na złożone właściwości tego obszaru. Jednakże badania NMR i pomiary dichroizmu kołowego (CD, ang., *circular dichroism*) pokazały, że region AF-1 receptora GR oraz N-końcowe regiony ER α i ER β są w roztworze wysoce nieuporządkowane (Dahlman-Wright i wsp., 1995; Wärnmark i wsp., 2001). Ponadto eksperymenty ograniczonej proteolizy przeprowadzone na receptorze PR również ujawniły brak zdefiniowanej struktury dla tego izolowanego regionu (Birnbaumer i wsp., 1983; Bain i wsp., 2000). Uważa się jednak, że te izolowane fragmenty, chociaż ubogie w struktury wyższych rzędów, mogą być stabilizowane w kontekście całego nienaruszonego receptora (Wärnmark i wsp., 2003). Świadczyć o tym mogą chociażby badania wykonane na regionie N-końcowym PR, który, jak pokazano, był bardziej ustrukturyzowany, kiedy został wyekspresjonowany razem z domeną wiążącą DNA. Świadczy to o występowaniu allosterycznych efektów lub wewnątrz-cząsteczkowych oddziaływań w białku (Bain i wsp., 2000; Bain i wsp. 2001). Podobne obserwacje uzyskano dla GR (Kumar i wsp., 1999). Wydaje się, że dla aktywacji transkrypcji istotne są hydrofobowe reszty regionów AF-1 dla GR (Almlöf i wsp., 1995). Co więcej, jak pokazały pomiary CD i spektroskopii NMR regionu AF-1 GR w obecności trifluoroetanolu (TFE), czynnika silnie stabilizującego struktury α -helikalne, domena ta wykazywała znaczącą α -helikalną charakterystykę (Dahlman-Wright i wsp., 1995). Aktywacja transkrypcji genów zachodzi najprawdopodobniej w wyniku oddziaływania m.in. z innymi czynnikami transkrypcyjnymi i/lub koregulatorami. Pokazano, że kilka różnych koaktywatorów może wiązać się z regionem AF-1 receptorów jądrowych, przykładowo TBP (ang., *TATA-binding protein*), CBP (ang., *CREB-binding protein*) i DRIP (ang., *vitamin D receptor-binding protein complex*) bezpośrednio oddziałują z domeną AF-1 GR (Ford i wsp., 1997; Henriksson i wsp., 1997; Almlöf i wsp., 1998; Hittelman i wsp., 1999), jednakże strukturalne podstawy tych oddziaływań nie są dobrze poznane. Postuluje się, że formowanie struktury drugorzędowej w regionie obejmującym AF-1 jest istotnym krokiem w aktywacji transkrypcji (Dahlman-Wright i wsp., 1995; Wärnmark i wsp., 2001). W obrębie domeny AF-1 znajduje się ponadto wiele miejsc ulegających fosforylacji (Shao i Lazar, 1999). Możliwe jest, że fosforylacja regionu AF-1 indukuje prawidłową konformację domeny transaktywacyjnej, jednak molekularne i funkcjonalne aspekty tego procesu nie są jeszcze do końca zrozumiałe i poznane. Podobnie z resztą, jak i synergizm tego regionu z drugim obszarem wykazującym aktywność transaktywacyjną zależną od liganda, znajdującym się w domenie wiążącej ligand (region E receptorów jądrowych) (Laudet i Gronemeyer, 2002; Wärnmark i wsp., 2003).



Najważniejsze funkcje:

Aktywacja transkrypcji

niezależna od liganda

zależna od liganda

Wiązanie DNA

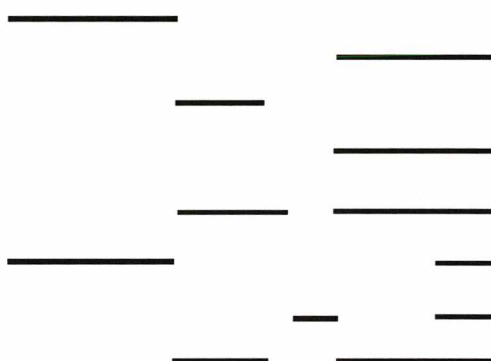
Wiązanie liganda

Dimeryzacja

Wiązanie koaktywatorów

Wiązanie korepresorów

Lokalizacja jądrowa (NLS)



Rys.3.2. Schemat strukturalnej i funkcjonalnej organizacji receptora jądrowego.

Receptory jądrowe wykazują modularną budowę. Zbudowane są z sześciu regionów. Począwszy od N-końca wyróżnia się: region A/B, którego długość jest różna dla poszczególnych białek oraz dla różnych izoform tego samego receptora; C - domenę wiążącą DNA (DBD); D - zmienny region zawiasowy; E - domenę wiążącą ligand (LBD). Na C-końcu niektórych receptorów znajduje się region o zmiennej długości i nieznanej funkcji (F). Liniami poziomymi pod schematem receptora zaznaczono regiony, które są odpowiedzialne za wymienione po lewej stronie funkcje, przy czym ich długość nie jest związana z wielkością danego fragmentu białka pośredniczącego w danej funkcji. Pozostałe oznaczenia: AF-1 i AF-2, funkcje aktywacji transkrypcji niezależnej i zależnej od ligandu; CTE, C-końcowe wydłużenie DBD; NLS, sekwencje sygnału lokalizacji jądrowej. Więcej szczegółów podano w tekście. Schemat wykonano na podstawie Renaud i Moras (2000) i Laudet i Gronemeyer (2002).

Region C jest regionem o najwyższym stopniu homologii sekwencji sięgającej 50% w rodzinie receptorów jądrowych (Gronemeyer i Laudet, 1995; Evans, 1988; Laudet i Gronemeyer, 2002). Jest on odpowiedzialny za specyficzne rozpoznawanie sekwencji regulatorowych DNA oraz dimeryzację receptorów na DNA (Green i wsp., 1988; Khorasanizadeh i Rastinejad, 2001; Laudet i Gronemeyer, 2002). Region ten zwany jest również domeną wiążącą DNA (DBD; ang., *DNA-binding domain*). Zbudowany jest on z około 66 reszt, w tym z ośmiu zachowanych reszt cysteinyliowych wiążących tetraedrycznie dwa jony cynku (Freedman i wsp., 1988; Baumann i wsp., 1993). W ten sposób tworzone są charakterystyczne dla tej grupy białek struktury trzeciorzędowe zwane „modułami

cynkowymi” typu Cys₈ (Berg i Shi, 1996; Laudet i Gronemeyer, 2002). Ponadto, tuż za drugim modulem cynkowym znajduje się tzw. C-końcowe przedłużenie (lub wydłużenie)⁵ domeny (CTE; ang., *C-terminal extension*), w skład którego wchodzi wiele reszt zasadowych. Region CTE, jak pokazano, odpowiedzialny jest m.in. za dimeryzację i oddziaływanie receptorów sierocych oraz tworzących heterodimery z sekwencjami DNA (Khorasanizadeh i Rastinejad, 2001) (3.3.2.).

Region D zwany jest również regionem „giętkim”, „zawiasowym” (ang., *hinge region*). Wykazuje on dużą zmienność sekwencji aminokwasowej i długości łańcucha polipeptydowego. Jego N-końiec stanowi region CTE, który ze względu na pełnione funkcje formalnie przypisywany jest często do domeny DBD (region C). Funkcja regionu D receptora jest zmienna i obejmuje m.in. reszty zaangażowane w oddziaływania z białkami szoku termicznego (Hsp; ang., *heat shock protein*), będącymi składnikami wielopodjednostkowych kompleksów czaperonów (Evans, 1988; Tsai i O’Malley, 1994; Zhang i wsp., 1994), lokalizację jądrową (3.2.3.), czy też regulację transkrypcji (Picard i Yamamoto, 1987; Hollenberg i Evans, 1988; Laudet i Gronemeyer, 2002). Wydaje się, że region D pełni rolę tzw. „łącznika”, umożliwiając domenie wiążącej DNA i domenie wiążącej ligand przyjmowanie różnych konformacji bez stwarzania dodatkowych sterycznych przeszkód (Laudet i Gronemeyer, 2002).

Region E jest niezmiernie ważnym i jednocześnie najbardziej złożonym funkcjonalnie fragmentem receptora. Tworzy on wysoce ustrukturyzowaną domenę wiążącą ligand (LBD; ang., *ligand-binding domain*). Region E odpowiedzialny jest m.in. za zależną od liganda aktywację (AF-2 lub TAF-2), zależną od liganda lokalizację jądrową, oddziaływania z białkami Hsp, tworzenie głównej płaszczyzny dimeryzacyjnej, oraz często funkcje represorowe (Tsai i O’Malley, 1994; Gronemeyer i Laudet, 1995; Chambon, 1996; Moras i Gronemeyer, 1998). Uzyskane liczne struktury krystaliczne wolnego regionu E lub w obecności agonistów, antagonistów lub peptydów koregulatorowych, umożliwiły szczegółowy wgląd w powiązania strukturalno-funkcjonalne w odpowiedzi receptora na związanie cząsteczki sygnałowej (Renaud i Moras, 2000). Pierwsze struktury trzeciorzędowe LBD uzyskano dla wolnego RXR α , RAR γ w kompleksie z kwasem całkowicie-*trans*-retinowym i związanym z agonistą TR β (Bourguet i wsp., 1995; Renaud i wsp., 1995; Wagner i wsp., 1995). Niezwiązane z ligandem receptory określa się często w literaturze jako formę apo-, natomiast kompleks receptor-ligand jako formę holo- (Laudet i Gronemeyer,

⁵ W dalszej części pracy region CTE określany jest jako C-końcowe wydłużenie DBD.

2002). Otrzymane struktury pokazują, że apo- i holo- LBD wykazują zbliżone zwinienie (ang., *fold*). Co więcej, analizy porównawcze struktur pierwszorzędowych wszystkich znanych LBD oparte na otrzymanych pierwszych strukturach krystalicznych, jak i późniejsze uzyskane struktury innych LBD receptorów jądrowych wydają się to potwierdzać (Wurtz i wsp. 1996; Renaud i Moras, 2000). Ogólna architektura LBD receptorów składa się z tzw. trójwarstwowej α -helikalnej „kanapki” (ang., *three-layered α -helical sandwich*). Do innych elementów należą: struktura „ β -szpilki do włosów” (ang., *β -hairpin*) oraz pętle łączące o zmiennej długości. W skład LBD wchodzi 12 α -helis (od H1 do H12, odpowiednio) tworzących hydrofobową kieszeń wiążącą ligand (Wurtz i wsp. 1996; Brzozowski i wsp., 1997; Renaud i Moras, 2000; Laudet i Gronemeyer, 2002). Jak pokazały struktury form apo- i holo- oraz badania biochemiczne, związanie liganda indukuje zmianę konformacyjną, głównie w obrębie C-końcowej H12. Helisa ta przesuwana się w kierunku rdzenia LBD, co powoduje zamknięcie hydrofobowej kieszeni ze związanym ligandem i tym samym wpływa na stabilizację uformowanego kompleksu, tworząc dodatkowe oddziaływania z „uwięzioną” cząsteczką sygnałową. Jest to w dużym uproszczeniu mechanizm tzw. „pułapki na mysz” (ang., *mouse trap mechanism*) (Egea i wsp., 2000). Ponadto w skład H12 wchodzi reszty odpowiedzialne za aktywację transkrypcji (funkcja AF-2) oraz wiązanie koaktywatorów (Chambon, 1996; Moras i Gronemeyer, 1998; Laudet i Gronemeyer, 2002). Badania strukturalne pokazały, że po zmianie konformacyjnej zamykającej kieszeń, H12 tworzy wraz z innymi eksponowanymi z otoczenia resztami hydrofobową szczelinę, która wiąże krótki α -helikalny tzw. „motyw LXXLL” (gdzie L oznacza leucynę a X inny dowolny aminokwas) obecny w sekwencji koaktywatorów, np. w TIF2 (ang., *transcription intermediary factor*) czy GRIP1 (ang., *GR-interacting protein*) (Le Douarin i wsp., 1996; Heery i wsp., 1997; Torchia i wsp., 1997; Ding i wsp., 1998; Shiau i wsp., 1998; Savkur i Burris, 2004). Niektóre receptory mogą funkcjonować również jako związane z DNA represory transkrypcji. Ten fenomen pojawia się w nieobecności agonistów, może być „wzmocniony” pewnymi antagonistami i jest związany z wiązaniem korepresorów. Wiązanie korepresorów ma miejsce na powierzchni apo-LBD i jest podobne do wiązania koaktywatorów, lecz pośredniczy w nim motyw tzw. „kasety CoRNR” (ang., *CoRNR-box*) występujący w sekwencjach korepresorów, które wiążą się do płaszczyzny topologicznie odpowiadającej oddziaływaniom z koaktywatorami (Hu i Lazar, 1999; Nagy i wsp., 1999; Perissi, 1999). Po związaniu liganda zmiany konformacyjne powodują odłączenie kompleksu korepresorów, umożliwiając

werbowanie koaktywatorów i w konsekwencji aktywację transkrypcji (3.2.4.) (Egea i wsp., 2000).

Region F umiejscowiony jest przy C-końcu łańcucha polipeptydowego i jego rola nie jest do końca poznana. Nie występuje on we wszystkich receptorach jądrowych. Sugeruje się jednak, że obszar ten może mieć znaczenie w werbowaniu i determinacji specyficzności wiązania koaktywatorów do domeny LBD (Peters i Khan, 1999; Sladek, 1999) oraz za odróżnianie agonistycznych i antagonistycznych ligandów (Nichols i wsp., 1998; Peters i Khan, 1999). Sekwencja regionu F bierze udział w wiązaniu hormonu w przypadku receptorów AR, GR i PR, natomiast delecja tego obszaru w receptorze ER, jak się wydaje, nie wpływa na jego aktywność wiążącą (Kumar, 1987). Co jest interesujące, region ten jest również celem modyfikacji potranslacyjnych, co dodatkowo podkreśla kompleksowość i złożoność odpowiedzi receptora jądrowego na sygnał (Laudet i Gronemeyer, 2002).

Do rodziny receptorów jądrowych zalicza się ponadto receptory o nietypowej budowie, odmiennej od wcześniej zaprezentowanej. Zostały one przyporządkowane, o czym już wspomniano wcześniej (3.2.1.), do podrodziny 0. Receptory te posiadają tylko jedną z dwóch zachowanych ewolucyjnie domen - domenę wiążącą DNA lub domenę wiążącą ligand (Renaud i Moras, 2000). Przykładowo, ludzkie białko DAX1 (ang., *dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene-1*) zawiera klasyczną LBD, natomiast pozbawione jest ono typowej DBD. Receptor ten jest receptorem sierocym, ponieważ nie jest dotąd znany jego ligand. Jego DBD zbudowana jest z powtórzonego trzykrotnie motywu o długości około 68 reszt aminokwasowych, posiadającego zachowane reszty cysteinyłowe, jednakże nie tworzące klasycznych motywów cynkowych (Zanaria i wsp., 1994). DAX-1 wiąże się z DNA rozpoznając struktury „szpilek do włosów” (ang., *hairpin*) bez silnej specyficzności sekwencji (Zazopoulos i wsp., 1997), działając jako silny represor transkrypcyjny w szlakach przekazywania sygnałów z udziałem hormonów steroidowych. Ponadto, receptor ten może wiązać się do zaktywowanych receptorów, np. do LBD/AF-2 poprzez motyw „LXXLL” lub funkcjonować sam jako korepresor lub też brać udział w oddziaływaniach z innymi korepresorami (Willson i Moore, 2002; Holter i wsp., 2002; Lalli i Sassone-Corsi, 2003; Song i wsp., 2004).

Pomimo, że receptory jądrowe wykazują modułarną budowę, składającą się z autonomicznych domen, badania pokazały, że danemu regionowi można przypisać wiele funkcji (Wong i wsp., 1993; Xu i wsp., 1996) i niejednokrotnie pełniona funkcja nie jest ograniczona wyłącznie do danego fragmentu białka (Laudet i Gronemeyer, 2002), dlatego zaprezentowany schemat organizacji receptorów jądrowych należy traktować umownie

wyłącznie jako ogólny wgląd w architekturę receptora, a nie jako jego szczegółową mapę funkcjonalną.

Jak dotąd nie udało się uzyskać struktury trzeciorzędowej całych receptorów, z uwagi na duże trudności z ich ekspresją i oczyszczaniem. Dlatego też badania konformacyjne obejmują wyłącznie izolowane domeny receptorów.

3.2.3. Lokalizacja jądrowa receptorów jądrowych

Jak już wspomniano wcześniej, receptory jądrowe zlokalizowane są przede wszystkim w jądrze komórkowym, jednakże w przypadku receptorów GR i MR stwierdzono lokalizację w nieobecności odpowiednich ligandów głównie w cytoplazmie. Dopiero po związaniu cząsteczek sygnałowych następowała ich translokacja do jądra (Wikström i wsp., 1987; Robertson i wsp., 1993; Baumann i wsp., 1999). Ponadto pokazano, że VDR obecny jest w przeważającej formie w jądrze, jednakże w nieobecności liganda jego frakcja cytoplazmatyczna jest znacząca. Udział jądrowego VDR wzrasta w obecności hormonu (Hausser i wsp., 1997). Wewnątrzkomórkowa lokalizacja receptorów jest zatem rezultatem równowagi dynamicznej. Receptory jądrowe w sposób ciągły przemieszczają się z jądra do cytoplazmy oraz są aktywnie transportowane z powrotem do jądra, co określane jest jako tzw. ang., „*shuttling*” (Guiochon-Mantel i wsp., 1996; Melchior i Gerace, 1995; Defranco i wsp., 1995; Laudet i Gronemeyer, 2002). W selektywnym transferze makrocząsteczek pomiędzy jądrem a cytoplazmą pośredniczą rozpuszczalne białka pełniące funkcje receptorowe, które oddziałują ze składnikami kompleksu por jądrowych, w celu translokacji swoich specyficznych ładunków (ang., *cargo*) (Fried i Kutay, 2003). O jądrowej lokalizacji receptorów decydują sekwencje będące sygnałami lokalizacji jądrowej (NLS; ang., *nuclear localization signal*), które, jak się uważa, są rozpoznawane przez białka transportujące. Białka zawierające NLS oddziałują z α -importynami, które następnie wiążą się do β -importyn; obie importyny są białkami transportowymi przenoszącymi ładunki (białka z NLS) przez kompleksy por jądrowych i uwalniającymi je w jądrze (Görlich i wsp., 1995; Pollard i wsp., 1996). NLS stanowią krótkie sekwencje o dużej zawartości zasadowych reszt arginyłowych i lizyłowych (Gronemeyer i Laudet, 1995; Melchior i Gerace, 1995; Went, 2000). Co jest interesujące, NLS nie wykazują wysokiego stopnia zachowania sekwencji aminokwasowych w toku ewolucji. Przykładowo antygen T wirusa SV40 posiada klasyczną pojedynczą sekwencję NLS, PKKKRKV, podczas gdy nukleoplazmina zawiera dwuczęściowy NLS, KRPAATKAGQAKKKK, rozdzielony dziesięcioma resztami aminokwasowymi (Kalderon

i wsp., 1984; Colledge i wsp., 1986; Robbins i wsp., 1991). Pośród zidentyfikowanych sekwencji sygnałowych w receptorach jądrowych, NLS PR jest podobny do obecnego w antygenie T wirusa SV40 (Guiochon-Mantel i wsp., 1989; Guiochon-Mantel i wsp., 1996). Sekwencje NLS receptorów jądrowych niezależne od wiązania liganda znajdują się m.in. w regionie obejmującym CTE DBD i fragment D. Natomiast NLS zależny od cząsteczki sygnałowej występuje w LBD (Rys. 3.2.) (Guiochon-Mantel i wsp., 1989; Gronemeyer i Laudet, 1995; Guiochon-Mantel i wsp., 1996; Michigami i wsp., 1999). W przypadku VDR stwierdzono również obecność NLS w sekwencji między dwoma motywami cynkowymi w obrębie DBD (Hsieh i wsp., 1998). Sygnał lokalizacji jądrowej jest więc złożony i obejmuje kilka fragmentów zawierających ciąg zasadowych reszt aminokwasowych. Dopiero w wyniku ich kooperatywnego działania może zachodzić wydajny transport receptora do jądra (Guiochon-Mantel i wsp., 1996; Michigami i wsp., 1999).

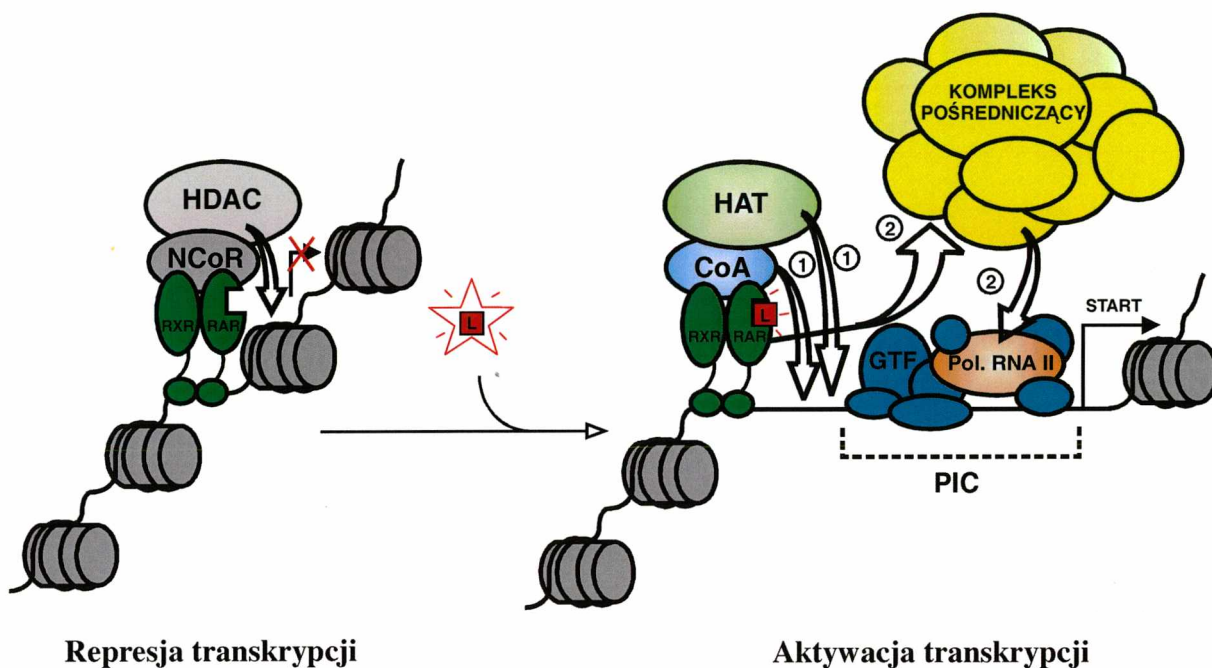
3.2.4. Rearanżacja chromatyny i inicjacja transkrypcji z udziałem receptorów jądrowych

Proces inicjacji transkrypcji, w której dochodzi m.in. do rearanżacji i modyfikacji chromatyny, jest niezbędnym warunkiem działania receptorów jądrowych, w konsekwencji prowadzącym do ekspresji informacji genetycznej. Jest on procesem złożonym i skomplikowanym. Postęp jaki dokonał się w ostatnich latach w tej dziedzinie badania receptorów pozwolił na identyfikację wielu czynników biorących udział w tym procesie i zaproponowanie wielu modeli oraz mechanizmów modulacji aktywacji transkrypcji (Lee i Lee Kraus, 2001; Stallcup, 2001; Dilworth i Chambon, 2001; Hebbar i Archer, 2003). Zaprezentowany poniżej uproszczony mechanizm inicjacji transkrypcji opisany został w publikacji przeglądowej Renaud i Moras (2000) i zamieszczono go we Wstępie niniejszej pracy w celu ogólnego przedstawienia poglądu na rolę receptorów jądrowych w koordynacji zależnej od hormonu modulacji ekspresji genów.

Powszechnie uważa się, że receptory jądrowe aktywują transkrypcję w obecności liganda. Z drugiej jednak strony, niektóre receptory tworzące heterodimery z RXR takie jak, RAR, czy TR w nieobecności cząsteczki sygnałowej działają jako tzw. „wygaszacze” (ang., *silencers*), hamując podstawową transkrypcję (Burcin i wsp., 1994; Bendik i Pfahl, 1995; Hörlein i wsp., 1995; Nagy i wsp., 1997; Renaud i Moras 2000). Dawniej uważano, że w celu uzyskania aktywacji transkrypcji docelowych genów, receptory jądrowe bezpośrednio oddziałują z głównymi czynnikami transkrypcji (GTF; ang., *general transcription factors*)

(takimi jak: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF i TFIIH), aby utworzyć razem z polimerazą RNA II tzw. kompleks „preinicjacyjny” (PIC; ang., *preinitiation complex*) (Roeder, 1996). Jednakże badania prowadzone w ciągu ostatnich lat doprowadziły do odkrycia dodatkowych czynników towarzyszących receptorom jądrowym i wpływających na transkrypcję, o których to już wcześniej wspomniano, mianowicie koaktywatorów i korepresorów (Torchia i wsp., 1997; Renaud i Moras, 2000; Wärnmark i wsp., 2003). Niektóre apo-receptory (oraz niektóre receptory steroidowe związane z antagonistami) mogą oddziaływać z korepresorami takimi jak np. NCoR (ang., *nuclear receptor corepressor*) lub SMRT (ang., *silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors*) stanowiącymi część większych kompleksów posiadających aktywność deacylazy histonowej (HDAC; ang., *histone deacetylase*), w ten sposób wnosząc wkład w utrzymanie konformacji chromatyny uniemożliwiającej wiązanie czynników transkrypcyjnych, a tym samym hamując transkrypcję (Wade i wsp., 1997). Krytycznym krokiem jest związanie liganda, co prowadzi do odłączenia korepresorów i przyłączenia z kolei koaktywatorów. Jednymi z pierwszych zidentyfikowanych koaktywatorów były białka o masie około 160 kDa (stąd tą klasę białek nazwano rodziną p160), włączając SRC-1 (ang., *steroid receptor coactivator*) i TIF2/GRIP1 (Renaud i Moras, 2000). Koaktywatory rodziny p160 posiadają wewnętrzną aktywność acetylo-transferazy histonowej (HAT, ang., *histone acetyl-transferase activity*), ale co jest bardziej istotne, werbują one tzw. „integratory sygnału”, takie jak CBP/p300, które również wykazują aktywność HAT. Czynniki te oddziałują bezpośrednio z niektórymi receptorami jądrowymi; to oddziaływanie dodatkowo wzmocnione jest poprzez obecność koaktywatorów p160. Tak więc, związane z DNA i z odpowiednim ligandem receptory jądrowe werbują kompleks czynników wykazujących aktywność HAT, co w obecności zależnych od ATP czynników rearanżujących chromatynę prowadzi do miejscowego jej rozwinięcia na poziomie sekwencji promotora. W ten sposób może dojść do utworzenia kompleksu PIC, obejmującego czynniki GTF i polimerazę RNA II (Renaud i Moras, 2000).

Jednakże, jak zaobserwowano, wyindukowana ligandem zmiana konformacji chromatyny nie jest wystarczająca, aby osiągnąć wydajną aktywację transkrypcji (Wong i wsp., 1997). Badania biochemiczne doprowadziły do odkrycia dużych, wielopodjednostkowych kompleksów znanych jako tzw. „kompleksy pośredniczące” (ang., *mediator complexes*): TRAP (ang., *thyroid hormone receptor-associated protein complex*) lub DRIP, które prawdopodobnie wymagane są do stabilizacji kompleksu PIC poprzez rekrutację C-końcowej domeny dużej podjednostki polimerazy RNA II (Fondell i wsp., 1996; Ito i wsp., 1999; Rachez i wsp., 1999). Sugeruje się więc, że aktywacja transkrypcji może być procesem



Rys.3.3. Schemat zależnej od liganda aktywacji transkrypcji z udziałem receptorów jądrowych.

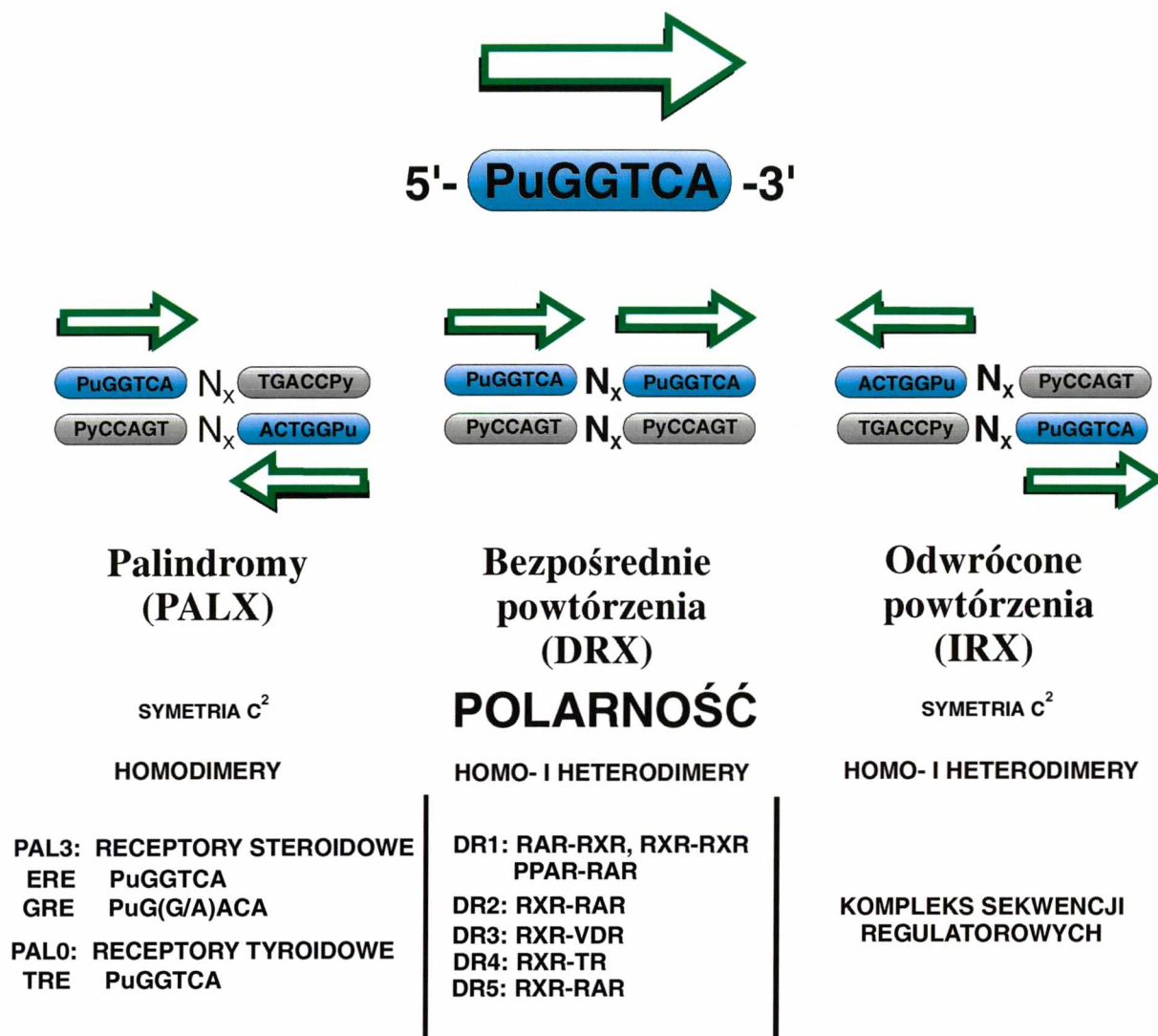
W nieobecności liganda, związany ze specyficznym elementem regulatorowym heterodimer RAR/RXR wiąże kompleks zawierający korepresor(y) (CoR). Następnie korepresor(y) wiąże inne białka o aktywności deacetylazy histonowej (HDAC), powodując zahamowanie transkrypcji genu. Deacetylacja histonów bierze udział w utrzymywaniu zwartej struktury chromatyny podczas stanu represji. Związanie liganda (L) powoduje odłączenie kompleksu korepresorów, umożliwiając przyłączenie koaktywatorów (CoA) zawierających białko p160 i jedną lub wiele acetylo-transferaz histonów (HAT). Koaktywatory p160 wykazują słabą aktywność HAT. Acetylacja histonów prowadzi do lokalnego rozwinęcia chromatyny (krok 1). Następnie kompleks koaktywatorów rozpada się i związany z ligandem heterodimer werbuje kompleks pośredniczący (krok 2), który bierze udział w formowaniu i stabilizacji kompleksu preinicjalnego (PIC), złożonego z podstawowych czynników transkrypcyjnych (GTF) i polimerazy RNA II (Pol. RNA II), prowadząc do aktywacji transkrypcji. Na podstawie Renaud i Moras (2000).

dwuetapowym (Rys.3.3.): 1) - związanie liganda prowadzi do miejscowego rozwinęcia chromatyny poprzez acetylację histonów w wyniku aktywności kompleksu HAT; 2) - „kompleks pośredniczący” pomaga następnie w stabilizacji kompleksu PIC, wzmacniając tym samym inicjację transkrypcji (Renaud i Moras, 2000). Wskazówką jak pierwszy kompleks ulega rozpadowi, pozwalając na związanie się drugiemu, były rezultaty pokazujące wyindukowaną hormonem acetylację koaktywatora ACTR (ang., *histone acetyltransferase nuclear coactivator*) przez p300/CBP, prowadzącą do rozpadu kompleksu koaktywatorowego receptor-p160 (Chen i wsp., 1999). Istnieje pogląd, że w ten sposób receptory jądrowe, działając jako „przełączniki molekularne”, nieobecność *versus* obecność liganda „przełączają” w zahamowanie *versus* wzmocnienie transkrypcji genów (Renaud i Moras, 2000).

3.3. ODDZIAŁYWANIE RECEPTORÓW JĄDROWYCH Z DNA

3.3.1. Sekwencje regulatorowe DNA wiążące receptory jądrowe

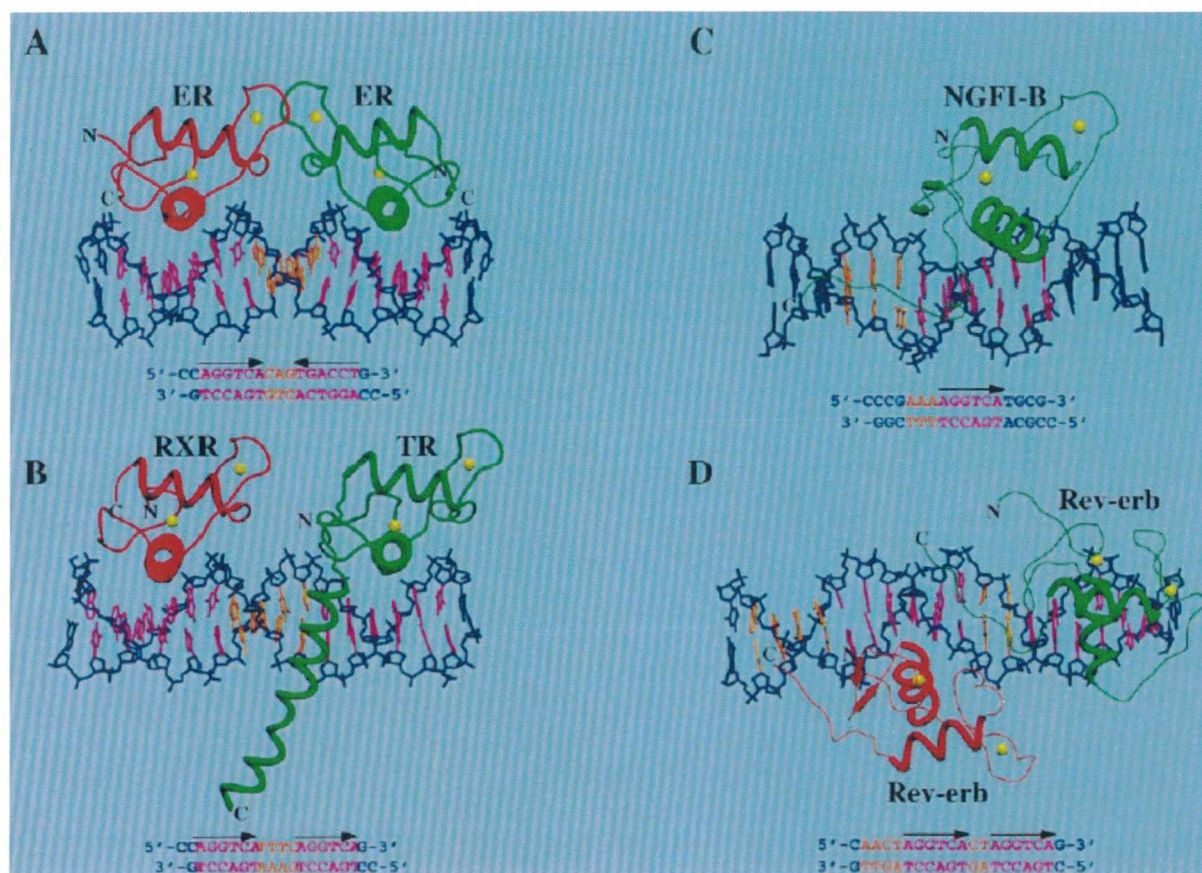
Receptory jądrowe, o czym już uprzednio wspomniano, modułują transkrypcję docelowych genów, wiążąc się ze specyficznymi sekwencjami DNA zwanymi „elementami regulatorowymi” lub „sekwencjami warunkującymi odpowiedź na hormon” (HRE; ang., *hormone response element*) (Mangelsdorf i wsp., 1995; Evans, 1988). Sekwencje HRE sklasyfikowano ponadto jako sekwencje wzmacniające transkrypcję (ang., *enhancer sequences*), niezależnie od ich orientacji w stosunku do będącego pod ich kontrolą genu (Gronemeyer i Laudet, 1995). W skład każdego elementu regulatorowego wchodzi co najmniej jedno tzw. „półmiejsce” (ang., *half-site*), tzw. „motywu rdzeniowego” (ang., *core recognition motif*) o budowie 5'-PuGGTCA-3' (gdzie „Pu” oznacza zasadę purynową). Sekwencja ta zwana jest również w literaturze sekwencją konsensusową lub zgodną (ang., *consensus sequence*) (Rys.3.4.). Zmiany, jakie zaszły w tym motywie w toku ewolucji przyczyniły się do powstania różnych klas HRE, które są specyficznie wiązane przez receptory jądrowe (Laudet i Gronemeyer, 2002). Mutacje w sekwencji miejsca połówkowego, wydłużenia, duplikacje, długość tzw. „odstępika” (ang., *spacer*) między danymi półmiejscami HRE oraz wzajemna ich orientacja, przyczyniły się do powstania rozmaitych HRE, selektywnych dla danej klasy receptorów (Laudet i Gronemeyer, 2002). Zmiany ewolucyjne pozwoliły naturze stworzyć takie HRE, które zapewniają optymalne oddziaływanie pomiędzy receptorem a DNA, umożliwiając tym samym formowanie aktywnych fizjologicznie kompleksów receptorów wyłącznie na danym specyficznym elemencie. W zależności od orientacji obu półmiejsc, elementy regulatorowe mogą być zorganizowane w postaci palindromów (PAL), bezpośrednich (lub inaczej prostych) powtórzeń (DR, ang., *direct repeat*) lub palindromami o odwróconej orientacji (IR, ang., *inverted repeat*) (Rys.3.4.) (Glass, 1994; Laudet i Gronemeyer, 2002). W tym miejscu należy podkreślić, że jednak większość naturalnie występujących elementów stanowią tzw. „niedoskonałe”, nazywane również „zdegenerowanymi” (ang., *degenerate*), pod względem sekwencji i organizacji HRE, często bowiem jedno półmiejsce różni się jedną lub wieloma zasadami, co dodatkowo podkreśla ich złożoność i selektywność (Khorasanizadeh i Rastinejad, 2001; Laudet i Gronemeyer, 2002).



Rys.3.4. Elementy regulatorowe receptorów jądrowych.

Schemat przedstawia sekwencje konsensusowe elementów regulatorowych rozpoznawanych przez domeny wiążące DNA różnych receptorów jądrowych. Duplikacja motywu rdzeniowego 5'-PuGGTCA-3' (gdzie „Pu” oznacza A lub G) doprowadziła do powstania symetrycznych palindromów (PALX), bezpośrednich powtórzeń (DRX) lub odwróconych powtórzeń (IRX) (zwanych także odwróconymi palindromami) z odstępnikami pomiędzy półmiejscami o różnej długości par zasad, co symbolizuje N_x. N - oznacza dowolny nukleotyd, natomiast X - ilość nukleotydów odstępника. Strzałki symbolizują orientację zgodnego motywu rdzeniowego 5'-PuGGTCA-3'. PAL3 jest elementem regulatorowym receptora estrogenowego (ERE), natomiast PAL0 receptora hormonów tarczycy (tyroidowego) (TRE). Pojedyncza mutacja w pozycji 4 sekwencji rdzeniowej (T na A) powoduje, że PAL3 jest rozpoznawany przez GR (ale także przez receptory AR, PR i MR). Należy pamiętać, że większość naturalnych HRE odbiega od ideału, często jedno półmiejsce różni się jedną lub wieloma zasadami od drugiego, stanowiąc niedoskonały lub zdegenerowany HRE danego typu. Elementy typu DR, w przeciwieństwie do PAL, charakteryzuje tzw. „polarność” wiązania, co przejawia się niesymetrycznym formowaniem kompleksów na DNA. Na podstawie Laudet i Gronemeyer (2002).

Receptory jądrowe wiążą się do HRE jako homodimery, heterodimery i monomery, co jest również związane z architekturą i zmiennością HRE oraz różnicami występującymi w sekwencjach DBD i innych regionach receptora tworzących płaszczyzny dimeryzacyjne (Gronemeyer i Laudet, 1995). Na Rys.3.5. pokazano przykładowe struktury kompleksów DBD na odpowiednich HRE. Dimeryzacja receptorów jądrowych jest mechanizmem, który zwiększa powinowactwo i specyficzność wiązania do określonego elementu regulatorowego. Badania biochemiczne pokazały, że receptory posiadają dwie płaszczyzny dimeryzacyjne: jedną, słabą, znajdującą się w obrębie DBD (3.3.2.) oraz drugą należącą do LBD. Domeny wiążące ligand dimeryzują w roztworze, natomiast domeny wiążące DBD oddziałują ze sobą wyłącznie w obecności DNA. Uzyskane struktury krystaliczne DBD homodimerów oraz heterodimerów utworzonych na DNA pozwoliły zidentyfikować powierzchnie zaangażowane w dimeryzację (Renaud i Moras, 2000; Khorasanizadeh i Rastinejad, 2001; Laudet i Gronemeyer, 2002). Istotne jest to, że DBD receptorów jądrowych mogą generować takie same wzorce selektywności odpowiednich elementów regulatorowych i dimeryzacji, jak pełnej długości receptory. Co więcej, uważa się, że płaszczyzna odpowiedzialna za dimeryzację, zlokalizowana w LBD, nie odgrywa roli w selekcji HRE lecz jedynie wpływa dodatkowo na stabilizację utworzonego dimeru (Laudet i Gronemeyer, 2002). Ze względu na sposób wiązania się receptorów jądrowych z DNA oraz rodzaj dimeryzacji, receptory jądrowe często dzieli się na cztery klasy: homodimery receptorów hormonów steroidowych (GR, ER, AR, MR, PR), heterodimery różnych receptorów jądrowych utworzone z RXR (RAR, TR, VDR, NGFI-B (ang., *nerve growth factor-induced protein B*), LXR (ang., *liver X receptor*), PPAR (ang., *peroxisome proliferator-activated receptor*), EcR), dimery receptorów sierocych (COUP-TF (ang., *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*), HNF-4 (ang., *hepatocyte nuclear factor-4*), RevErb (sierocy receptor jądrowy kręgowców) oraz monomery receptorów jądrowych (NGFI-B, FTZ-FI) (Mangelsdorf i Evans, 1995; Khorasanizadeh i Rastinejad, 2001). Receptory hormonów steroidowych kręgowców wiążą się głównie jako homodimery do elementów palindromowych o odstępniku długości trzech par zasad (Rys.3.4.) (Glass, 1994; Tsai i O'Malley, 1994; Mangelsdorf i wsp., 1995). W utworzonym kompleksie, poszczególne DBD związane z półmiejscami HRE, oddziałują ze sobą w obrębie podobnych regionów domeny, co w konsekwencji prowadzi do powstania struktury o podwójnej symetrii osiowej (C^2) (Rys.3.5.A) (Luisi i wsp., 1991 Schwabe i wsp., 1993; Laudet i Gronemeyer, 2002).



Rys.3.5. Wybrane struktury krystaliczne kompleksów DBD-DNA.

Monomery DBD oznaczono kolorem czerwonym i zielonym; jony cynku - żółtymi kulami; DNA - kolorem niebieskim, za wyjątkiem par zasad półmiejsc HRE, które zaznaczono na różowo. Sekwencje flankujące półmiejsca od strony 5'-końca oznaczono kolorem pomarańczowym. (A) - homodimer ERDBD związany do ERE (Schwabe i wsp., 1993; kod dostępu w bazie PDB (ang., *protein data bank*): 1HCQ); (B) - heterodimer RXR-TR związany do DR4 (Rastinejad i wsp., 1995; 2NLL); (C) - monomer NGFI-BDBD związany do wydłużonego motywu rdzeniowego (Meinke i Sigler, 1999; 1CIT); (D) - homodimer RevErbDBD związany do DR2 (Zhao i wsp., 1998; 1A6Y). Według Renaud i Moras (2000).

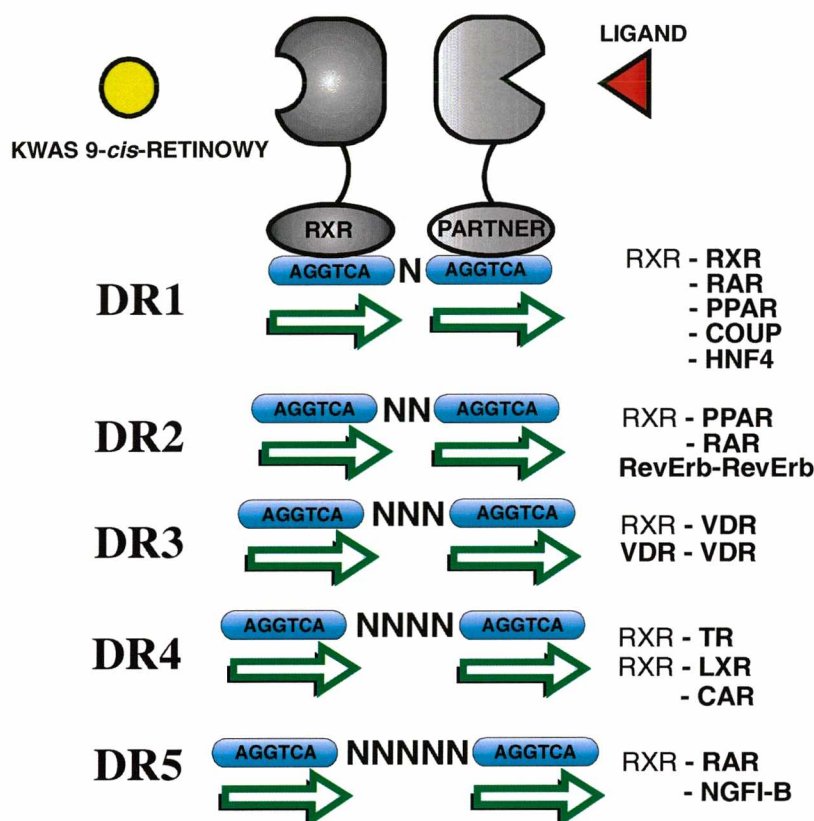
Receptory steroidowe, jak zauważono, mogą wiązać się również do innych sekwencji DNA. W przypadku receptora ER α zaobserwowano, że może on oddziaływać z elementem zbudowanym z jednego półmiejsc o sekwencji 5'-GGTCA-3', poprzedzonej 5'-TCA-3', tworząc monomer, który jest w stanie aktywować transkrypcję (Vanacker i wsp., 1999). Ponadto, receptory hormonów steroidowych mogą formować kompleksy heterodimeryczne. Przykładowo, receptory GR i MR wiążą się do glukokortykoidowego elementu regulatorowego (GRE⁶, odpowiednio) ze zbliżonym powinowactwem i oprócz tworzenia aktywnych homodimerów, białka te mogą regulować transkrypcję genów będących pod

⁶ W niniejszej pracy elementy regulatorowe receptorów jądrowych oznaczane będą jako XE, gdzie w miejscu X będzie znajdował się skrót danego receptora. Przykładowo, element regulatorowy GR to GRE.

kontrolą GRE, tworząc heterodimeryczne kompleksy na tym elemencie, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (Liu i wsp., 1995; Trapp i Holsboer, 1996). GR może również tworzyć heterodimery z receptorem AR na odpowiednich HRE (Chen i wsp., 1997).

Receptory jądrowe tworzące heterodimery z RXR tworzą kompleksy przede wszystkim na DR zgodnego półmiejsc 5'-AGGTCA-3' (Rys.3.4. i Rys.3.6.). Co jest istotne, zarówno RXRDBD, jak i DBD partnerów nie oddziałują ze sobą w nieobecności elementu regulatorowego. Jednakże w obecności specyficznej sekwencji regulatorowej, wykazują one identyczne wzorce selektywności DNA i dimeryzacji, jak pełnej długości receptory. W formowanych kompleksach odstępniaki między półmiejscami DR mają różną, specyficzną dla danego heterodimeru długość, od 1 pary zasad do 5 par zasad (DR1-DR5, odpowiednio). Selektywność z jaką te heterokompleksy wiążą DR określa tzw. „reguła 1-5” (ang., *1-5 rule*) (Rys.3.6.) (Glass, 1994; Umesono i wsp., 1991; Perlmann i wsp., 1993; Kwiatkowska-Korczak i Kwiatkowska, 2000; Rastinejad, 2001). W konsekwencji szlak sygnalizacyjny z udziałem hormonu tarczycy może być „przełączony” na inny, np. witaminy D₃ lub kwasu retinowego poprzez, odpowiednio, odjęcie lub dodanie pojedynczej pary zasad z/lub do odstępniaka elementu DR4 (Rys.3.6.) (Rastinejad, 2001). RXR może tworzyć heterodimery na określonych DR z udziałem m.in. TR, VDR, RAR i niektórych receptorów sierocych, np. PPAR i NGFI-B (Harbers i wsp., 1996; Schröder i wsp., 1994a/b; Kurokawa i wsp., 1994; Ijpenberg i wsp., 1997; Rastinejad, 2001). Sekwencja elementu regulatorowego zorganizowana w postaci DR jest asymetryczna, w przeciwieństwie do HRE receptorów steroidowych. Powoduje to, że receptory heterodimeryzujące z RXR nie są ułożone symetrycznie na DNA, lecz zachowana jest określona kolejność ułożenia DBD na DR, co określane jest jako „polarność” lub „anizotropia” wiązania (Kurokawa i wsp., 1993; Gronemeyer i Laudet, 1995). Takie ułożenie sprawia, że w tworzeniu powierzchni dimeryzacyjnych biorą udział różne regiony obu DBD (Rastinejad, 2001). W konsekwencji, na elementach DR3, DR4 i DR5 RXR zajmuje 5'-końcowe półmiejsce, natomiast jego partner półmiejsce 3'-końcowe (TR, VDR, RAR) (Rys.3.5.B) (Perlmann i wsp., 1993; Kurokawa i wsp., 1993; Rastinejad, 2001). Homodimer RXR oraz heterodimer RXR z RAR wiążą DR1, z tym, że ten ostatni posiada odwróconą „polarność”: RAR wiąże się do 5'-końcowego półmiejsc, natomiast RXR do półmiejsc 3'-końcowego (Zhao i wsp., 2000; Rastinejad i wsp., 2000). Co jest interesujące, obecność RXR nie jest konieczna dla heterodimeryzacji, gdyż jak zaobserwowano VDR i TR oraz VDR i RAR mogą również tworzyć kompleksy heterodimeryczne na DNA, różniące się „polarnością” w zależności od typu elementu (Schröder i wsp., 1993; Schröder i wsp., 1994a/b). Sekwencje DR wiązane są ponadto przez

homodimery takich receptorów sierocych, jak np. RevErb, COUP-TF, czy HNF-4 (Mangelsdorf i Evans, 1995; Mangelsdorf i wsp., 1995). Wartą uwagi jest obserwacja, że steroidowy receptor AR wykazuje charakterystykę receptorów heterodimeryzujących z RXR, co przejawia się zdolnością jego DBD do wiązania sekwencji DR (Claessens i wsp., 1996) (3.3.3.2.).



Rys.3.6. Receptory heterodimeryzujące z RXR wiążą się z sekwencjami DR o określonej długości odstępnika pomiędzy półmiejscami - „reguła 1-5”.

Receptory jądrowe, które funkcjonują jako heterodimery z RXR rozpoznają specyficznie sekwencje DNA zorganizowane w postaci bezpośrednich powtórzeń (DR) zgodnego motywu 5'-AGGTCA-3'. Heterodimer wiąże się do danego DR z odstępnikiem o ściśle określonej długości, co związane jest z utworzeniem unikalnej płaszczyzny dimeryzacyjnej pomiędzy partnerami na specyficznym DR. Ten selektywny sposób wiązania nazwano „regułą 1-5” (Umesono i wsp., 1991; Kliewer i wsp., 1992). Na podstawie Rastinejad (2000); Tata (2002) i Laudet i Gronemeyer (2002).

Receptory jądrowe tworzące powyższe heterokompleksy, regulują transkrypcję genów po związaniu się ze swoim partnerem - RXR (Zhang i wsp., 1992; Kliewer i wsp., 1992; Kastner i wsp., 1997; Jiang i Sladek, 1997). Białko RXR też wykazuje cechy tzw. „cichego partnera” (ang., *silent partner*), nie wiążąc liganda w kompleksach z takimi receptorami, jak

RAR i TR (Kurokawa i wsp., 1994; Forman i wsp., 1995; Garcia-Vallve i Palau, 1998). Pokazano także, że w innych kompleksach, np. w 5'-PPAR-RXR-3' na DR1, obaj partnerzy są w stanie wiązać swoje ligandy niezależnie, co znajduje odzwierciedlenie w synergicznej aktywacji transkrypcji (Kliwer i wsp., 1992; Mangelsdorf i Evans, 1995). Oznacza to, że ligandy mogą odgrywać znaczącą rolę w dimeryzacji i w wiązaniu do DNA. Innym przykładem jest hormon tarczycy, który hamuje wiązanie homodimerów, ale nie wpływa na formowanie heterodimerów na DNA, promując tym samym tworzenie heterokompleksów na odpowiednich HRE (Riberio i wsp., 1992). Przeciwnieństwem jest kwas 9-*cis*-retinowy, który z kolei powoduje wzrost powinowactwa homodimerów RXR do DR1 (Zhang i wsp., 1992). Zaobserwowano, że w przeciwieństwie do innych apo-receptorów, apo-RXR jest w stanie oligomeryzować, tworząc homotetramery, które następnie ulegają rozpadowi pod wpływem wiązania DNA i ligandu (Kersten i wsp., 1995; Chen i wsp., 1998; Kersten i wsp., 1998). Sugeruje się, że ta oligomeryzacja nie tylko służy gromadzeniu wewnątrzkomórkowej puli nieaktywnego heterodimeryzacyjnego partnera, ale również obejmuje dodatkowy poziom złożoności regulacji transkrypcji genów z udziałem tych receptorów (Rastinejad, 2001). Wśród grupy receptorów jądrowych wiążących DNA jako monomery, wyróżnia się dwie podrodziny: NGFI-B i SF-1 (ang., *steroidogenic factor-1*) (Meinke i Sigler, 1999). Pierwsza, NGFI-B, preferencyjnie rozpoznaje sekwencję 5'-AAA znajdującą się w bezpośrednim sąsiedztwie motywu rdzeniowego 5'-AGGTCA-3' (Rys.3.5.C), podczas gdy podrodzina SF-1 wiąże sekwencję 5'-TCA (Meinke i Sigler, 1999).

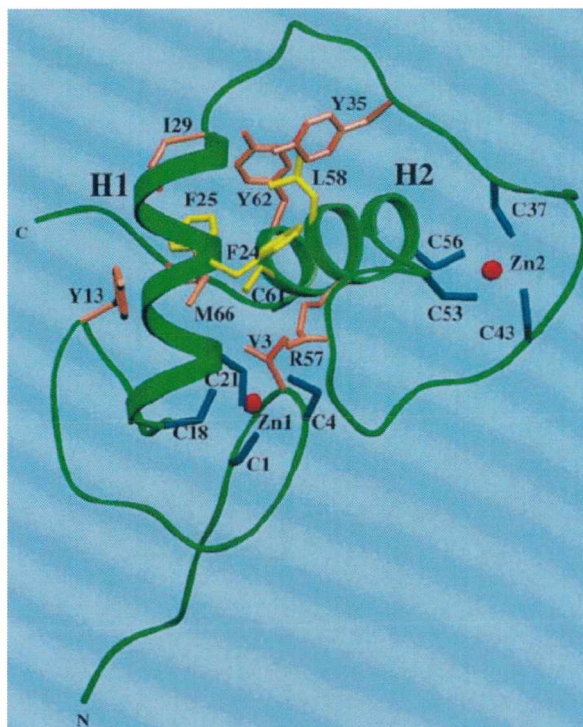
Regiony regulatorowe niektórych genów posiadają kompleks elementów HRE, zawierających kilka rozdzielonych od siebie wieloma parami zasad bezpośrednich powtórzeń motywu 5'-AGGTCA-3' (Laudet i Gronemeyer, 2002). Pokazano, że region promotora genu albuminy z jaja kurzego posiada takie powtórzenia, rozdzielone od siebie sekwencją więcej niż 100 par zasad, które mogą funkcjonować synergistycznie, jako kompleks elementów regulatorowych ER (ERE) (Kato i wsp., 1992). Przynajmniej dwa inne naturalnie występujące HRE są również zbudowane z nietypowo rozdzielonych DR. Jednym jest element regulatorowy RAR (RARE) z genu lamininy B1 (ang., *laminin B1*), który posiada trzy zdegenerowane motywy DR, rozdzielone odpowiednio 3 parami zasad i 4 parami zasad (Vasios i wsp., 1991). Drugi stanowi RARE promotora genu oksytocyny (ang., *oxytocin*) złożony z czterech bezpośrednio powtórzonych motywów podobnych do 5'-AGGTCA-3', oddzielonych od siebie odpowiednio przez 14, 47 i 0 par zasad (Richard i Zingg, 1991). Systematyczne badania rozdzielonych wieloma parami zasad DR pokazują, że elementy te

stanowią nową klasę sekwencji regulatorowych dla receptorów RAR, VDR i ER, ale nie dla TR (Kato i wsp., 1995).

Szczegółowa budowa molekularna kompleksów homo- i heterodimerycznych przedstawiona zostanie w Rozdziałach 3.3.3.1, 3.3.3.2., 3.3.3.3. i 3.3.3.3.1..

3.3.2. Domena wiążąca DNA receptorów jądrowych - reszty aminokwasowe biorące udział w wiązaniu DNA i dimeryzacji - definicja kaset P, D, T i A

Jak już wcześniej wspomniano, domena wiążąca DNA receptorów jądrowych odpowiedzialna jest za specyficzne oddziaływanie z sekwencją elementu regulatorowego. Z tego względu region ten jest, poza LBD, najintensywniej badanym fragmentem receptora. Specyficzność wiązania HRE uzyskiwana jest dzięki selektywnemu rozpoznawaniu półmiejsc elementu regulatorowemu oraz unikalnemu wykorzystywaniu różnych reszt aminokwasowych w celu zapewnienia optymalnych kontaktów białko-białko i białko-DNA (Glass, 1994; Gronemeyer i Laudet, 1995). Analizy struktur krystalicznych oraz wyniki uzyskane przy pomocy spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego wolnych DBD oraz kompleksów DBD-DNA pokazały, że region obejmujący domenę wiążącą DNA tworzy charakterystyczną strukturę przestrzenną zbudowaną z dwóch modułów cynkowych o sekwencjach: Cys-X₂-Cys-X₁₃-Cys-X₂-Cys (N-końcowy moduł pierwszy) i Cys-X₅-Cys-X₉-Cys-X₂-Cys (moduł drugi C-końcowy). Każda z dwóch par reszt cysteinyłowych modułów koordynuje tetraedrycznie jeden jon Zn²⁺. Dwie α-helisy modułów cynkowych ułożone są prostopadłe do siebie, tworząc rdzeń domeny, który wiąże się do dużej bruzdy DNA (Rys.3.7.) (Renaud i Moras, 2000; Laudet i Gronemeyer, 2002). Badania biochemiczne, eksperymenty mutacyjne, analizy struktur krystalicznych oraz badania przy użyciu spektroskopii NMR, pozwoliły zidentyfikować sekwencje aminokwasowe odpowiedzialne za oddziaływanie z HRE oraz zaangażowane w tworzenie zależnych od DNA kontaktów pomiędzy składowymi kompleksów homo- i heterodimerycznych receptorów jądrowych. Reszty te tworzą charakterystyczne regiony w DBD, zwane kasetami (ang., *boxes*): P, D, T i A (Rys.3.8. (3.3.2.)) (Renaud i Moras, 2000; Laudet i Gronemeyer, 2002). Na podstawie eksperymentów biochemicznych stwierdzono, że trzy reszty leżące na C-końcu pierwszego modułu cynkowego, wchodzące w skład α-helisy rozpoznającej DNA, odpowiedzialne są za tworzenie specyficznych kontaktów z HRE (Umesono i Evans, 1989).

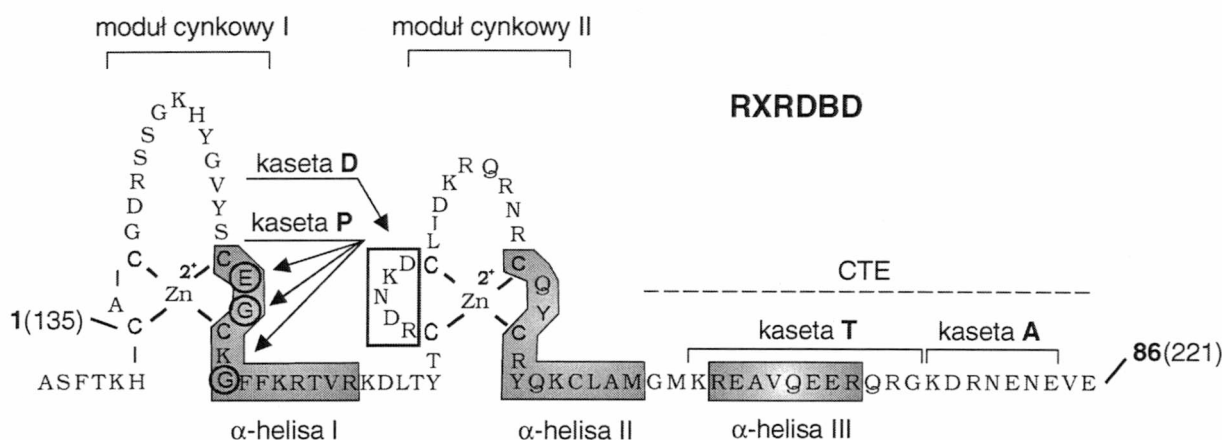


Rys.3.7. Schemat struktury ERDBD w roztworze uzyskanej przy wykorzystaniu spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego.

Region receptorów jądrowych obejmujący domenę wiążącą DNA tworzy charakterystyczną strukturę przestrzenną zbudowaną z dwóch modułów cynkowych, co pokazano schematycznie na powyższym rysunku na przykładzie ERDBD (Schwabe i wsp., 1990; kod dostępu w bazie PDB: 1HCP). W skład modułów wchodzi osiem reszt cysteinyowych (kolor niebieski) koordynujących tetraedrycznie dwa jony Zn^{2+} (czerwone kule). Pierwszy jon koordynowany jest przez reszty C1, C4, C18 i C21 (moduł pierwszy), natomiast drugi jon przez reszty C37, C43, C53 i C56 (moduł drugi); Dwie α -helisy (zaznaczone jako H1 i H2) tworzą rdzeń domeny, który wiąże się do dużej bruzdy DNA. Reszty rdzenia DBD zaznaczono kolorem żółtym, natomiast reszty zewnętrznie tworzące kontakty z rdzeniem - brązowym. Według Renaud i Moras (2000).

Reszty te, znajdujące się w pozycjach 19, 20 i 23 (numeracja odnosi się do pierwszej reszty cysteinyłowej koordynującej jon cynku w module pierwszym) nazwano „kasetą P” (ang., *proximal box*; *P-box*). W oddziaływaniach tych pośredniczą często uporządkowane cząsteczki wody, tworząc „mostki” pomiędzy resztami bocznymi białka a grupami funkcyjnymi par zasad DNA (Luisi i wsp., 1991; Rastinejad i wsp., 1995; Meinke i Sigler, 1999). Pokazano, że mutacja reszt w sekwencji CEGCKA (sekwencja występująca w receptorze estrogenowym typu „dzikiego”) na sekwencję CGSCKV, (sekwencja charakterystyczna dla receptora glukokortykoidowego typu „dzikiego”), powodowała rozpoznawanie przez GR elementu ERE, zamiast GRE (Green i wsp., 1988; Danielsen i wsp., 1989; Mader i wsp., 1989; Umesono i Evans, 1989). Z uwagi na reszty kasety P, receptory podzielono na dwie grupy, grupę „GR” oraz grupę „ER i TR” (Tsai i O’Malley, 1994; Nelson

i wsp., 1994; Gronemeyer i Laudet, 1995). Do grupy pierwszej (kaseta P - GSV) zaliczono GR, MR, AR oraz PR. Grupa druga jest bardziej zróżnicowana i należy do niej wiele receptorów jądrowych m.in. EcR, którego kaseta P jest identyczna jak w RXR (EGG) (Nelson i wsp., 1994; Gronemeyer i Laudet, 1995).



Rys.3.8. Schemat struktury drugorzędowej RXRDBD.

W DBD receptorów jądrowych wyróżniono cztery regiony nazwane kasetami P, D, T i A, które są istotne dla wiązania HRE i dimeryzacji. Jako przykład zaprezentowano schematycznie strukturę drugorzędową RXRDBD. Szare obszary obrysowują reszty wchodzące w skład trzech α -helis: I i II widocznych w strukturze krystalicznej i w strukturze uzyskanej metodą spektroskopii NMR oraz III widocznej wyłącznie w roztworze, wykorzystując technikę NMR. Reszty kasety P (E19⁷, G20 i G23) zaznaczono czarnymi kółkami. Kasety D obrysowano linią ciągłą, natomiast reszty kaset T i A zaznaczono ciągłymi kłami. CTE oznaczono linią przerywaną. Na podstawie Lee i wsp. (1993), Rastinejad i wsp. (1995), Holmbeck i wsp. (1998) oraz Laudet i Gronemeyer (2000).

Drugim charakterystycznym fragmentem DBD są reszty pochodzące z drugiego modułu cynkowego, tworzące „kasetę D” (ang. *distal box*; *D-box*) (Tsai i O’Malley, 1994; Evans, 1988). Struktury krystaliczne DBD na HRE, łącznie ze strukturami wolnych domen w roztworze, uzyskanymi techniką NMR, oraz mutacje punktowe i wymiana kaset D pomiędzy DBD receptorów jądrowych pokazały, że kaseta ta jest odpowiedzialna za homodimeryzację receptorów hormonów steroidowych na PAL o odstępniku długości trzech par zasad oraz w przypadku homodimerów TR na PAL0 (Umesono i Evans, 1989; Luisi i wsp., 1991; Schwabe i wsp., 1993; Laudet i Gronemeyer, 2002).

⁷ Numeracja poszczególnych reszt aminokwasowych receptorów jądrowych zastosowana w niniejszej pracy odnosi się do pierwszej reszty cysteiny koordynującej jon cynku w module I. W nawiasie podano numer odzwierciedlający kolejność danej reszty w stosunku do pierwszego aminokwasu w całym białku.

Reszty aminokwasowe zlokalizowane poza drugim modulem cynkowym i należące do N-końca regionu zawiasowego (region D, Rys.3.2.), formalnie wchodzące w skład C-końcowego wydłużenia DBD (CTE), okazały się być kluczowymi dla homo- i heterodimeryzacji DBD receptorów jądrowych na DR, biorąc m.in. udział w rozpoznawaniu sekwencji regulatorowych. Reszty te tworzą „kasetę T” (ang., *T-box*) oraz zlokalizowaną tuż za nią „kasetę A” (ang., *A-box*). Kaseta T została zlokalizowana po raz pierwszy w RXR β , jako fragment DBD istotny dla homodimeryzacji na DR1, tworzący płaszczyznę dimeryzacyjną (Wilson i wsp., 1992; Lee i wsp., 1993). Ponadto, jak pokazała struktura krystaliczna heterodimeru RXRDBD/TRDBD na DR4 (3.3.3.3.) (Rastinejad i wsp., 1995), region ten w TRDBD tworzy powierzchnię kontaktu z RXRDBD. Reszty kasety A TRDBD zaangażowane są dodatkowo w oddziaływanie z parami zasad umieszczonymi po 5'-stronie półmiejscza rozpoznawanego przez TRDBD. Kaseta A zidentyfikowano pierwotnie dla NGFI-B wiążącego się jako monomer do DNA (Wilson i wsp., 1992). Badania powinowactwa *in vitro*, przeprowadzone z użyciem zmodyfikowanego elementu regulatorowego wiążącego NGFI-B (NBRE) i chimerycznych DBD zasugerowały, że kaseta A rozpoznaje specyficznie sekwencję flankującą 5'-(A/T)AA elementu NBRE, umiejscowioną w małej bruzdzie DNA (Wilson i wsp., 1993). Otrzymana później struktura krystaliczna NGFI-BDBD na NBRE (Meinke i Sigler, 1999) potwierdziła te spostrzeżenia pokazując, że kaseta T, krzyżując się z DNA, umożliwia dalej położonej kasecie A kontakt z małą bruzdą i oddziaływanie z sekwencją 5'-AAA znajdująca się tuż przed motywem 5'-AGGTCA-3' (Rys.3.5.C (3.3.1.)) (Meinke i Sigler, 1999). Co więcej, w przypadku homodimeru RevErbDBD na DR2, kaseta A, zwana również tzw. „kasetą chwytającą” (ang., *grip box*) podjednostki wiążącej się do 3'-końcowego półmiejscza DR2 (3'-podjednostka) oddziałuje z drugim modulem cynkowym partnera, związanego z 5'-końcowym półmiejsczem (5'-podjednostka) (Zhao i wsp., 1998).

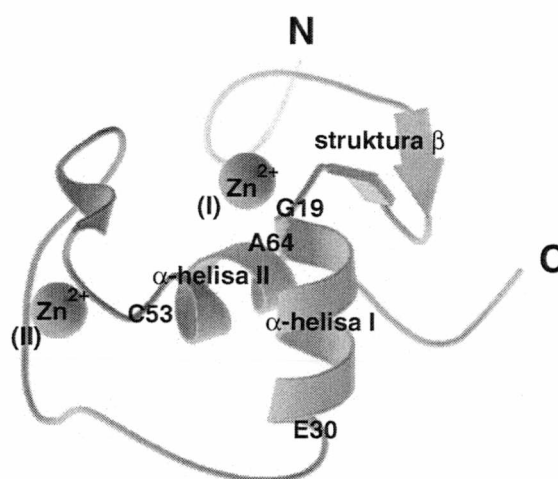
Tak więc, sekwencja CTE pełni ważną rolę w rozpoznawaniu HRE poprzez: (1) stabilizację wiązania DNA, tym samym umożliwiając oddziaływanie receptorów monomerycznych z DNA; (2) selekcję elementów regulatorowych posiadających odpowiednie 5'-wydłużenia motywu rdzeniowego - w przypadku heterodimerów z RXR dotyczy to partnera wiążącego się do 3'-końcowego półmiejscza HRE, który to różnicuje do pewnego stopnia sekwencję odstępnika w DR; (3) dyskryminację między elementami DR będącą konsekwencją uniemożliwienia tworzenia właściwych kompleksów receptorów na sekwencjach regulatorowych z odstępnikiem o nieodpowiedniej długości, w wyniku powstawania zawady przestrzennej niwelującej prawidłową płaszczyznę oddziaływania białko-białko-DNA (Zhao i wsp., 1998; Laudet i Gronemeyer, 2002).

Więcej szczegółów dotyczących roli CTE w specyficznym rozpoznawaniu HRE zamieszczono w Rozdziałach 3.3.3.3. i 3.3.3.3.1..

3.3.3. Struktury domen wiążących DNA receptorów jądrowych i ich kompleksów z HRE

3.3.3.1. *Symetria ułożenia domen wiążących DNA receptorów hormonów steroidowych na elementach palindromowych*

Pierwszymi poznanymi, przy wykorzystaniu spektroskopii NMR, strukturami przestrzennymi receptorów jądrowych były struktury DBD GR i ER (Härd i wsp., 1990; Schwabe i wsp., 1990). Otrzymane wyniki analiz pokazały, że domeny wiążące DNA receptorów jądrowych wykazują podobną budowę przestrzenną (Schwabe i wsp., 1990; Baumann i wsp., 1993). Okazało się, że posiadają one motywy cynkowe o strukturze znacznie odbiegającej od klasycznych palców cynkowych znalezionych po raz pierwszy w czynniku transkrypcyjnym TFIIA z *Xenopus* (Miller i wsp., 1985; Brown i wsp., 1985). Klasyczny palec cynkowy zawiera dwie reszty cysteinyłowe i dwie histydynyłowe (Cys2-His2), koordynujące tetraedrycznie jon cynku, tworząc upakowaną i wydłużoną strukturę przestrzenną, która umożliwia częściowe owinięcie się tego palca wokół DNA (Berg, 1990; Pavletich i Pabo, 1991; Rhodes i Klug, 1993; Berg i Shi., 1996). W przeciwieństwie do TFIIA, dwa moduły cynkowe DBD receptorów jądrowych oddziałują ze sobą poprzez reszty aromatyczne α -helisy, tworząc z innymi hydrofobowymi resztami rdzeń domeny, co z kolei prowadzi do uzyskania przez DBD struktury globularnej (3.3.2.) (Freedman i wsp., 1988; Freedman, 1992; Baumann i wsp., 1993). Większość tych reszt aminokwasowych jest wysoce zachowana w toku ewolucji. Jak zauważono, ich mutacje wpływają znacząco na utratę funkcji, co podkreśla ich rolę w stabilizacji rdzenia (Xu i wsp., 1993; Grad i wsp., 2001). Pokazano, że struktura globularna GRDBD utrzymywana jest w wyniku oddziałujących ze sobą reszt aromatycznych: F24(463), F25(464), Y58(497), Y13(452), Y35(474) (Härd i wsp., 1990; Baumann i wsp., 1993) powodując, że dwie α -helisy (α -helisa I i II) ułożone są prostopadle do siebie (Rys.3.9.).



Rys.3.9. Schemat struktury przestrzennej GRDBD w roztworze uzyskanej spektroskopią NMR.

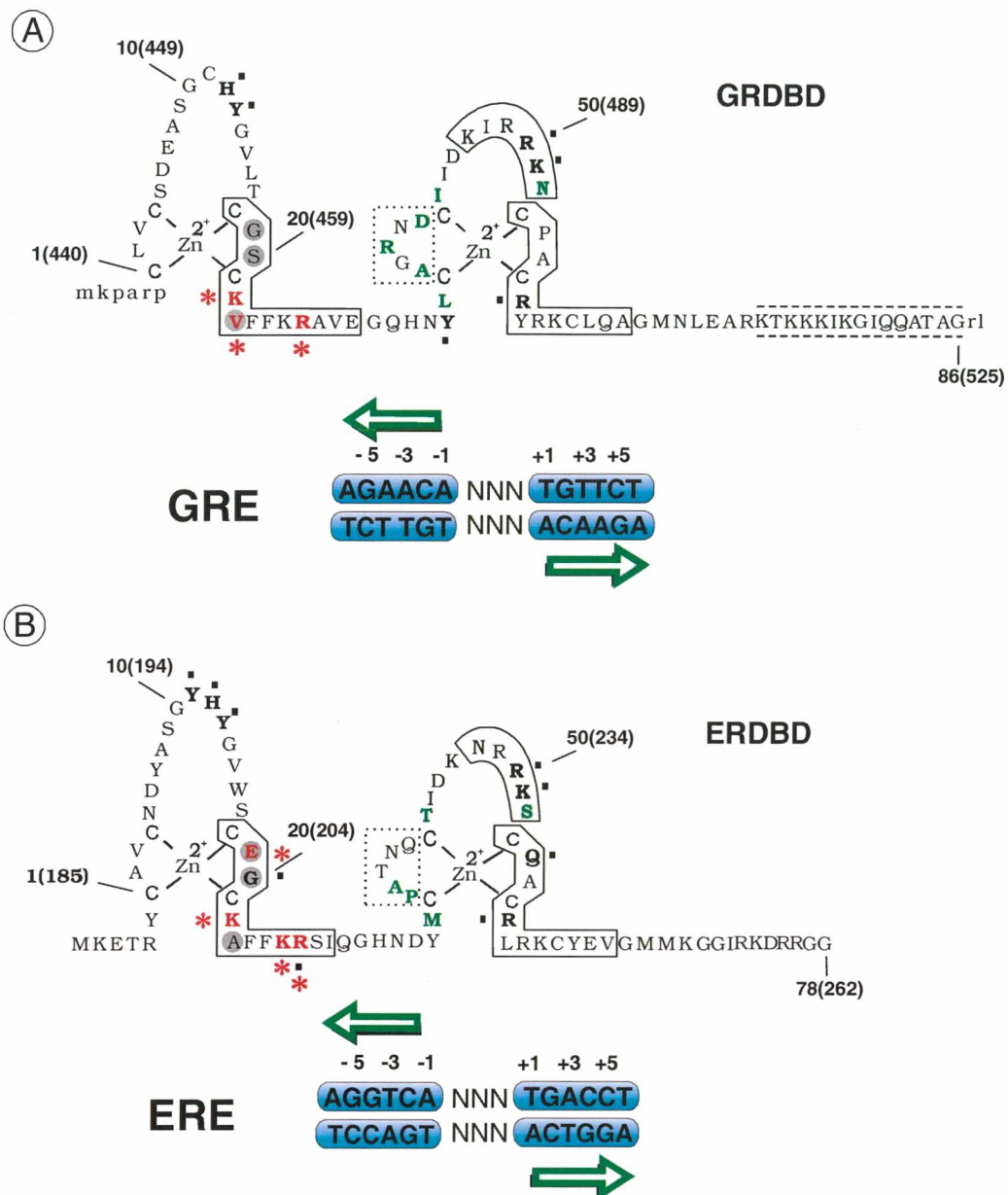
Na schemacie zaznaczone zostały widoczne w GRDBD struktury drugorzędowe, α -helisy (I i II) przedstawiono jako cylindrycznie zwinięte wstążki, natomiast struktury β jako strzałki. Zaznaczono orientacyjne położenie charakterystycznych reszt aminokwasowych ograniczających α -helisy w modułach cynkowych. Koordynowane jony Zn^{2+} zaprezentowano jako szare kule. Schemat nie uwzględnia wszystkich struktur drugorzędowych. Więcej szczegółów w tekście. Na podstawie Baumann i wsp. (1993); kod dostępu w bazie PDB: 1GDC.

Reszty znajdujące się na końcu pierwszego modułu cynkowego (I) (G19(458)-E30(469)) wchodzą w skład α -helisy I, natomiast α -helisa II obejmuje reszty aminokwasowe ulokowane przy końcu drugiego modułu cynkowego (C53(493)-A64(503)) (Rys.3.9.) (Härd i wsp., 1990; Baumann i wsp., 1993). Pierwszy moduł cynkowy zaczyna się krótką antyrównoległą strukturą β (Rys.3.9.), która ułatwia właściwe zorientowanie reszt biorących udział w oddziaływaniach ze szkieletem fosforanowym GRE (Baumann i wsp., 1993). W obrębie α -helisy I obecna jest kaseta P. Uzyskana struktura krystaliczna homodimeru GRDBD w kompleksie z DNA pokazała, że α -helisa I odpowiedzialna jest za bezpośrednie oddziaływanie ze specyficznymi parami zasad HRE umiejscowionymi w dużej bruzdzie DNA (Rys. 3.10.A.) (Luisi i wsp., 1991). Drugi moduł cynkowy istotny jest dla dimeryzacji DBD i kontaktów ze szkieletem fosforanowym DNA po związaniu się obu podjednostek do PAL3 (Luisi i wsp., 1991). Jak pokazała analiza struktury krystalicznej, w wyniku kooperatywnego związania DNA i dimeryzacji GRDBD na PAL3, najbardziej znaczące zmiany konformacyjne zachodzą w obrębie pętli tworzącej płaszczyznę dimeryzacyjną (kaseta D), umożliwiając tym samym utworzenie homodimeru GRDBD (Rys. 3.10.A) (Luisi i wsp., 1991; Baumann i wsp., 1993). Zdziwiające jest to, że wprowadzenie mutacji punktowych w pozycjach S459 i P493 (S zamieniono na A, natomiast w miejsce P

podstawiono R, uzyskując mutanty S459A i P493R, odpowiednio) leżących poza płaszczyzną dimeryzacyjną w GRDBD, indukowało identyczne zmiany strukturalne w regionie kasety D, jak w związanym GRDBD z DNA (van Tilborg i wsp., 2000). Analizy struktur przestrzennych mutantów S459A i P493R w roztworze, wykonane spektroskopią NMR, i porównanie ich ze strukturami GRDBD bez DNA i z GRE (Luisi i wsp., 1991; Baumann i wsp., 1993), potwierdziły istnienie allosterycznego efektu wiązania DNA i transmisji zmian konformacyjnych pomiędzy HRE a powierzchnią kontaktu białko-białko (van Tilborg i wsp., 2000). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że reszty kasety D nie są zachowane w toku ewolucji między podklasami rodziny receptorów jądrowych. Dlatego kontakty tworzone przez specyficzne reszty tej kasety mogą odgrywać rolę w dyskryminacji między homodimeryzacją a heterodimeryzacją receptorów jądrowych (Glass, 1994).

Kompleks homodimeryczny GRDBD na GRE jest symetryczny osiowo. Obie podjednostki wiążą się do GRE po tej samej stronie DNA, w dwóch sąsiednich dużych bruzdach, w sposób tzw. „głowa do głowy” (ang., *head to head*) (Luisi i wsp., 1991). Łańcuchy boczne reszt aminokwasowych α -helisy I, ułożonej pod kątem prawie 90° do osi DNA, tworzą specyficzne wiązania z GRE (Luisi i wsp., 1991). Co jest interesujące, obie podjednostki nie są zaangażowane w oddziaływania z odstępnikiem (3 pary zasad) znajdującym się w małej bruzdzie DNA. Płaszczyzna kontaktu między DBD znajduje się tuż nad małą bruzdą. Oddziaływania pomiędzy DBD-DBD obejmują symetryczną parę mostków solnych utworzonych przez reszty R40(479) i D42(481) w jednej podjednostce z D42(481) i R40(479) w podjednostce drugiej oraz symetryczną parę wiązań wodorowych pomiędzy grupą karbonylową A38(477) a grupą amidową reszty I44(483) w obu domenach (Rys.3.10.A) (Luisi i wsp., 1991). W stabilizacji utworzonego homodimeru biorą również udział reszty leżące poza kasetą D: symetryczna para wiązań wodorowych utworzonych przez grupę karbonylową N52(491) jednej podjednostki oraz łańcuch boczny N52(491) podjednostki drugiej. Ponadto symetryczne oddziaływania hydrofobowe I48(487) i L36(475) w obu DBD dodatkowo zwiększają siłę kontaktów (Rys. 3.10.A.) (Luisi i wsp., 1991).

Drugą poznaną strukturą kompleksu DBD-DNA receptorów jądrowych była struktura krystaliczna homodimeru ERDBD na ERE (Rys. 3.10.B) (Schwabe i wsp., 1993).



Rys.3.10. Schematyczne przedstawienie elementów strukturalnych GRDBD i ERDBD ważnych dla homodimeryzacji na GRE i ERE.

Schemat przedstawia struktury pierwszorzędowe GRDBD i ERDBD z zaznaczonymi istotnymi resztami dla homodimeryzacji GRDBD na GRE (Luisi i wsp., 1991) (A) oraz ERDBD na ERE (Schwabe i wsp., 1993) (B). Reszty zapisane małymi literami na N-końcu i C-końcu GRDBD pochodzą z wektora ekspresyjnego. Linia przerywaną zaznaczono C-końcową sekwencję GRDBD, nie posiadającą w kryształ zdefiniowanej struktury drugorzędowej. Regiony o strukturze helikalnej zaznaczono ramkami linią ciągłą, natomiast reszty kasety D objęto linią kropkowaną. Szarymi kółkami oznaczono reszty kasety P. Symbolami i kolorami wyróżniono reszty, które biorą udział w oddziaływaniach. Pominięto reszty zaangażowane w wiązania wodorowe przez cząsteczki wody. Gwiazdkami i kolorem czerwonym zaznaczono reszty bezpośrednio oddziałujące z grupami funkcyjnymi par zasad danego HRE (GRE (A) i ERE (B)). Kolorem zielonym wyróżniono reszty zaangażowane w dimeryzację, natomiast pełnymi kwadratami pozostałe reszty oddziałujące z DNA.

Na Rys.3.5.A (3.3.1.) zaprezentowano ogólną architekturę dimeru. Uzyskane struktury krystaliczne homodimerów GRDBD i ERDBD na odpowiednich elementach regulatorowych przyczyniły się do zrozumienia podstaw specyficznego rozpoznawania HRE przez receptory jądrowe hormonów steroidowych. Wzbogaciły również wiedzę uzyskaną z wcześniejszych eksperymentów genetycznych i biochemicznych oraz analiz struktur DBD w roztworach (Glass, 1994). Sekwencja zgodna GRE (5'-AGAACA-3') (Rys.3.10.A) różni się od ERE (5'-AGGTCA-3') (Rys.3.10.B) dwoma centralnymi nukleotydami, mianowicie: A(-4)⁸ A(-3) w GRE to G(-4) T(-3) w ERE (Evans, 1988; Tsai i O'Malley, 1994). W DBD receptora GR V23(462) z kasety P jest jedyną resztą tworzącą za pośrednictwem wiązania van der Waalsa kontakt ze specyficzną dla GRE zasadą T(-3) (Luisi i wsp., 1991). Dodatkowo w wiązaniu GRE uczestniczą reszty (R27(466) i K22(461)) należące do α -helisy rozpoznającej DNA (α -helisy I), niezmiennie dla rodziny receptorów jądrowych, tworzące wiązania wodorowe z zasadami G(-2) i G(-5), które są zachowane w wielu poznanych HRE (Rys.3.10.B) (Luisi i wsp., 1991). Co jest ważne, w orientacji DBD na HRE, oprócz oddziaływań z grupami funkcyjnymi par zasad, biorą udział kontakty łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych ze szkieletem fosforanowym, co również wpływa na stabilność utworzonego kompleksu DBD-DNA, m.in. poprzez umożliwienie innym resztom α -helisy I oddziaływanie z parami zasad dużej bruzdy DNA (Luisi i wsp., 1991; Glass, 1994). Reszta R50(489) z drugiego modułu cynkowego tworzy wiązanie wodorowe z grupą fosforanową zasady G(-2), które to oddziaływanie dodatkowo wspomagane jest siecią wiązań wodorowych tej reszty z D6(445) pochodzącą z pierwszego modułu, N41(480) z kasety D oraz S20(459) z kasety P (Luisi i wsp., 1991). W celu zbadania wpływu odległości między półmiejscami GRE na homodimeryzację przeprowadzono eksperyment, w którym zwiększono odległość odstępnika w GRE o 1 parę zasad (Luisi i wsp., 1991). Jak się okazało, jedna podjednostka homodimeru GRDBD wiązała się do połówki GRE4 specyficznie, natomiast druga w sposób niespecyficzny, zachowując jednakże niezmienną powierzchnię dimeryzacyjną. Zasugerowano, że wiązanie DNA i jednocześnie dimeryzacja są faworyzowane przez HRE z odpowiednio rozdzielonymi półmiejscami motywu rdzeniowego (Luisi i wsp., 1991).

W przypadku ERDBD w wiązaniu się tej domeny do ERE istotne są cztery polarne reszty aminokwasowe wchodzące w skład α -helisy I, z których trzy stanowią reszty zasadowe: E19(203), K22(206), K26(210) i R27(211) (Rys.3.10.B.) (Schwabe i wsp., 1993). Reszta pierwsza (E19(203)), będąca częścią kasety P ERDBD, tworzy wiązanie wodorowe ze

⁸ Cyfra w nawiasie oznacza pozycję danego nukleotydu względem osi symetrii HRE przechodzącej w centralnym miejscu HRE.

specyficzną dla ERE zasadą C(-4). Łańcuchy boczne reszt E19(203) i K22(206) zorientowane są w przestrzeni, w wyniku szeregu oddziaływań pomiędzy E19(203), S9(193), H12(197) i szkieletem fosforanowym DNA, dzięki czemu zapewniona zostaje odpowiednia pozycja ich kontaktów z ERE (Schwabe i wsp., 1993). Reszta K22(206) jest donorem wiązania wodorowego do G(-5) (podobnie jak analogiczna reszta w GRDBD). Ponadto, R27(211) oddziałuje z G(-2) i grupą fosforanową zasady T(-1) oraz przez trzy cząsteczki wody z G(-2) i szkieletem fosforanowym DNA (Rys.3.10.B). K26(210) tworzy kontakty z A(-3) i C(-6) elementu ERE (Schwabe i wsp., 1993). Analogiczna reszta lizylova w GRDBD nie jest istotna dla tej domeny w wiązaniu GRE (Rys.3.10.B).

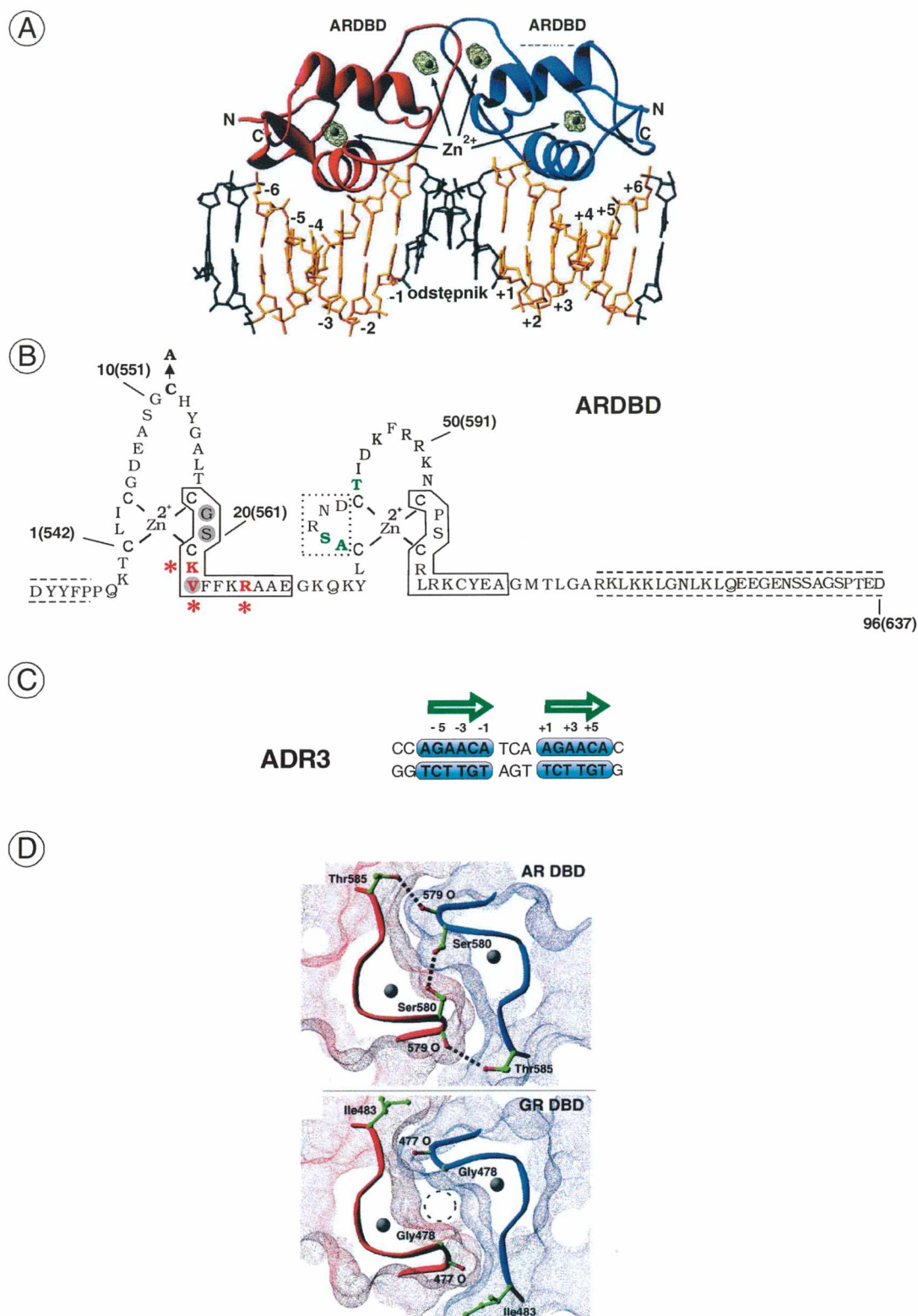
Powyższe spostrzeżenia pokazują w sposób wyraźny, że te same reszty aminokwasowe są wykorzystywane w różny sposób przez dwie DBD, aby rozpoznać odpowiedni HRE. Ponadto, reszty spoza kasety P, wchodzące w skład α -helisy rozpoznającej DNA, również biorą udział w różnicowaniu HRE (Luisi i wsp., 1991; Schwabe i wsp., 1993; Glass, 1994). Receptory jądrowe wiążą się z różnym powinowactwem do szerokich klas HRE różniących się od sekwencji uzgodnionej (Laudet i Gronemeyer, 2002). W celu zapewnienia optymalnych oddziaływań na danym elemencie regulatorowym, w kontaktach z grupami funkcyjnymi par zasad niejednokrotnie znaczącą rolę odgrywają uporządkowane cząsteczki wody, które kompensują brak możliwości bezpośredniego kontaktu między resztą aminokwasową a sekwencją DNA (Schwabe, 1996). Dlatego też receptory jądrowe rozpoznają różne sekwencje regulatorowe nie tylko ze względu na zdolność do dimeryzacji, ale przez możliwość tworzenia różnorodnych typów kontaktów z DNA. Warto podkreślić, że większość naturalnie występujących HRE receptorów hormonów steroidowych stanowią niedoskonałe palindromy (Luisi i wsp., 1991; Gronemeyer i Laudet, 1995; Renaud i Moras, 2000; Laudet i Gronemeyer, 2002). Jak się powszechnie uważa, w zróżnicowaniu HRE przez receptory hormonów steroidowych znaczącym elementem, pominąwszy stopień zdegenerowania sekwencji HRE, może być obecność specyficznych sekwencji oskrzydłających elementy regulatorowe, zarówno po stronie 5', jak i 3' (Nelson i wsp., 1999). Nie bez znaczenia jest również fakt, iż w rozpoznawaniu właściwego HRE mogą pośredniczyć dodatkowo koregulatory lub inne czynniki transkrypcyjne oddziałujące z receptorami (Schoenmakers i wsp., 2000). Przypuszcza się bowiem, że wydrukowane pod wpływem HRE zmiany konformacyjne w strukturze trzeciorzędowej mogą wpływać na modulację oddziaływań z koregulatorami, co zasugerowano m.in. w przypadku ER α ,

wykonując eksperymenty proteolizy na ER α w nieobecności i obecności różnych ERE (Klinge i wsp., 2001).

3.3.3.2. *Homodimer receptora androgenowego wiąże asymetryczny element zorganizowany jako DR (ADR3) w konfiguracji typowej dla homodimerów receptorów steroidowych związanych z symetrycznymi HRE*

Jak już wcześniej wspomniano, klasyczne receptory steroidowe (AR, PR, MR i GR) rozpoznają palindromowe HRE, zbudowane z dwóch zgodnych heksamerycznych półmiejsc (5'-AGAACA-3') zorganizowanych w postaci odwróconych powtórzeń z odstępnikiem długości 3 par zasad (IR3). Pozostaje to w zgodzie z faktem, że kasetę P tych receptorów jest identyczna (CGSCKV) (Beato i wsp., 1995; Gronemeyer i Laudet, 1995). Jednakże, jak pokazały badania, AR pomimo przynależności do powyższej rodziny, wykazuje charakterystykę wiązania DNA zbliżoną do receptorów heterodimeryzujących z RXR, przejawiającą się zdolnością AR do wiązania również sekwencji typu DR. Zidentyfikowano bowiem naturalne selektywne elementy regulatorowe dla AR (ARE), zbudowane z dwóch heksamerycznych półmiejsc o architekturze zbliżonej do bezpośredniego powtórzenia zgodnego półmiejsc (5'-AGAACA-3') z odstępnikiem 3 par zasad (ADR3) (Claessens i wsp., 1996; Verrijdt i wsp., 1999; Verrijdt i wsp., 2000). Eksperymenty mutacyjne zasugerowały, że sposób wiązania elementu pochodzącego z promotora szczurzej probazyny (ang., *probasin*) (PB-ARE-2) przez AR jest identyczny ze sposobem, w jakim asymetryczne elementy DR wiązane są przez heterodimery RXR, tzn. „głowa do ogona” (ang., *head to tail*). Co więcej, w selektywnym wiązaniu tego elementu najprawdopodobniej bierze udział CTE DBD (Schoenmakers i wsp., 1999). Jednakże opublikowana ostatnio struktura krystaliczna homodimeru ARDBD na ADR3 (5'-CCAGAACATCAAGAACAC-3', nie „górną” ADR3) (Shaffer i wsp., 2004) nieoczekiwanie ujawniła, że homodimer ARDBD wiąże asymetryczny ADR3 w konfiguracji „głowa do głowy” (Rys.3.11.A), typowej dla receptorów hormonów steroidowych (3.3.3.1.). Płaszczyzna dimeryzacyjna obu podjednostek jest symetryczna i bardzo zbliżona do zaobserwowanej w kompleksie GRDBD/DNA (Luisi i wsp., 1991). Większość reszt zaangażowana w oddziaływania pochodzi z kasety D (Rys.3.11.B). Jednakże, w płaszczyźnie dimeryzacyjnej homodimeru GRDBD występuje „pusta przestrzeń” utworzona pomiędzy naprzeciwległymi resztami G39(478) zwana „dziurą glicylową” (ang., *glycine hole*) (Rys.3.11.D). W przeciwieństwie do GRDBD, w ARDBD w miejscu glicyny podstawiona jest seryna (S39(580)) (Rys.3.11.B). Reszty S39(580) obu podjednostek

wypełniają pustą przestrzeń, tworząc pomiędzy sobą oddziaływania van der Waalsa. W homodimerze ARDBD występują również dodatkowe symetryczne oddziaływania pomiędzy T44(585) jednej podjednostki a grupą karbonylową reszty A38(579) podjednostki drugiej (Rys.3.11.B). Powyższe kontakty zapewniają optymalną siłę tworzenia wiązań wodorowych, większą niż zaobserwowana w przypadku GRDBD, co wpływa na stabilizację uformowanego homodimeru i może przełożyć się na zwiększenie powinowactwa ARDBD do odpowiedniego ARE w porównaniu do GRDBD (Shaffer i wsp., 2004). Do krystalizacji użyto ARE o sekwencji nici kodującej: 5'-CCAGAACATCAAGAACAC-3' (Rys.3.11.C), który, jak wspomniano powyżej, różni się architekturą od klasycznego HRE wiązanego przez receptory steroidowe (symetryczna zgodna sekwencja 5'-AGAACANNNTGTTCT-3'). Konsensusowe 5'-końcowe półmiejsce w elementach DR3 i IR3 jest identyczne. Ponadto charakteryzuje się ono wysokim powinowactwem do DBD receptorów steroidowych. Z drugiej strony, podjednostka ARDBD wiąże się do 3'-końcowego półmiejsca zawierającego tylko zachowane w elementach typu IR3 pary zasad w pozycjach (+2) i (+5) (podkreślone wyżej). Oddziaływania ze szkieletem DNA są podobne dla obu podjednostek homodimeru ARDBD i wykazują wzorzec zaobserwowany w strukturach innych kompleksów DBD receptorów steroidowych z DNA. Specyficzne kontakty pomiędzy ARDBD i parami zasad zgodnego półmiejsca są prawie identyczne jak w kompleksie GRDBD z odpowiednim półmiejscem GRE (Luisi i wsp., 1991). Zauważono jednak, że alifatyczny łańcuch boczny reszty R27(568) dodatkowo kontaktuje się z V23(564) i grupą metylową C5 tyminy w pozycji -1 (T(-1)) (Rys.3.11.B i Rys.3.11.C). Sieć wzajemnych oddziaływań w tym obszarze nosi nazwę tzw. „kanapki van der Waalsa” (ang., *van der Waals sandwich*). Te specyficzne kontakty częściowo wyjaśniają, dlaczego para A:T jest powszechnie obserwowana w tej pozycji w ARE (Shaffer i wsp., 2004). Ponadto oddziaływanie pomiędzy zachowaną w toku ewolucji resztą R27 w DBD receptorów a tyminą w zgodnym półmiejscu, obserwowane również w innych strukturach krystalicznych DBD na odpowiednich HRE, tłumaczą częściowo preferencje obecności pary A:T w tej pozycji w kompleksach DBD-DNA (Shaffer i wsp., 2004). W kompleksie ARDBD z odpowiednim półmiejscem ADR3, łańcuch boczny V23(564) kontaktuje się poprzez oddziaływania van der Waalsa z grupą 5-metylową tyminy w pozycji trzeciej danego półmiejsca (Rys.3.11.B i Rys.3.11.C). To wiązanie między dwiema niepolarnymi resztami jest jednym z elementów dyskryminujących oddziaływanie białko-DNA dla receptorów steroidowych, gdzie dehydratacja płaszczyzny oddziaływań wpływa na stabilność wiązania DNA (Lundback i wsp., 1993; Gewirth i Sigler, 1995).



Rys.3.11. Elementy strukturalne ARDBD istotne dla tworzenia homodimeru na ADR3.

Na podstawie struktury krystalicznej homodimeru ARDBD na DNA przedstawiono elementy strukturalne istotne dla homodimeryzacji ARDBD na ADR3 (Shaffer i wsp., 2004). (A) Struktura kompleksu ARDBD-ADBBD. Podjednostkę homodimeru wiążącą się do 5'-końcowego półmiesca ADR3 oznaczono kolorem czerwonym, natomiast podjednostkę związaną z półmiescem 3'-końcowym kolorem niebieskim. Półmiesca elementu ADR3 zaznaczono na żółto, natomiast odstępnik i

sekwencje oskrzydlające na czarno. (B) Schemat struktury drugorzędowej ARDBD. Z uwagi na problemy jakie pojawiły się podczas wstępnych eksperymentów krystalizacji, autorzy pracy ostatecznie wykorzystali mutant ARDBD posiadającego w miejscu C11(552) resztę alaniny (zaznaczono strzałką) (Shaffer i wsp., 2004). Oznaczenia jak na Rys. 3.10.. (C) Sekwencja elementu ADR3 użytego do krystalizacji. (D) Płaszczyzny dimeryzacyjne ARDBD i GRDBD w obrębie sekwencji kasety D. Liniami przerywanymi oznaczono wiązania wodorowe. W przypadku płaszczyzny dimeryzacyjnej homodimeru GRDBD, pustym kołem zakreślonym linią przerywaną opisano tzw. „dziurę glicylową”. Więcej szczegółów w tekście. Według Shaffer i wsp. (2004).

Dwie pary zasad w pozycjach (+2) i (+5), (G:C i C:G, odpowiednio), w 3'-końcowym półmiejscu znajdują się w tych samych pozycjach jak w konsensusowym półmiejscu elementu IR3, ponieważ są rozmieszczone symetrycznie w obrębie tej części elementu (Rys.3.11.C). Ta zgodność pozycji w odniesieniu do IR3 pozwala resztom K22(563) i R27(568) drugiej podjednostki na „rekapitulację” wiązań wodorowych z parami GC w pozycji drugiej i piątej heksamerycznego półmiejscu, podobnie jak zaobserwowano to dla podjednostki pierwszej wiążącej się do półmiejscu 5'-końcowego (Shaffer i wsp., 2004). Zauważono, że powyższe tzw. dwa „haki” (ang., *hooks*), uformowane przez reszty lizylowe i arginyłowe, są elementami, które odpowiednio umiejscawiają α -helisę rozpoznającą DNA w dużej bruzdzie DNA, w której ulokowane jest heksameryczne półmiejscu (Nelson i wsp., 1999; Shaffer i wsp., 2004). W niezachowanym 3'-końcowym półmiejscu ADR3 w pozycji (+3) nici kodującej, w miejsce A podstawiona jest T, co przejawia się utratą kontaktu reszty V23(564), z podjednostki wiążącej się do tej części ADR3, z T (Rys.3.11.B i Rys.3.11.C). Pomimo, że w ten sposób redukcji uległa liczba specyficznych, stabilizujących oddziaływań z DNA, substytucja A w miejsce T nie spowodowała zawady sterycznej, uniemożliwiającej wiązanie się ARDBD do tego półmiejscu (Shaffer i wsp., 2004).

Podsumowując, uzyskana struktura krystaliczna homodimeru ARDBD na wyidealizowanym steroidowym asymetrycznym elemencie DR3 ujawniła niespodziewaną konfigurację wiązania, „głowa do głowy”, typową dla symetrycznych kompleksów dimerycznych receptorów steroidowych (3.3.3.1.). Pomimo, że zarówno ARDBD jak i GRDBD wykazują podobną charakterystykę wiązania steroidowego elementu regulatorowego, to ARDBD dodatkowo jest w stanie oddziaływać z elementami DR. Jak się uważa, różnice między powinowactwami obu rodzajów DBD mogą wynikać z różnic występujących w CTE DBD GR i AR (Shaffer i wsp., 2004). Jednakże, w strukturach krystalicznych kompleksów GRDBD-GRE i ARDBD-ADR3 regiony C-końcowych wydłużeń domen są nieuporządkowane (Luisi i wsp., 1991; Shaffer i wsp., 2004). Sugeruje

się, że obszary CTE mogą wносить wkład w ogólne oddziaływania elektrostatyczne, bez wpływu na selektywność i dyskryminację HRE (Shaffer i wsp., 2004). W obszarze rdzenia DBD, oddziaływania białko-DNA są prawie identyczne dla DBD receptorów GR i AR. Uważa się, że różnice w powinowactwie do określonych HRE leżą w zdolności reszt każdego z receptorów do kooperatywnego tworzenia dimerów o konfiguracji „głowa do głowy” na dwuczęściowych HRE, gdzie oddziaływania z jednym lub dwoma heksamerycznymi półmiejscami nie są optymalne (Shaffer i wsp., 2004). Ponadto silniejsza płaszczyzna dimeryzacyjna pomiędzy podjednostkami ARDBD, w przeciwieństwie do GRDBD, może pozwalać AR na wiązanie różnego rodzaju HRE z większym powinowactwem i kooperatywnością niż GRDBD. Co więcej, aktywacja genów będących pod kontrolą selektywnych ARE może być wynikiem zdolności AR do oddziaływania z elementami IR3 posiadającymi wysoki stopień zdegenerowania (Shaffer i wsp., 2004). Otrzymana struktura krystaliczna kompleksu ARDBD-ADR3 dodatkowo sugeruje, że najważniejszym parametrem decydującym o rozpoznaniu docelowej sekwencji DNA przez receptory jądrowe jest siła z jaką dimeryzują obie podjednostki dimeru, nawet kosztem utraty specyficznych oddziaływań z DNA (Shaffer i wsp., 2004). Stanowiąc to może próbę odpowiedzi na wciąż nurtujące pytanie, w jaki sposób receptory hormonów steroidowych rozpoznają właściwe HRE, pomimo tak dużego zdegenerowania elementów regulatorowych.

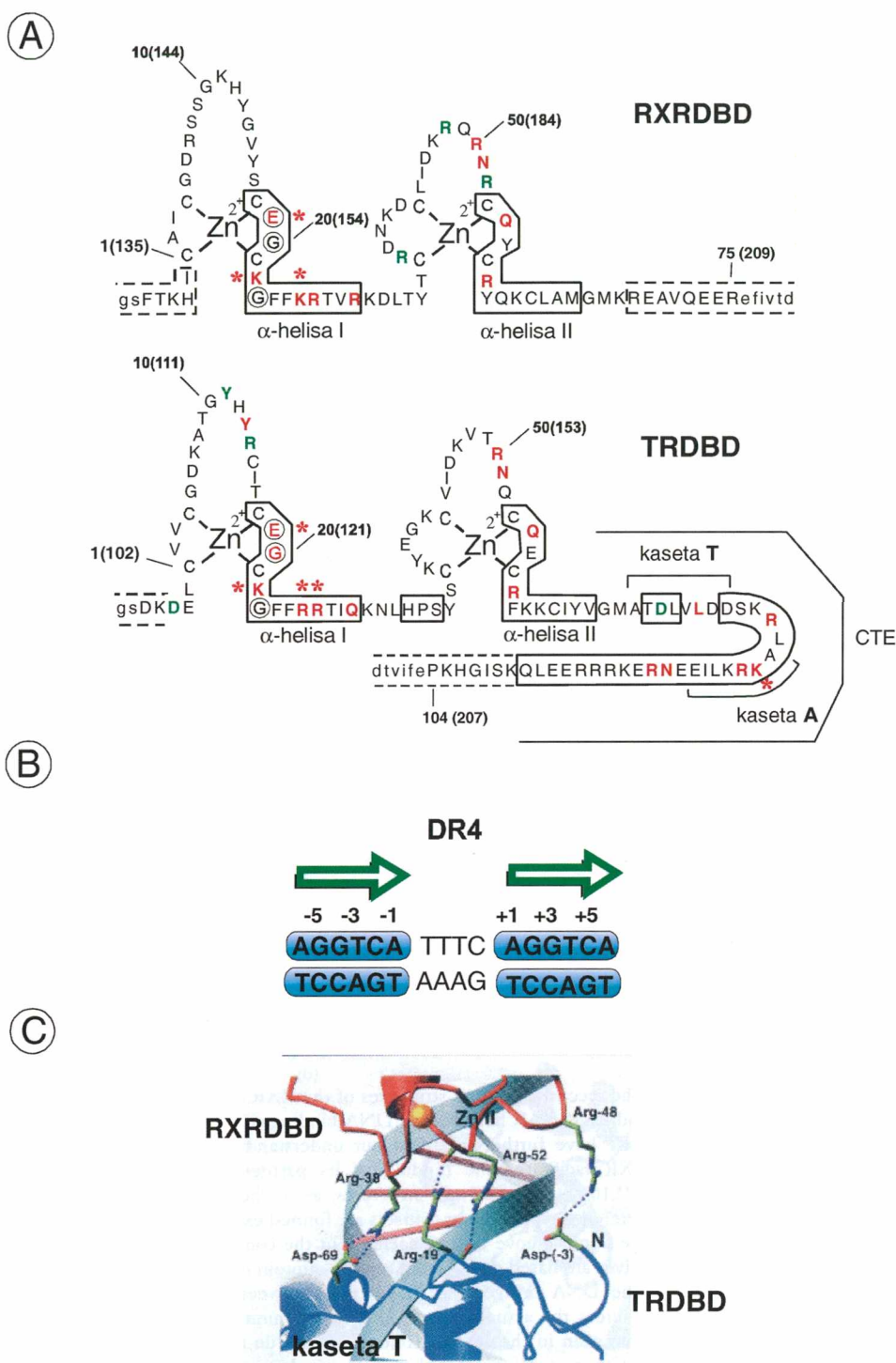
3.3.3.3. Anizotropowe kompleksy receptorów jądrowych z elementami regulatorowymi zorganizowanymi w postaci bezpośrednich powtórzeń

Receptory jądrowe tworzące heterodimery z RXR preferencyjnie wiążą sekwencje regulatorowe zorganizowane w postaci DR motywu rdzeniowego 5'-AGGTCA-3' z charakterystycznymi odstępnikami o różnej długości par zasad (3.3.1.). W przeciwieństwie do HRE receptorów hormonów steroidowych, sekwencja DR jest asymetryczna, co powoduje charakterystyczne wiązanie się podjednostek dimeru (Glass, 1994). Ten tandemowy układ sprawia, że kompleks asymetryczny posiada konfigurację „głowa do ogona”. Asymetria elementu DR narzuca zdefiniowaną orientację (tzw. „polarność”) kompleksu w stosunku do końców miejsca wiążącego. Przykładowo, w heterokompleksie RXRDBD/TRDBD na DR4, RXRDBD zajmuje 5'-końcowe półmiejsce, natomiast TRDBD półmiejsce 3'-końcowe (Rastinejad i wsp., 1995). Polarność heterodimerycznych kompleksów DBD na DR zależy od budowy DBD oraz długości odstępника. Co jest interesujące, sekwencja odstępника jest mniej krytyczna dla dyskryminacji niż jego długość. Ułożenie obu podjednostek w odpowiedniej

odległości gwarantuje powstanie stabilnej powierzchni dimeryzacyjnej między DBD receptorów. Tylko wtedy dochodzi do utworzenia sieci odpowiednich oddziaływań pomiędzy podjednostkami dimeru. Steryczne zawady powstające na elementach o nieodpowiednim odstępniku uniemożliwiają formowanie określonych kompleksów DBD (Rastinejad i wsp., 1995; Zechel i wsp., 1994). Przykładowo kaseta A TRDBD tworzy długą α -helisę, która uniemożliwia formowanie kompleksu z RXRDBD na DR o odstępniku krótszym niż 4 pary zasad (Rastinejad i wsp., 1995). Eksperymenty mutacyjne pozwoliły określić regiony DBD receptorów odpowiedzialne za tworzenie powierzchni dimeryzacyjnych na danym DR (Towers i wsp., 1993; Kurokawa i wsp., 1993; Mader i wsp., 1993; Zechel i wsp., 1994). Jednakże uzyskane później struktury krystaliczne kompleksów określonych DBD z RXRDBD ujawniły szczegóły tych oddziaływań. Jak dotąd uzyskano trzy struktury kryształów dimerów zawierających RXRDBD na DR. Pierwszą poznaną strukturą przestrzenną dimeru z RXR była struktura heterodimeru RXRDBD/TRDBD na DR4 (Rys.3.12.) (Rastinejad i wsp., 1995), następną homodimeru RXRDBD/RXRDBD na DR1 (Zhao i wsp., 2000) oraz heterodimeru RARDBD/RXRDBD na DR1 (Rastinejad i wsp., 2000).

RXR jest ważnym członkiem nadrodziny receptorów jądrowych, biorącym udział w regulacji rozwoju i homeostazy kręgowców (Chambon, 1996). Trzy odrębne geny kodują główne izoformy RXR: RXR α , RXR β i RXR γ (Laudet i Gronemeyer, 2002). Izofomy te są wzajemnie homologiczne w obrębie dwóch ważnych regionów - DBD (93%) i LBD (88%). Dodatkowe podtypy RXR, które występują w różnych tkankach i na różnych etapach rozwoju osobniczego, powstają w wyniku alternatywnego składania genów (Kwiatkowska i Kwiatkowska-Korczak, 2000; Laudet i Gronemeyer, 2002).

Pierwszą strukturę o niskiej rozdzielczości RXRDBD w roztworze uzyskano przy użyciu spektroskopii NMR (Lee i wsp., 1993). Ujawniła ona, że w przeciwieństwie do DBD klasycznych receptorów steroidowych (3.3.3.1.), RXRDBD posiada dodatkową trzecią α -helisę (α -helisa III). Eksperymenty mutacyjne pokazały, że α -helisa III, obecna pomiędzy R(68)202 a R(75)209 i wchodząca w skład kasety T (3.3.2.), konieczna jest dla kooperatywnego wiązania RXRDBD do DR1 (Lee i wsp., 1993). Pierwszego wglądu w to, w jaki sposób RXR pośredniczy w heterodimerycznym wiązaniu innych receptorów jądrowych do DR, dostarczyła struktura krystaliczna kompleksu RXRDBD/TRDBD na DR4 (Rastinejad i wsp., 1995). Obie DBD umiejscowione są po tej samej stronie DNA w dużych bruzdach. Ich ułożenie jest podobne do zaobserwowanego dla GRDBD i ERDBD na odpowiednich HRE (3.3.3.1.).



Rys.3.12. Schemat elementów strukturalnych RXRDBD i TRDBD istotnych dla tworzenia heterodimeru na DR4.

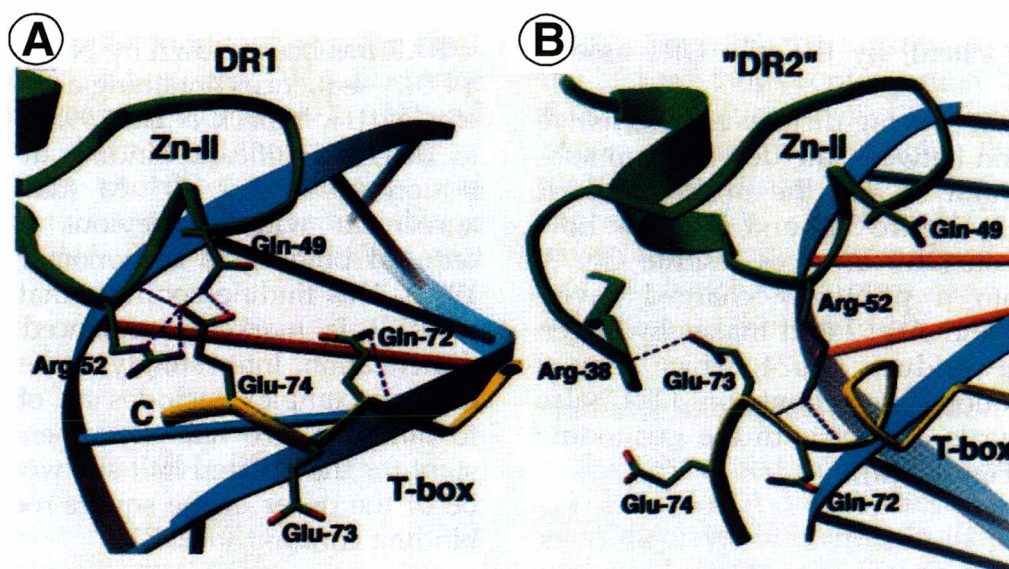
(A) Struktury pierwszorzędowe RXRDBD i TRDBD z zaznaczonymi resztami biorącymi udział w tworzeniu heterodimeru. Kolorem czerwonym opisano główne reszty oddziaływujące z DNA; gwiazdkami - tworzące kontakty z grupami funkcyjnymi pz DR4. Kolorem zielonym zaznaczono natomiast reszty odpowiedzialne za dimeryzację. (B) Sekwencja elementu DR4. (C) Szczegóły oddziaływań pomiędzy RXRDBD (kolor czerwony) a TRDBD (niebieski). Reszta Arg19 z TRDBD powinna być oznaczona R14. Według Rastinejad i wsp.(1995) oraz Rastinejad (2001).

Jednakże oba białka kontaktują się ze sobą wykorzystując różne fragmenty domen, co w konsekwencji sprawia, że ułożone są one względem siebie w konfiguracji „głowa do ogona”. W specyficznym rozpoznawaniu sekwencji DR4 i w tworzeniu kontaktów ze szkieletem fosforanowym DNA odpowiedzialne są, podobnie jak to ma miejsce w przypadku receptorów hormonów steroidowych, również α -helisy I z C-końców pierwszych modułów cynkowych (Rys.3.12.A) (Rastinejad i wsp., 1995). W utworzonym asymetrycznym kompleksie, α -helisa III z regionu kasety T RXRDBD nie jest widoczna, natomiast analogiczne reszty TRDBD (A66(169)-D73(173)) tworzą pętlę leżącą prostopadłe do osi DNA. Tuż za nią, pomiędzy resztą D74(177) a Q97(200), zaobserwowano dodatkową α -helisę o wyraźnie zasadowym charakterze łańcuchów bocznych, wchodzącą w skład kasety A, która oddalona jest od rdzenia TRDBD i ułożona w poprzek małej bruzdy DR4, gdzie tworzy liczne oddziaływania ze szkieletem fosforanowym DNA (Rys.3.12.A) (Rastinejad i wsp., 1995). Wchodząca w skład kasety A reszta K80(123) oddziałuje poprzez wiązania wodorowe z zasadami A(+1) i G(+3) 3'-końcowego półmiejscza DR4. Utworzona w ten sposób wydłużona płaszczyzna oddziaływań odgrywa ważną rolę w dyskryminacji sekwencji DR4 (Rys.3.12.B), gdyż stwarza, jak wspomniano wcześniej, sterczyną zawadę na elementach regulatorowych posiadających inną długość odstępnika oraz zwiększa liczbę kontaktów białko-DNA poza rdzeniem domeny (Rastinejad i wsp., 1995). Zaobserwowano, że α -helisy I rozpoznające DNA obu DBD (reszty 19-30) oddziałują z odpowiednimi półmiejscami DR4, tworząc bezpośrednie kontakty z zasadami oraz atomami tlenu szkieletu fosforanowego podobne do tych, które mają miejsce w strukturze ERDBD-DNA (Schwabe i wsp., 1993) (3.3.3.1.). Ważną rolę w przypadku wiązania TRDBD do półmiejscza 3'-końcowego odgrywa reszta R26(127), tworząca sieć wiązań wodorowych z dwiema centralnymi zasadami tego półmiejscza G(+3) i T(+4) (Rys.3.12.A i Rys.3.12.B). Co ciekawe, reszta ta jest zachowana w sekwencji większości receptorów jądrowych, poza receptorami hormonów steroidowych (Rastinejad i wsp., 1995). Jak zaobserwowano, podstawienie w pozycji R26 alaniny w przypadku TRDBD spowodowało około dwudziestokrotny spadek powinowactwa TRDBD (samego) do naturalnie występującego TRE (Nelson i wsp., 1993). Liczne i rozległe oddziaływania TRDBD zarówno z 3'-końcowym półmiejscem, jak i nukleotydami leżącymi w obrębie odstępnika, sprawiają, że TRDBD może wiązać się efektywnie z DNA również jako monomer, rozpoznając, prawdopodobnie poprzez reszty α -helisy kasety A, zasady oskrzydłające od strony 5' zgodną heksameryczną sekwencję (Perlmann i wsp., 1993; Katz i Koenig, 1993; Ikeda i wsp., 1994). Jak już wspomniano, region kasety A jest obszarem

oddziałującym z DNA również u receptorów sierocych wiążących się jako monomery lub homodimery do odpowiednich HRE (Wilson i wsp., 1991; Schwabe i wsp., 1993; Zhao i wsp., 1998; Meinke i Sigler, 1999) (3.3.2.).

Analiza struktur krystalicznych białek RXRDBD i TRDBD ujawniła, że w oddziaływaniach białko-białko biorą udział różne regiony tych receptorów. Asymetryczną powierzchnię dimeryzacyjną w RXRDBD tworzą: reszta R38(172), wchodząca w skład kasety D, oraz R48(182) i R52(186) z obszaru drugiego motywu cynkowego. R38(172) wraz z R48(182) kontaktują się poprzez mostki solne z D69(172) (kaseta T) i D-3(99) z regionu poprzedzającego pierwszy moduł cynkowy TRDBD (Rys.3.12.A i Rys.3.12.C) (Rastinejad i wsp., 1995). Reszta D69(172), wchodząca w skład α -helikalnego skrętu typu $3/_{10}$ z kasety T, pełni kluczową rolę w heterodimeryzacji z RXRDBD, wchodząc w skład bezpośredniej płaszczyzny oddziaływań. W RXRDBD reszty R48(182) oraz R52(186) znajdują się w regionie biorącym udział w tworzeniu symetrycznej powierzchni dimeryzacyjnej w ERDBD i GRDBD (Luisi i wsp., 1991; Schwabe i wsp., 1993; Rastinejad i wsp., 1995). R52(186) jest resztą przejawiającą zależność pomiędzy wiązaniem się do DNA a tworzeniem dimeru. Jak zaobserwowano, jest ona zaangażowana w formowanie stabilizujących dimer bezpośrednich wiązań wodorowych z resztą R14(115) TRDBD. Ponadto oddziałuje ona z Y11(112) TRDBD poprzez uporządkowane cząsteczki wody, kontaktując się z DNA w obrębie odstępnika elementu DR4 (Rastinejad i wsp., 1995). Reszty aminokwasowe RXRDBD otaczające R48(182), odpowiednio R50(180), N51(181) oraz Q54(188), tworzą wiązania wodorowe ze szkieletem fosforanowym DNA, umożliwiając tym samym odpowiednie ułożenie powierzchni dimeryzacyjnej RXRDBD w stosunku do partnera (Rys.3.12.A) (Rastinejad i wsp., 1995).

Struktura przestrzenna homodimeru RXRDBD na DR1 i DR2 (Zhao i wsp., 2000) pokazała, że homodimer RXRDBD wiąże się na tych elementach również w asymetryczny sposób „głowa do ogona”. W tworzenie powierzchni dimeryzacyjnej na obu typach DR zaangażowane jest CTE podjednostki wiążącej się do 3'-końcowego półmiejsca, oddziałujące z regionem drugiego modułu cynkowego 5'-podjednostki (Zhao i wsp., 2000). Reszta E74(208) wchodząca w skład kasety T 3'-podjednostki tworzy elektrostatyczne oddziaływania poprzez kontakt z dodatnio naładowaną „kieszenią” utworzoną przez reszty R38(172), R48(182), R52(186), Q49(183) i N51(185) regionu drugiego modułu cynkowego 5'-podjednostki (Rys.3.13.A).

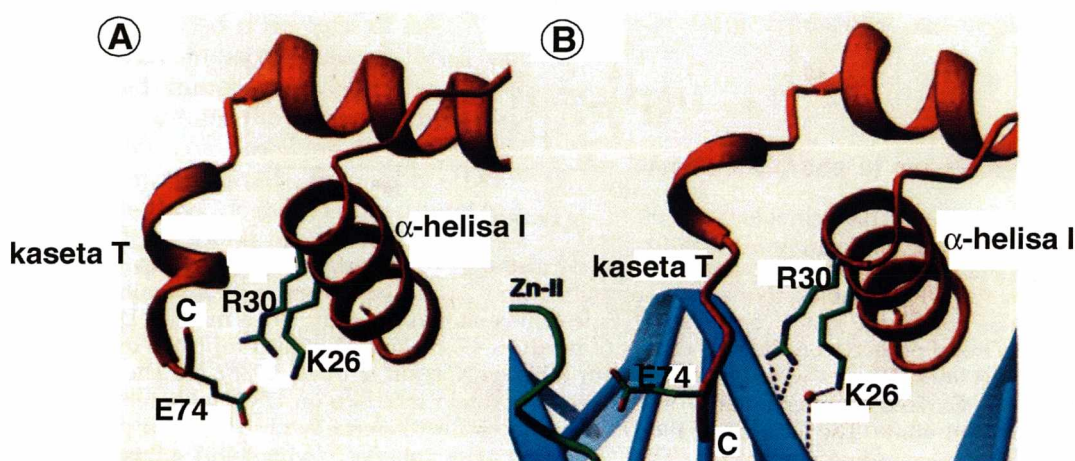


Rys.3.13. Powierzchnia dimeryzacyjna w homodimerze RXRDBD na DR1 i DR2.

Schemat oddziaływań pomiędzy podjednostkami homodimeru RXRDBD na DR1 (A) i DR2 (B). Więcej szczegółów w tekście. Według Zhao i wsp. (2000).

Reszta kwasu glutaminowego 74(208) z 3'-podjednostki tworzy bezpośrednie wiązania wodorowe z resztami R52(186) i Q49(183) 5'-podjednostki. Warto w tym miejscu nadmienić, że E74(208), R52(186) i Q49(183) są zachowane we wszystkich izotypach RXR, łącznie z jego homologiem białkiem Usp z *D. melanogaster* (Oro i wsp., 1990; Zhao i wsp., 2000). Sekwencja DR2 reprezentuje alternatywny w stosunku do DR1 obszar dla formowania dimerów RXRDBD w konfiguracji „głowa do ogona”. Jednakże zaobserwowano, że w tym przypadku E73(207) (z kasety T) tworzy wiązania wodorowe z dodatnio naładowaną „kieszenią” utworzoną przez R38(172) i R52(186) 5'-podjednostki (Rys.3.13.B). Interesujące jest, że reszta E74(208), odpowiedzialna za kluczowe wiązanie na DR1, kontaktuje się poprzez oddziaływania van der Waalsa z guanidylową grupą R38(172) (Rys.3.13.B). Warte podkreślenia jest to, że żaden z regionów kasety T RXRDBD nie jest α -helikalny, jak to zaobserwowano w strukturze RXRDBD w nieobecności DNA, wykorzystując spektroskopię NMR (Rys.3.14.A) (Holmbeck i wsp., 1998). Strukturalne przejście między α -helisą a pętlą w kasecie T, jak się wydaje, wzmacnia zdolność RXRDBD do oddziaływania z DNA w postaci dimeru (Zhao i wsp., 2000). Reszty R30(164) i K26(160) α -helisy I rozpoznającej DNA są zwrócone w kierunku E74(208) w niezwiązanej z DNA RXRDBD (Rys.3.14.A). Rozfaldowanie α -helisy kasety T, indukowane wiązaniem DNA, oddala łańcuch boczny

E74(208) i pozwala na oddziaływanie tych reszt z zasadami i grupami fosforanowymi DNA (Rys.3.14.B). Uzyskane analizy porównawcze sugerują, że kaseta T w konformacji helikalnej tworzy sterczyną i elektrostatyczną zawadę ze szkieletem fosforanowym *via* boczne atomy tlenu reszt E73(207) i E74(208). Stąd rozwinięcie α -helisy może usunąć tą uniemożliwiającą wiązanie DNA strukturę. Ponadto niewykluczone jest, że konformacja helikalna kasety T RXRDBD w nieobecności DNA może dodatkowo stabilizować białko (Holmbeck i wsp., 1998; Zhao i wsp., 2000).



Rys.3.14. Zmiany konformacyjne kasety T RXRDBD wyindukowane wiązaniem DNA.

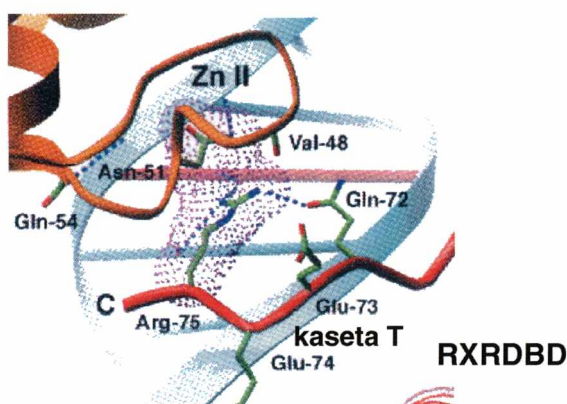
(A) Schemat struktury niezwiązanej z DNA monomeru RXRDBD, uzyskanej przy użyciu spektroskopii NMR (Holmbeck i wsp., 1998). (B) Fragment struktury 3'-podjednostki homodimeru RXRDBD związanej z 3'-koncowym półmiejscem DR1. Rozkładanie α -helisy kasety T RXRDBD, indukowane wiązaniem DNA, oddala łańcuch boczny reszty E74(208) i pozwala na oddziaływanie reszt R30(164) i K26(160), wchodzących w skład α -helisy I rozpoznającej DNA, z zasadami i grupami fosforanowymi DR1. Według Holmbeck i wsp. (1998) oraz Zhao i wsp. (2000).

W obu kompleksach RXRDBD na DR1 i DR2, reszty E19(153) i R27(161) wchodzące w skład α -helisy I rozpoznającej DNA, tworzą najbardziej rozległe i zachowane strukturalnie kontakty z półmiejscami elementu regulatorowego. W specyficznych oddziaływaniach z nukleotydami elementu regulatorowego uczestniczą także reszty K22(156) i K26(160), jednak kontakty jakie one tworzą są inne w przypadku każdego z półmiejsc (Zhao i wsp., 2000). Dodatkowo reszty R30(164), N51(185), R57(191), R27(161), Q54(188), Q72(206) i K11(145) zaangażowane są w stabilizację kompleksu na DNA poprzez oddziaływania ze szkieletem fosforanowym DNA.

Otrzymane wyniki potwierdzają sugestię, że zmiany konformacyjne powierzchni dimeryzacyjnej, indukowane wiązaniem DNA, są podstawą kooperatywnego formowania dimerów na DNA (Zhao i wsp., 2000). Ponadto, jak zaobserwowano, występowanie niewielkiej ilości kontaktów z półmiejscami sekwencji regulatorowej sugeruje, że RXR posiada bardziej „luźną” specyficzność rozpoznawania DR od innych receptorów jądrowych (Zhao i wsp., 2000).

W heterokompleksie RXRDBD/RARDBD na DR1 (Rastinejad i wsp., 2000) RXRDBD wiąże się preferencyjnie do 3'-końcowego półmiesca, natomiast RARDBD do półmiesca 5'-końcowego elementu DR1. Tworzy się w ten sposób asymetryczny kompleks o polarności 5'-RARDBD-RXRDBD-3' (Rastinejad i wsp., 2000). Obie podjednostki heterokompleksu oddziałują ze sobą w sposób zależny od DNA, używając kasety T RXRDBD i drugiego modułu cynkowego RARDBD w tworzeniu kompleksu na DR1. Wiązanie między E73(207) z kasety T RXRDBD a V48 RARDBD, w którym pośredniczą cząsteczki wody, stabilizuje strukturę kompleksu (Rys.3.15.) (Rastinejad i wsp., 2000).

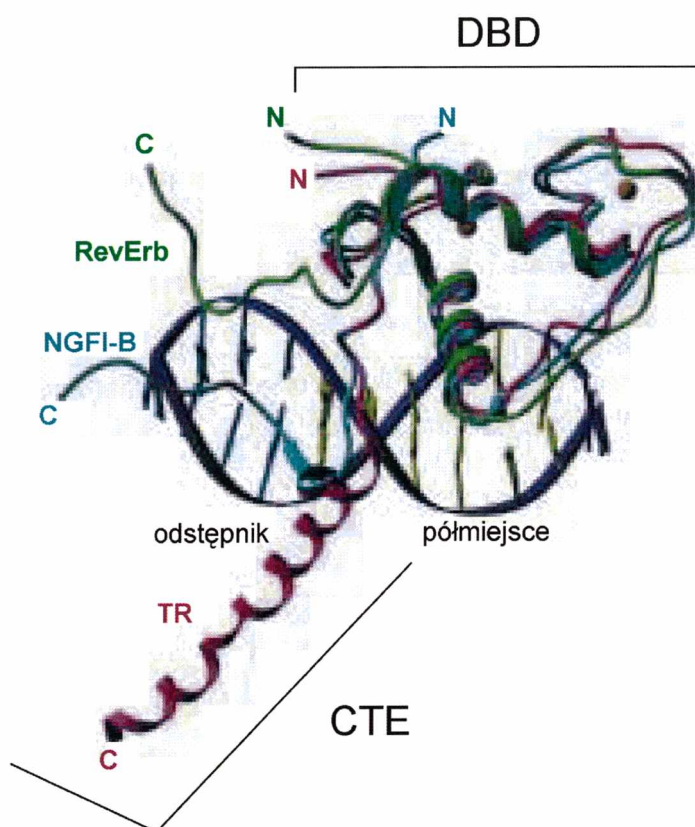
RARDBD



Rys.3.15. Schemat oddziaływań pomiędzy RARDBD a RXRDBD na DR1.

W heterokompleksie RXRDBD/RARDBD na DR1, RXRDBD wiąże się preferencyjnie do 3'-końcowego półmiesca, natomiast RARDBD do półmiesca 5'-końcowego elementu DR1, tworząc asymetryczny kompleks o konfiguracji „głowa do ogona”. W tworzenie powierzchni dimeryzacyjnej obu DBD zaangażowany jest drugi moduł cynkowy RARDBD (w szczególności reszty V48 i N51) i kasetę T RXRDBD (reszty Q72 i R75 oddziałują z parami zasad odstępnika). Wiązanie pomiędzy E73 z RXRDBD a V48 z RARDBD, w którym pośredniczą dwie cząsteczki wody, stabilizuje heterodimer. Według Rastinejad i wsp. (2000) oraz Rastinejad (2001).

Jak się wydaje, RXRDBD musi posiadać wiele różnorodnych powierzchni przystosowanych do różnych kombinacji oddziaływań z jednym lub wieloma partnerami (Rastinejad i wsp., 2000). Ponadto, wszystkie zaprezentowane powyżej struktury kompleksów na elementach zorganizowanych w postaci DR ujawniły, że DBD wiążące się do 5'-koncowego półmiejscu elementu wykorzystują reszty drugiego modułu cynkowego w tworzeniu płaszczyzny dimeryzacyjnej z partnerem. Partner związany do półmiejscu 3'-końcowego używa do tego celu sekwencji CTE, w szczególności reszt z regionu kasety T.



Rys.3.16. Różne funkcje CTE DBD umożliwiające tworzenie kompleksów receptorów na elementach regulatorowych.

Pomimo tego, że receptory jądrowe wykazują wysoką homologię sekwencji w obrębie dwóch modułów cynkowych, region CTE wykazuje bardzo małe strukturalne i sekwencyjne podobieństwa w nadrodzinie. Sekwencje CTE są różnie wykorzystywane przez receptory jądrowe. CTE TRDBD pozwala na różnicowanie elementów regulatorowych o odstępnikach różnej długości (Rastinejad i wsp., 1995), natomiast receptory sieroce wykorzystują CTE do rozpoznawania sekwencji oskrzydlaających od strony 5'-końca półmiejscu sekwencji regulatorowej. W przypadku RevErb, CTE oddziałuje z sekwencją 5'-AACT-3' bezpośrednio poprzedzającą sekwencję zgodną 5'-AGGTCA-3' (Zhao i wsp., 1998), natomiast NGFI-B rozpoznaje sekwencję 5'-AAA-3' (3.3.2.) (Meinke i Sigler, 1999). Według Khorasanizadeh i Rastinejad (2001).

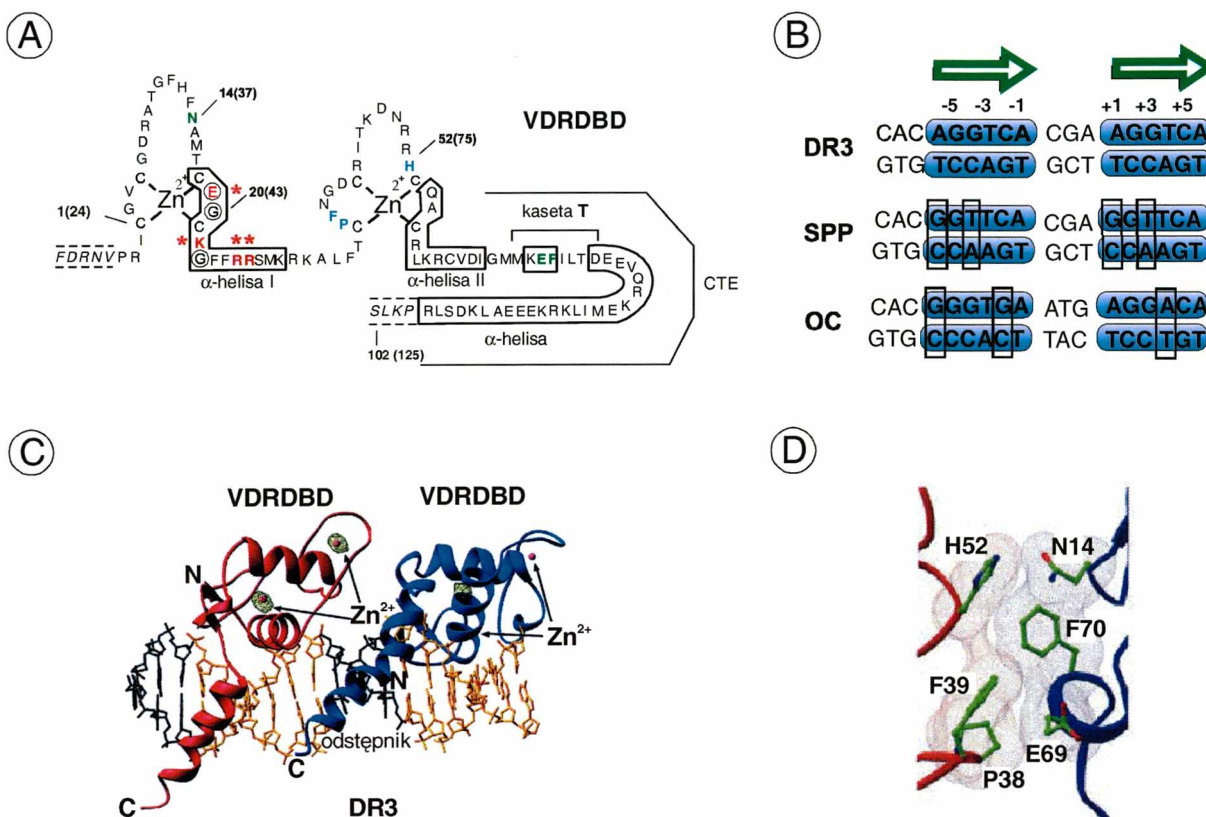
Co jest interesujące, w przeciwieństwie do rdzenia DBD, w CTE występują małe strukturalne i sekwencyjne podobieństwa w nadrodzinie receptorów jądrowych. Sugeruje to możliwość istnienia unikalnych powierzchni dimeryzacyjnej w tej części DBD (Zhao i wsp., 2000; Rastinejad i wsp., 2000; Khorasanizadeh i Rastinejad, 2001). Chociaż uzyskane struktury krystaliczne pokazały jak jest osiągana dimeryzacja RXRDBD z innymi partnerami na odpowiednich DR, to jednak eksperymenty te nie są w stanie do końca wyjaśnić, w jaki sposób niemożliwe jest tworzenie kompleksów na DR o nieodpowiedniej długości odstępników. Sugeruje się dwa mechanizmy, według których może zachodzić dyskryminacja niewłaściwych HRE. Po pierwsze, unikalne sekwencyjno-strukturalne właściwości CTE TRDBD, RevErbDBD, NGFI-B i innych receptorów jądrowych mogą działać jako steryczne ograniczniki uniemożliwiające wiązanie się heterodimerów z RXR do nieodpowiednich DR (Rys.3.16.) (Rastinejad i wsp., 1995; Meinke i Sigler, 1999; Zhao i wsp., 2000; Rastinejad i wsp., 2000). Po drugie, oddziaływania białko-białko mogą wzajemnie stabilizować tylko te elementy, gdzie związanie jednej podjednostki faworyzuje następnie werbowanie innej DBD, w wyniku utworzenia przez tą pierwszą komplementarnej płaszczyzny oddziaływania (Rastinejad i wsp., 2000).

3.3.3.3.1. Anizotropowa budowa homodimeru VDRDBD na naturalnie występujących sekwencjach typu bezpośrednie powtórzenie

Receptor VDR wiąże preferencyjnie elementy regulatorowe zorganizowane w postaci bezpośrednich powtórzeń sekwencji heksamerycznej, z odstępnikami pomiędzy półmiejscami długości 3 par zasad (DR3) głównie tworząc heterodimery z RXR (Toell i wsp., 2000), natomiast rzadko tworząc homodimery (Freedman i wsp., 1994; Takeshita i wsp., 2000). Do tej pory zidentyfikowano przynajmniej 19 przypuszczalnych VDRE (Toell i wsp., 2000), które w większości są, z kilkoma wyjątkami, typu DR3 różniącymi się w sekwencjach półmiejsc. Homodimer VDRDBD oraz heterodimer RXR/VDR wiążą VDRE ze zmiennym powinowactwem, co może mieć znaczenie w regulacji ekspresji genów będących pod ich kontrolą. Ze względu na różnice w powinowactwie VDR i VDRDBD, elementy VDRE podzielono na trzy grupy (Toell i wsp., 2000). Sekwencje DR z odstępnikami 4 i 6 par zasad (typ VDRE DR4 i DR6, odpowiednio), jak i również odwrócone palindromy z dziewięcionukleotydowym odstępnikiem (IP9) należą do wyjątków (Yamada i wsp., 2003).

Ostatnio uzyskano strukturę krystaliczną homodimeru VDRDBD związanego z następującymi naturalnymi sekwencjami VDRE typu DR3: sekwencją VDRE z promotora

mysiej osteopontyny (ang., *osteopontin*) (SPP), z promotora szczurzej osteokalcyny (ang., *osteocalcin*) (OC) oraz z kanoniczną zgodną sekwencją DR3 (Rys.3.17.B) (Shaffer i Gewirth, 2002). Hierarchia powinowactwa VDR do tych VDRE przedstawia się następująco: SPP>DR3>OC. Wszystkie trzy kompleksy VDRDBD-DNA wykazują identyczną architekturę. Każda podjednostka białkowa wiąże się do odpowiedniego półmiejscu VDRE tworząc homodimer o konfiguracji typowej dla asymetrycznych elementów DR - „głowa do ogona”. Na Rys.3.17.C przedstawiono schematycznie ogólną strukturę kompleksu VDRDBD z DR3. Jak zaobserwowano, globularne ufałdowanie VDRDBD jest prawie identyczne do TRDBD będącego w kompleksie z RXRDBD na DR4 (Rastinejad i wsp., 1995) (3.3.3.3.). W tworzenie płaszczyzny dimeryzacyjnej pomiędzy podjednostkami homodimeru zaangażowane są reszty: P38, F39 i H52 należące do 5'-podjednostki oraz reszty N14, E69 i F70 z 3'-podjednostki (Rys.3.17.A i Rys.3.17.D) (Shaffer i Gewirth, 2002). Te reszty aminokwasowe są niezmiennie wśród dziewięciu znanych VDR z różnych organizmów, natomiast ich rozmieszczenie w sekwencji DBD jest unikalne pośród receptorów jądrowych, co dodatkowo podkreśla wyjątkowość tej płaszczyzny oddziaływań (Shaffer i Gewirth, 2002). Rola wyżej wymienionych reszt w tworzeniu specyficznych oddziaływań pomiędzy DBD została potwierdzona licznymi badaniami biochemicznymi i eksperymentami mutagenety. Przykładowo, systematyczna mutagenety regionu CTE VDR pokazała, że reszta F70 z kasety T istotna jest dla wiązania białka do DR3 oraz IP9, tworzenia heterodimeru z RXR i aktywacji genu reporterowego *in vivo* (Quack i wsp., 1998). Trawienie chymotrypsyną kompleksu RXR/VDR na IP9, w porównaniu do analogicznego trawienia na DR3, pokazało, że CTE obu DBD nie kontaktuje się ze sobą na IP9, podczas gdy w przypadku DR3 dimeryzacja DBD stabilizuje heterokompleks (Quack i wsp., 1998). Sugeruje to, że heterodimer RXR/VDR posiada różne stany konformacyjne, kiedy jest związany z odpowiednimi VDRE (Quack i wsp., 1998). Oznaczać to może, że w kompleksie na IP reszty kasety T mogą znajdować się w krytycznej pozycji dla ukierunkowanej orientacji α -helisy regionu zawiasowego, który wydaje się być sztywny i odpowiednio nastawiać LBD po drugiej stronie DNA. W ten sposób LBD obu białek tworzą płaszczyznę dimeryzacyjną (Quack i wsp., 1998). Ponadto jak zaobserwowano, mutacje punktowe w pozycjach N14, F39, H52 i F70, należących do rdzenia płaszczyzny dimeryzacyjnej w VDRDBD, zniosły kooperatywne wiązanie DR3 (Towers i wsp., 1993).



Rys.3.17. Schemat elementów strukturalnych VDRDBD ważnych dla homodimeryzacji na elementach VDRE.

(A) Schemat struktury pierwszorzędowej VDRDBD. Kolorem czerwonym i gwiazdkami zaznaczono reszty α -helisy I oddziałujące specyficznie z parami zasad VDRE. Kolorami niebieskim i zielonym opisano reszty odpowiedzialne za tworzenie płaszczyzny dimeryzacyjnej pomiędzy podjednostkami homodimeru; niebieskim - reszty z podjednostki wiążącej się z 5'-końcowym półmiejscem VDRE, natomiast zielonym - reszty z 3'-podjednostki. (B) Sekwencje VDRE użyte do krystalizacji. Ramkami objęto pary zasad różniące się od sekwencji zgodnej DR3. (C) Ogólna geometria homodimeru VDRDBD związanego z DR3. Kolorem czerwonym zaznaczono 5'-podjednostkę, natomiast niebieskim 3'-podjednostkę homodimeru. (D) Szczegóły oddziaływań pomiędzy DBD. W tworzenie płaszczyzny dimeryzacyjnej pomiędzy podjednostkami homodimeru zaangażowane są reszty: P38, F39 i H52 należące do 5'-podjednostki oraz reszty N14, E69 i F70 z 3'-podjednostki. Więcej szczegółów w tekście. Według Shaffer i Gewirth (2002) oraz Shaffer i wsp. (2004).

Interesujące jest, że płaszczyzna oddziaływań pomiędzy podjednostkami homodimeru ma charakter hydrofobowy (Shaffer i Gewirth, 2002). Z wyjątkiem jednego słabego wiązania wodorowego pomiędzy H52 i N14, dominujące są kontakty van der Waalsa, tworzące wyrównaną komplementarną płaszczyznę (Rys.3.17.D). Wydaje się, że brak kontaktu powierzchni dimeryzacyjnej z polarnym rozpuszczalnikiem, silnie wpływa na stabilizację dimeru (Shaffer i Gewirth, 2002). Brak międzycząsteczkowych wiązań wodorowych w obrębie tej płaszczyzny, jej hydrofobowy charakter oraz brak dodatkowych stabilizujących kontaktów z DNA reszt odpowiedzialnych za dimeryzację wyraźnie odróżnia

homodimer VDRDBD od innych homo- i heterodimerów receptorów jądrowych, takich jak np. GRDBD/GRDBD, RAR/RXR czy RXR/TR (3.3.3.1.) (3.3.3.3.).

Region CTE VDRDBD wykazuje uderzające podobieństwo do CTE TRDBD (Rastinejad i wsp., 1995). Oba obszary zaczynają się tuż za rdzeniem DBD, tworzą krótki skręt helikalny typu $3/10$ w regionie kasety T, a następnie kończą się długą α -helisą (porównaj Rys.3.12.A (3.3.3.3.) z Rys.3.17.A). Sugeruje to, że mechanizm dyskryminacji odstępnika może być podobny do zaobserwowanego dla TRDBD (Rastinejad i wsp., 1995; Shaffer i Gewirth, 2002). Warto podkreślić, że CTE VDRDBD nie przypomina struktury i ułożenia na DNA CTE RevErbDBD (Rys.3.16. (3.3.3.3.)). Jest to jednakże zgodne ze specyfiką rozpoznawania przez CTE RevErbDBD sekwencji oskrzydłającej półmiejsce elementu regulatorowego i sposobem wiązania się do DNA monomerów receptorów sierocych (3.3.2.). Takiej specyficzności rozpoznawania sekwencji nie stwierdzono jak dotąd dla VDR (Shaffer i Gewirth, 2002). Pomimo bliskiej homologii strukturalnej CTE VDRDBD z analogicznym obszarem w TRDBD, region C-końcowego wydłużenia DBD VDR różni się znaczącą ilością kontaktów tworzonych z DNA: CTE TRDBD kontaktuje się z DNA poprzez 15 wiązań wodorowych, w których pośredniczą cząsteczki wody (Rastinejad i wsp., 1995), natomiast w przypadku CTE VDRDBD posiadającego podobną ilość naładowanych zasadowych reszt, zaobserwowano tylko dwa takie oddziaływania (Shaffer i Gewirth, 2002). Sugeruje to, że nadrzędną rolą CTE VDRDBD jest pośredniczenie w dyskryminacji odstępnika w DR3, a nie dostarczanie dodatkowych powierzchni kontaktu z DNA (Shaffer i Gewirth, 2002). Ponadto, jak się uważa, może to być związane z tym, że VDRDBD wiąże się do DR3 jako homodimer, podczas gdy TRDBD tworzy na DR4 heterodimer z RXRDBD, który nie posiada tak długiego regionu CTE (Yamada i wsp., 2003).

Rdzenie DBD wszystkich poznanych receptorów jądrowych wiążą zgodne półmiejsce elementu regulatorowego w prawie identyczny sposób. Tym samym, kluczowe oddziaływania pomiędzy VDRDBD a półmiejscami HRE są podobne do obserwowanych dla innych kompleksów DBD/DNA (3.3.3.1. i 3.3.3.3.) (Shaffer i Gewirth, 2002). Cztery zachowane w toku ewolucji reszty z α -helisy I każdej podjednostki homodimeru, E19, K22, R26 i R27, tworzą specyficzne kontakty z zasadami i szkieletem DNA półmiejsca ulokowanego w dużej bruzdzie (Rys.3.17.A), zbliżone do oddziaływań RXR (Rastinejad i wsp., 1995; Rastinejad i wsp., 2000), RAR (Rastinejad i wsp., 2000) i TR (Rastinejad i wsp., 1995) z właściwymi elementami regulatorowymi. Nie zaobserwowano znaczących różnic w ogólnej geometrii uzyskanych trzech kompleksów VDRDBD na odpowiednich VDRE. Jednakże dokładne analizy struktur krystalicznych ujawniły molekularne podstawy sekwencyjno-specyficznej

zmienności w powinowactwie VDR do tych trzech VDRE typu DR3 (SPP, DR3 i OC, odpowiednio) (Toell i wsp., 2000; Shaffer i Gewirth, 2002). Przykładowo, podstawienie pary T:A (pozycje (-4) i (+3)) w elemencie SPP na G:C (pozycje (-4) i (+3)) w DR3 (Rys.3.17.B.) bardziej faworyzuje oddziaływanie VDRDBD/SPP. W szczególności podstawienie większej zasady purynowej (A) mniejszą zasadą pirymidynową (C) w tych pozycjach, przejawia się w tworzeniu dodatkowych wiązań wodorowych z udziałem cząsteczek wody przez resztę E19, co zwiększa stabilność kompleksu VDRDBD/SPP (Shaffer i Gewirth, 2002). W przeciwieństwie do tego, kluczowym elementem, który powoduje znaczące obniżenie powinowactwa homodimeru VDRDBD do OC, okazała się być pozycja (-2) w 5'-koncowym niezachowanym półmiejscu tego elementu (5'-GGGTGA-3') (Rys.3.17.B.). We wszystkich sekwencjach HRE charakteryzujących się wysokim powinowactwem, w tej pozycji występuje para C:G (pierwsza jest wymieniona zasada nici kodującej - nici „górnej”) i G z tej pary jest akceptorem jednego lub dwóch silnych wiązań wodorowych pochodzących od atomów azotu grupy guanidylowej reszty R27 (Rys.3.17.A i Rys.3.17.B). Jednakże w 5'-końcowym półmiejscu OC para C:G (pozycja (-2)) jest zastąpiona parą G:C (Rys.3.17.B). Cytosyna z tej pary nie posiada akceptorów wiązań wodorowych, więc nie może oddziaływać z R27. Warto ponadto zaznaczyć, że chociaż łańcuch boczny reszty R27 uległ reorientacji w kierunku szkieletu fosforanowego, analizy pomiarów różnic odległości pokazały brak znaczącej zmiany położenia szkieletu białka w stosunku do szkieletu DNA, w porównaniu z kompleksami na DR3 i SPP. Oznaczać to może, że wyłącznie utrata specyficznego kontaktu z zasadą w pozycji (-2) jest przyczyną obniżenia powinowactwa VDR do OC (Shaffer i Gewirth, 2002).

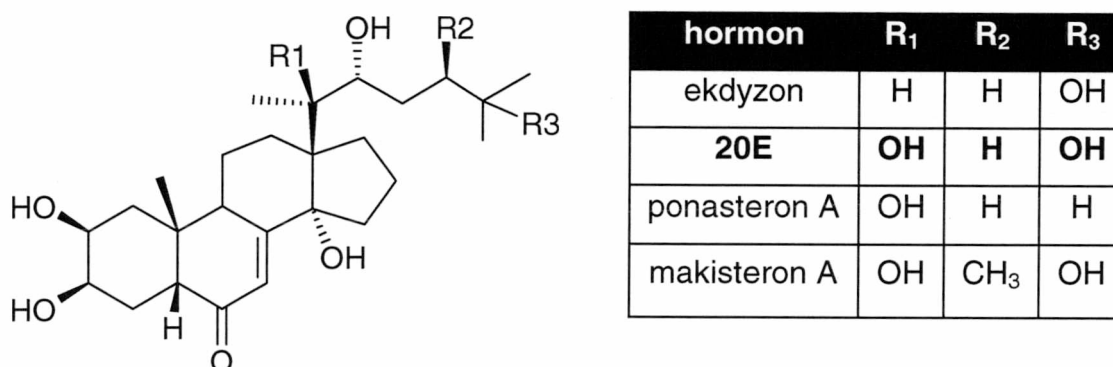
Uzyskane struktury krystaliczne homodimerów VDRDBD na odpowiednich VDRE podkreśliły po raz kolejny istotną rolę sekwencji CTE, w szczególności kasety T, w dimeryzacji i wiązaniu elementów regulatorowych zorganizowanych w postaci DR.

3.4. FUNKCJONALNY RECEPTOR EKDYSTEROIDOWY

3.4.1. Metamorfoza owadów - rola 20-hidroksyekdyzonu i hormonu juvenilnego

Metamorfoza owadów jest fascynującym procesem podczas którego larwa, przekształca się w dojrzałego owada. Proces ten przebiega pod kontrolą hormonów (Riddiford, 1993; Hall,

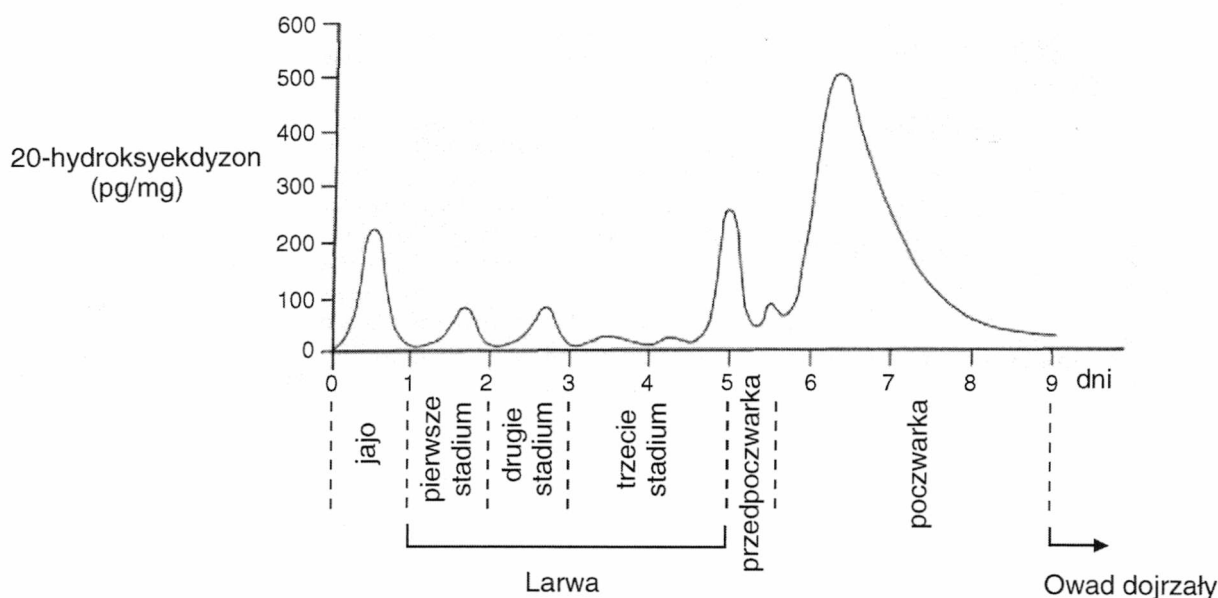
1999). W 1954 roku Butenandt i Karlson wyizolowali po raz pierwszy owadzi hormon linienia ekdyzon (Rys.3.18.) z poczwarek jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*). Był to pierwszy hormon steroidowy otrzymany z bezkręgowców. Ekdyzon jest klasycznym steroidem, posiadającym cztery skondensowane pierścienie (Rys.3.18.) (Koolman, 1990).



Rys.3.18. Ekdysteroidy pełniące hormonalne funkcje u stawonogów (Koolman, 1990; Lafont, 1997). Według Niedziela-Majka (1999) oraz Grad (2001).

Ekdysteroidy, pochodne ekdyzonu, stanowią grupę ponad 250 cząsteczek, które mogą występować w komórkach roślinnych, u większości bezkręgowców i w śladowych ilościach u ssaków (Lafont i Dinan, 1997). Pierścienie A i B połączone są wiązaniem o konformacji *cis*, co stanowi o różnej w stosunku do steroidów kręgowców strukturze przestrzennej czteropierścieniowego rdzenia, do którego dołączony jest łańcuch boczny. Obecność podwójnego wiązania w pozycji 7-8 oraz atomu tlenu grupy ketonowej w pozycji 6 jest charakterystyczną cechą ekdysteroidów. Co więcej, ekdyzon posiada ponadto charakterystyczną resztę 14- α -OH (Rys.3.18.) (Koolman, 1990). Hormon ten jest syntetyzowany z cholesterolu przez gruczoły protorakalne, w których wydaje się funkcjonować zegar biologiczny, regulujący wydzielanie ekdyzonu w rytmie dobowym (Cymborowski, 1984). Aktywną formą hormonu jest 20-hydroksyekdyzon (20E), będący hydroksylovaną pochodną ekdyzonu. Pełni on kluczową rolę w indukcji i modulacji przemian morfogenetycznych owadów (Koolman, 1990). Linienie i metamorfoza regulowane są przez dwa współdziałające ze sobą hormony: 20E i hormon juwenilny (Cymborowski, 1984). Zmiany morfogenetyczne u *Drosophila melanogaster* przebiegają w ciągu dziewięciu dni i składają się z sześciu stadiów: embrionalnego, trzech larwalnych, przedpoczwarki, poczwarki i owada dorosłego (Rys.3.19.) (Andres i Thummel, 1992). Zmiany stężenia 20E

powodują „przechodzenie” organizmu owada przez kolejne stadia życiowe. Podczas każdego stadium można zaobserwować co najmniej jeden „szczyt” stężenia 20E (Thummel, 1995). 20E reguluje wiele procesów fizjologicznych i biochemicznych związanych z metamorfozą. Najbardziej krytycznym okresem jest koniec trzeciego stadium larwalnego, kiedy to wysokie stężenie 20E inicjuje zakończenie fazy wędrowania i stanowi sygnał do formowania kokonu i rozpoczęcia metamorfozy (Rys.3.19.). 20E bierze udział w regulacji i inicjacji wielu procesów fizjologicznych i biochemicznych związanych z linieniem, na przykład apolizy, proliferacji komórek naskórka, sekrecji nowej warstwy kutikuli, trawieniu starej i sklerotyzacji nowej kutikuli (Cymborowski, 1984; Koolman, 1990). Odpowiada on zarówno za apoptozę tkanek larwalnych (Jiang i wsp., 1997), jak i za wykształcenie i różnicowanie tkanek owada dorosłego.



Rys.3.19. Profil zmian stężenia ekdysteroidów podczas metamorfozy *D. melanogaster*.

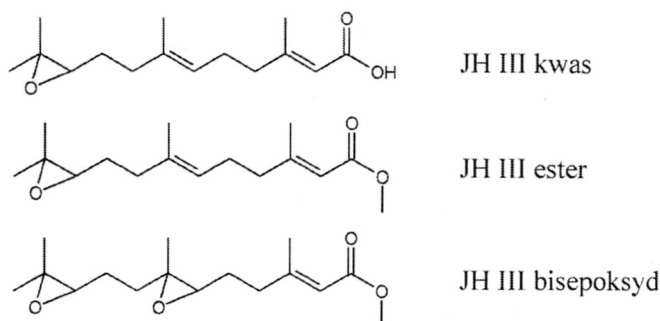
Schemat przedstawia łączne stężenie ekdysteroidów (wyrażone w ekwiwalentach 20E) w homogenacie całego ciała. Pod skalą czasową (wyrażoną w dniach) zaznaczono poszczególne stadia w cyklu rozwojowym *D. melanogaster*. Podczas rozwoju *D. melanogaster* można zaobserwować przynajmniej sześć szczytów stężenia 20E, po jednym na każde ze stadiów. W dwóch pierwszych stadiach larwalnych wzrost stężenia inicjuje linienie starej kutikuli. W trzecim stadium stężenie 20E jest początkowo niskie. W drugiej połowie tego okresu larwa przestaje się odżywiać i rozpoczyna wędrówkę w poszukiwaniu stałego podłoża do przepoczwarczenia. Pojawienie się wysokiego stężenia 20E przy końcu trzeciego stadium jest sygnałem do zakończenia fazy wędrowania, wyprodukowania kokonu i początku metamorfozy. Szczyt stężenia 20E występuje przed utworzeniem przytwierdzonej do podłoża przedpoczwarki, następnie spada do niskich wartości. Dwanaście godzin później stężenie 20E osiąga ponownie wartość maksymalną, powodując uwypuklenie głowy. Kolejny wzrost stężenia 20E występuje podczas stadium poczwarki. W procesie metamorfozy prawie wszystkie tkanki larwalne

ulegają histolizie, natomiast struktury dorosłego owada różnicują się i ulegają morfogenezie. Według Andres i Thummel (1992); Thummel (1995); Baehrecke (1996) oraz Kozlova i Thummel (2000). Na podstawie Niedziela-Majka (1999).

Odpowiedź komórkowa na 20E jest specyficzna w stosunku do różnych tkanek owada, a także w czasie poszczególnych stadiów rozwoju. Specyficzna regulacja ekspresji genów wynika również ze złożonego mechanizmu wzajemnych oddziaływań białek regulatorowych pojawiających się w poszczególnych etapach rozwoju owada. W procesie metamorfozy prawie wszystkie tkanki larwalne ulegają histolizie, natomiast struktury osobnika dorosłego różnicują się i ulegają w kolejnym etapie morfogenezie (Andres i Thummel, 1992; Thummel, 1996). Przeprowadzone na chromosomach politenicznych ślinianek badania ujawniły utworzone pod wpływem 20E charakterystyczne struktury zwane „pufami” (ang., *puffs*) (Ashburner i wsp., 1974). Były to obszary wykazujące aktywność transkrypcyjną. Bezpośrednia obserwacja pod mikroskopem tych zmian umożliwiła przyporządkowanie zmiany ekspresji genów w czasie rozwoju profilowi powstawania i zanikania specyficznych pufów (Andres i Thummel, 1992). Ashburner i wsp. (1974) zaproponowali dwustopniowy mechanizm działania 20E. Według tego modelu, 20E poprzez swój receptor (heterodimer Usp/EcR, patrz 3.4.2.) aktywuje ekspresję tzw. genów „wczesnych” (ang. *early response genes*), które indukują następnie ekspresję tzw. genów „późnych” (ang. *late response genes*). Ekspresja genów „wczesnych” zostaje jednocześnie zachamowana (Andres i wsp., 1993; Woodard i wsp., 1994; Thummel, 1996). Późniejsze badania doprowadziły do poszerzenia modelu zaproponowanego przez Ashburnera (Crossgrove i wsp., 1996; Thummel, 1996; Buszczak i Segreaves, 2000). Za pośrednictwem białka DHR78 (ang., *Drosophila hormone receptor 78*) następuje przygotowanie do przepoczwarczenia podczas trzeciego stadium larwalnego (Hall, 1999). DHR78 bierze udział w kontroli ekspresji m.in. tzw. „genów klejowych” (ang., *glue genes*). Podwyższenie stężenia 20E pod koniec trzeciego stadium larwalnego i stadium przedpoczwarki indukuje, za pośrednictwem heterodimeru Usp/EcR, ekspresję genów „wczesnych”. Produkty genów „wczesnych” hamują z kolei swoją własną ekspresję, indukując jednocześnie ekspresję genów „późnych” (Karim i wsp., 1993; Thummel, 1995). Podczas stadium przedpoczwarki ma miejsce ekspresja receptora sierociego β FTZ-F1. Związane jest to ze spadkiem stężenia 20E (Woodard i wsp., 1994). Receptor β FTZ-F1 odpowiedzialny jest za kontrolę ekspresji genów w tym okresie (Woodard i wsp., 1994; Broadus i wsp., 1999). Metamorfoza związana z przejściem formy larwalnej w owada dojrzałego jest związana z wytworzeniem tkanek i organów owada dorosłego oraz lizą tkanek

larwalnych. W indukcji apoptozy bierze udział 20E poprzez regulację trzech klas genów apoptotycznych: aktywatorów, efektorów i inhibitorów apoptozy (Baehrecke i Thummel, 1995; Lee i wsp., 2000; Buszczak i Segraves, 2000). Apoptoza związana jest z aktywnością proteaz cysteinowych, zwanych kaspazami, które utrzymywane są w formie nieaktywnej poprzez związanie z białkowymi inhibitorami apoptozy (Vernooy i wsp., 2000). Następnie ekspresja genów proapoptotycznych powoduje uwolnienie proteaz z nieaktywnego kompleksu (Hay i wsp., 1995; Vernooy i wsp., 2000). Kaspazy rozpoczynają następnie proteolizę szeregu białek komórkowych oraz aktywują dodatkowe białka proapoptotyczne (Goyal i wsp., 2000; Lisi i wsp., 2000). Jak zaobserwowano, wzrost stężenia 20E w późnym stadium przedpoczwarki łącznie z ekspresjonowanym β FTZ-F1 włącza program śmierci komórki (Jiang i wsp., 2000; Lee i wsp., 2000; Buszczak i Segraves, 2000).

W procesach regulacyjnych z 20E ściśle współdziała hormon juwenilny (JH). JH reguluje embriogenezę, wpływa na stymulację procesów związanych z reprodukcją i zachowaniem migracyjnym (Kumaran, 1990). W stadiach larwalnych może promować procesy metaboliczne związane ze wzrostem, natomiast jego obecność w czasie linienia indukowanego 20E hamuje rozwój progresywny, pozwalając owadowi jedynie na przejście z jednego stadium larwalnego w drugie (Cymborowski, 1984; Kozlova Thummel, 2000). Podobnie jak w przypadku 20E, o aktywności biologicznej JH decyduje jego poziom w hemolimfie owada (Cymborowski, 1984). Stąd, gdy w czasie ostatniego stadium larwalnego ilość JH w hemolimfie zanika, niskie stężenie 20E inicjuje metamorfozę (Cymborowski, 1984). Stężenia JH w czasie metamorfozy są niskie i chociaż jego obecność ma wpływ na procesy zachodzące w organizmie (Riddiford i Ashburner, 1991), to biologiczna funkcja JH podczas tego procesu nie jest do końca poznana (Hall, 1999). W procesach regulacyjnych hormon juwenilny wywiera efekt antagonistyczny w stosunku do 20E, wpływając na zahamowanie inicjacji metamorfozy (Andres i Thummel, 1992). Potwierdzeniem tej roli jest zahamowanie inicjacji metamorfozy w przypadku podania JH owadowi w stadium przedpoczwarki i poczwarki (Riddiford i Ashburner, 1991). Dotychczas nie zidentyfikowano receptora jądrowego dla JH. Sugeruje się, że JH może być ligandem receptora sierociego Usp (Jones i Sharp, 1997). Badania biochemiczne pokazały wprawdzie, że Usp jest w stanie wiązać JH III ester i JH III kwas (Rys.3.20.), jednakże to wiązanie jest na tyle słabe (stała dysocjacji rzędu mikromolarnego) i niewysycające, że wymaga to dalszych badań (Jones i Sharp, 1997). Co więcej, inne eksperymenty wskazują na to, że Usp wiąże też bisepoksyd JH III (Richard i wsp., 1989).



Rys.3.20. Przypuszczalne ligandy białka Usp - trzy formy JH.

Na schemacie zaprezentowano wzory chemiczne hormonu juwenilnego (ester JH III) oraz jego dwóch pochodnych (JH III kwas i JH III bisepoksyd), związków występujących w hemolimfie *D. melanogaster* (Bergot i wsp., 1981; Tobe i Feyereisen, 1983; Richard i wsp., 1989). Sugeruje się, że związki te mogą być ligandami białka Usp (Jones i Sharp, 1997; Jones i Jones, 2000).

Szczegółowa analiza fenotypów mutantów genu *usp* sugeruje, iż Usp uczestniczy w szlaku przekazywania sygnału od JH, jednakże nie wiadomo czy w sposób bezpośredni (Hall, 1999). Przeprowadzone analizy struktury krystalicznej UspLBD *D. melanogaster* (Clayton i wsp., 2001) wskazują wprawdzie, że w LBD istnieją zachowane w toku ewolucji reszty tworzące kieszeń wiążącą lipidowy ligand, którego struktura chemiczna może odpowiadać JH. Jednakże wyniki te, łącznie z innymi analizami strukturalnymi (Jones i Jones, 2000), są na tyle kontrowersyjne, że pytanie, czy Usp jest receptorem JH pozostaje wciąż otwarte.

3.4.2. Funkcjonalny receptor 20-hydroksyekdyzonu jest heterodimerem białek Usp i EcR

Funkcjonalny receptor owadziego hormonu 20-hydroksyekdyzonu jest heterodimerem dwóch białek należących do nadrodziny receptorów jądrowych: receptora 20E (EcR) oraz białka Ultraspiracle (Usp) (Oro i wsp., 1990; Koelle i wsp., 1991; Yao i wsp., 1993). Po raz pierwszy receptor 20E zidentyfikowano w ekstraktach komórkowych obserwując wiązanie ponasteronu A (Rys.3.18.) (Maroy i wsp., 1978). Gen *EcR* z *D. melanogaster* odkryto podczas eksperymentów transfekcji w liniach komórkowych, mających na celu zidentyfikowanie białek należących do rodziny receptorów jądrowych (Koelle i wsp., 1991). Eksperymenty pokazały, że EcR obecny w ekstrakcie komórkowym wiąże z dużym powinowactwem analog 20E. Jak się okazało, w przenoszeniu sygnału pochodzącego od 20E uczestniczy również drugie białko, homolog RXR kręgowców, będące produktem genu

ultraspiracle - Usp [NR2B4] (Oro i wsp., 1990; Koelle i wsp., 1991; Yao i wsp., 1992; Yao i wsp., 1993; Thomas i wsp., 1993). Jak zaobserwowano, EcR może tworzyć heterodimery z RXR (Thomas i wsp., 1993; Yao i wsp., 1993). Ssaczym homologiem EcR z *D. melanogaster* jest receptor aktywowany pochodnymi farnesolu (FXR, ang., *farnesoid X - activated receptor*), z którym posiada 81% oraz 34% identycznych reszt, odpowiednio w DBD i LBD (Forman i wsp., 1995). Do tej pory u *D. melanogaster* zidentyfikowano jeden gen *EcR* kodujący trzy izoformy, oznaczone jako EcR-A, EcR-B1 i EcR-B2 (Talbot i wsp., 1993). Wszystkie trzy izoformy posiadają identyczne DBD i LBD. Różnią się one jednak w sekwencjach N-końcowych, obejmujących domeny A/B. Izoforma EcR-A ekspresjonowana jest w rozwijających się tkankach owada dorosłego, natomiast izoforma EcR-B1 w tkankach larwalnych, które podczas metamorfozy ulegają histolizie (Talbot i wsp., 1993). Powyższe zróżnicowane wzorce ekspresji sugerują, iż różne izoformy EcR mogą brać udział w regulowaniu działań 20E podczas metamorfozy u *D. melanogaster* (Hall, 1999). Wszystkie izoformy EcR mogą tworzyć heterodimery z Usp na EcRE (Yao i wsp., 1992). Przeprowadzone ostatnio eksperymenty aktywacji transkrypcji genu reporterowego w komórkach ssaczych i drożdżowych z użyciem izolowanych domen A/B izoform EcR pokazały, że regiony te mogą być oddzielone od reszty receptora i przyłączone do obcej DBD bez utraty funkcji (Mouillet i wsp., 2001). Ponadto stwierdzono, że funkcja represorowa (IF, ang., *inhibitory function*) EcR-A[A/B] oraz funkcje aktywacyjne (AF-1) w EcR-B1[A/B] i EcR-B2[A/B] zidentyfikowane w tych regionach są wysoce autonomiczne (Mouillet i wsp., 2001). Jednakże molekularny model działania tych aktywności i ich wpływ na biologiczne funkcje izoform EcR *in vivo* pozostają nadal nierozstrzygnięte (Mouillet i wsp., 2001). Jak dotąd gen *EcR* znaleziono wyłącznie u stawonogów. Genom nicienia *C. elegans* pozbawiony jest homologu EcR, chociaż opisano efekty działania ekdysteroidów u nicieni (Sluder i wsp., 1999; Sluder i Maina, 2001). Wiadomo, że mogą one wywoływać linienie oraz wpływać na inne procesy rozwojowe (Dennis, 1976; Fleming, 1985; Barker i wsp., 1990; Barker i wsp., 1991; Warbrick i wsp., 1993). Warto jednak zaznaczyć, że sekwencje genów niektórych receptorów jądrowych u pewnych przedstawicieli nicieni wykazują motywy zbliżone do sekwencji poznanych członków nadrodziny receptorów jądrowych kręgowców i bezkręgowców (ortologi i paralogi) (Sluder i Maina, 2001). EcR jest receptorem zarówno 20E jak i innych ekdysteroidów (Koelle i wsp., 1991). Z tego względu jest on celem poszukiwania nowych generacji insektycydów, które mogłyby powodować nieprawidłową metamorfozę owadów poprzez aktywację odpowiedzi na hormon (Retnakaran i wsp., 2003). Analogi ekdysteroidów zidentyfikowano również u roślin (fitoekdysteroidy), co może znaleźć

potencjalne zastosowanie w agrochemii i medycynie (Dinan i wsp., 2001). Uzyskane ostatnio struktury krystaliczne heterodimeru domen ligandowych Usp i EcR z *Heliothis virescens* (Billas i wsp., 2003) w kompleksie z ponasteronem A oraz niesteroidowym agonistą (związkiem używanym w agrochemii pestycydów) ujawniła, że EcRLBD wykazuje zadziwiającą plastyczność. Cecha ta pozwala jej na dostosowanie kształtu kieszeni wiążącej ligand do struktury dwóch odmiennych związków. Powyższe wnioski potwierdzają wyniki innych eksperymentów biochemicznych (Wang i wsp., 2000; Kumar i wsp., 2002). Co więcej, ostatnio doniesiono, że podstawienie pojedynczej reszty w wyniku wprowadzenia mutacji punktowej w EcRLBD z *Christoneura fumiferana* spowodowało całkowitą dyskryminację aktywności niesteroidowych ligandów należących do różnych chemotypów (Kumar i wsp., 2004). Plastyczność jaką wykazuje EcRLBD, w połączeniu ze specyficznością rozpoznawania sekwencji regulatorowych DNA, może być wykorzystana w przyszłości jako narzędzie do konstruowania przełączników molekularnych genów w nowoczesnych terapiach genowych (Kumar i wsp., 2004).

Jak już wspomniano, wiązanie liganda przez EcR i aktywacja genów będących pod kontrolą 20E stymulowane są przez tworzenie heterodimeru z Usp (Oro i wsp., 1990; Koelle i wsp., 1991; Yao i wsp., 1993). Usp jest w stanie tworzyć inne heterodimery z różnymi białkami, przykładowo z homologiem NGFI-B, owadziim receptorem sierocym DHR38 (ang., *Drosophila hormone receptor*) (Sutherland i wsp., 1995). Z uwagi na bardzo wysoką homologię z ssaczym RXR (86% i 49% identyczności reszt aminokwasowych odpowiednio w DBD i LBD) (Oro i wsp., 1990) wydaje się, że Usp pełni zbliżone funkcje fizjologiczne u owadów jak RXR u ssaków. Co jest interesujące, homologi obu białek zidentyfikowano w sekwencjach genów niektórych nicieni (Sluder i Maina, 2001). Jednakże dopiero ostatnio scharakteryzowano po raz pierwszy homolog RXR z chorobotwórczego nicienia *Dirofilaria immitis*, białko Di-RXR-1 (Shea i wsp., 2004). Pokazano, że robaczy Di-RXR-1 może funkcjonować jako partner dla owadziich EcR i DHR38 oraz regulować transkrypcję genu regulatorowego w transfekowanych komórkach owadziich *Schneidera* S2 w sposób zależny od 20E (Shea i wsp., 2004).

Białko Usp nadal zalicza się do grupy receptorów sierocych. Jednakże na podstawie analiz otrzymanych struktur krystalicznych LBD Usp z *D. melanogaster* (Clayton i wsp., 2001) oraz z *H. virescens* (Billas i wsp., 2001) sugeruje się, iż Usp najprawdopodobniej posiada naturalny ligand, którym może być JH (3.4.1.). W przeciwieństwie do *D. melanogaster*, która posiada tylko jedną izoformę Usp (Oro i wsp., 1990; Henrich i wsp., 1994), *Manduca sexta* posiada dwie izoformy Usp oznaczone jako Usp-1 i Usp-2 (Lan i wsp.,

1999). Pokazano, że 20E jest zdolny do aktywacji promotora genu *MHR3* tylko wtedy, kiedy zwiąże się do heterodimeru receptora ekdyteroidowego Usp-1/EcR-B1, natomiast obecność w dużych ilościach izoformy Usp-2 zapobiega ekspresji genu. Stanowi to przykład zróżnicowanego użycia izoform Usp w modulacji ekspresji genów (Lan i wsp., 1999). Heterodimeryzacja EcR z partnerem Usp zwiększa zdolność EcR do wiązania ligandu. Z drugiej strony wiązanie ligandu stabilizuje heterokompleks Usp/EcR i jednocześnie zwiększa jego powinowactwo do EcRE (Oro i wsp., 1990; Koelle i wsp., 1991; Yao i wsp., 1993). Mechanizm tego procesu nie jest dotąd poznany. Sugeruje się bezpośrednią rolę JH w tworzeniu funkcjonalnego heterodimeru Usp/EcR (Lezzi i wsp., 1999). W nieobecności specyficznego liganda heterodimer Usp/EcR hamuje transkrypcję, natomiast w jego obecności jest zdolny do oddziaływania z koaktywatorami (Cherbas i wsp., 1991; Dobens i Rudolph, 1991; Tsai i wsp., 1999). Wiele receptorów jądrowych tworzy supramolekularne kompleksy z białkami szoku cieplnego i innymi białkami (Gehring, 1998). Badając cytoplazmatyczne ekstrakty sugerowano, iż EcR może tworzyć kompleksy o dużej masie cząsteczkowej (Turberg i Spindler, 1992). Pokazano, że u *D. melanogaster* Hsc70 i Hsp90 są wymagane *in vivo* dla aktywności funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego oraz, że EcR jest głównym celem kompleksu białek „opiekuńczych” zwanych „czaperoninami” (ang., *chaperones*) (Arbeitman i Hogness, 2000). Badania ekstraktów gruczołów przedtułowiowych *M. sexta* pokazały obecność czaperonin w kompleksach z EcR i Usp (Song i wsp., 1997). Sugeruje to, iż funkcjonalny receptor ekdyteroidowy wykazuje cechy receptorów steroidowych, chociaż należy do typu tworzącego heterodimery a te, jak się uważa, nie wiążą się z białkami Hsp (Lezzi i wsp., 1999). Badania przeprowadzone na mutantach genów *usp* i *EcR* dostarczyły dowodów, iż oba białka są niezbędne *in vivo* do przenoszenia sygnału pochodzącego od 20E (Bender i wsp., 1997; Hall i Thummel, 1998; Schubiger i wsp., 1998). Heterodimer Usp/EcR wykazuje również aktywność hamowania transkrypcji genów (Zelhof i wsp., 1997; Schubiger i Truman, 2000; Ghbeish i wsp., 2001). Sugeruje się, że represja może być skutkiem tworzenia homodimerów Usp na DNA, co wskazuje na możliwy udział koregulatorów w modulacji aktywności transkrypcyjnej (Ghbeish i wsp., 2001). Homodimery Usp mogą być tworzone *in vitro* na DR1, na którym to hormon muristeron A wywołuje heterodimeryzację Usp z EcR (Vögtli i wsp., 1998). Sam EcR w nieobecności liganda wykazuje aktywność represorową (Dobens i wsp., 1991). Częściowo może to być wyjaśnione oddziaływaniem EcR z funkcjonalnym homologiem takich korepresorów kręgowców jak NCoR i SMRT (Tsai i wsp., 1999). Ponadto EcR wiąże również inny owadzi korepresor, zidentyfikowany u *D. melanogaster* - Alien (Dressel i wsp.,

1999). Jak już wspomniano, korepresory wiążą się do receptorów jądrowych, w nieobecności liganda. Dopiero przyłączenie cząsteczki sygnałowej umożliwia oddysocjowanie korepresorów, przyłączenie kompleksu koaktywatorów i aktywację transkrypcji (3.2.4.). Jednakże pokazano, że w komórkach drożdży EcR może działać również jako konstytutywny aktywator transkrypcji w nieobecności Usp i ligandu (Dela Cruz i Mak, 1997). Wiązanie liganda przez EcR wymagało obecności partnera (Usp lub RXR), jednak poziom aktywacji transkrypcji przez heterodimer Usp/EcR był nieco wyższy od uzyskanego dla samego EcR (Dela Cruz i Mak, 1997). Czynnikiem modulującym aktywację genów będących pod kontrolą 20E u *D. melanogaster* może być oddziaływanie heterodimeru Usp/EcR z dodatkowymi białkami aktywującymi, wiążącymi się do specyficznych dla siebie sekwencji DNA (Brodu i wsp., 1999), czy też np. z innymi receptorami sierocymi biorącymi udział w szlaku odpowiedzi na 20E. Pokazano, że niektóre z receptorów sierocych u *D. melanogaster* wpływają na szlaki przenoszenia sygnału hormonalnego, wiążąc się do EcRE lub tworząc nieaktywne heterodimery z Usp lub EcR (Thummel, 1995). Badania w drożdżowym systemie dwuhybrydowym dostarczyły dowodów na silne i specyficzne oddziaływanie pomiędzy receptorem sierocym DHR38 i Usp (Sutherland i wsp., 1995). Białko DHR38 ekspresjonowane jest we wczesnych etapach metamorfozy nie podlegając regulacji przez 20E (Sutherland i wsp., 1995). Testy *in vivo* pokazały, że DHR38 może znosić formowanie heterodimeru Usp/EcR na specyficznym EcRE, przypuszczalnie tworząc kompleks z Usp (Sutherland i wsp., 1995). Nie wyklucza się, że białko Usp może koordynować sygnały związane z aktywacją różnych receptorów u *D. melanogaster* (Crispi i wsp., 1998). Rekombinowany Usp tworzy homodimery i homotetramery *in vitro* w nieobecności DNA (Rymarczyk i wsp., 2003), w czym wykazuje podobieństwo do RXR, który w nieobecności DNA występuje w formie homotetramerów (Kersten i wsp., 1995; Chen i wsp., 1998; Kersten i wsp., 1998). Jednakże pokazano, że Usp pozbawione regionu A/B wykazywało obniżoną zdolność do oligomeryzacji, co z kolei odróżnia białko Usp od RXR (Rymarczyk i wsp., 2003). Niemniej jednak, Usp częściowo przejawia charakterystykę RXR jako dimeryzacyjnego partnera dla różnych receptorów jądrowych. Ponadto obserwacje, że Usp może wiązać DNA jako monomer (D'Avino i wsp., 1995; Antoniewski i wsp., 1996; Niedziela-Majka i wsp., 2000) oraz być receptorem dla JH (Jones i Sharp, 1997; Clayton i wsp., 2001) sugerują obecność skomplikowanego mechanizmu regulacyjnego, w którym kluczowym elementem może być dynamiczny kompleks zawierający jedną z izoform EcR, Usp oraz ich ligandy (Niedziela-Majka i wsp., 2000).

3.4.3. Oddziaływanie funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego z DNA

Jak już wspomniano, funkcjonalny receptor ekdyteroidowy posiada heterodimeryczną naturę, typową dla niesteroidowych receptorów jądrowych kręgowców. Jednocześnie jednak wiąże preferencyjnie sekwencje palindromowe HRE, podobnie jak czynią to receptory steroidowe (Vögtli i wsp., 1998). Większość naturalnych EcRE stanowią niedoskonałe palindromy z odstępniakiem o długości 1 pary zasad (Rys.3.20.). Sekwencja zgodna EcRE nie jest ściśle określona i ma postać $\text{PuG}^{(C/T)}\text{T}^{(C/G)}\text{A(N)}\text{TG}^{(C/A)}\text{A}^{(C/A)}\text{A}^{(C/T)}\text{Py}$ (Antoniewski i wsp., 1995). Analiza regionów promotorowych genów będących pod kontrolą 20E pozwoliła na wyodrębnienie w promotorze genu *hsp27*, kodującego białko szoku cieplnego o masie 27 kDa, u *D. melanogaster* pierwszy element regulatorowy wiążący funkcjonalny receptor 20E (*hsp27_{pal}*) (Riddihough i Pelham, 1987) (Rys.3.20.). Element *hsp27_{pal}* jest najczęściej obecnie badaną sekwencją warunkującą odpowiedź na 20E. Analizy wiązania nieoczyszczonego receptora ekdyteroidowego będącego w kompleksie ze znakowanym ponasteronem A potwierdziły jego specyficzność wiązania do *hsp27_{pal}* (Cherbas i wsp., 1991; Ożyhar i wsp., 1991; Ożyhar i Pongs, 1993). Poznane sekwencje EcRE wykazują duże podobieństwo do opisywanych HRE receptorów steroidowych, w szczególności sekwencja *hsp27_{pal}* podobna jest do ERE (3.3.1.) (Martinez i wsp., 1991). Rolę długości odstępniaka w elemencie *hsp27_{pal}* pokazały eksperymenty wiązania częściowo oczyszczonego receptora ekdyteroidowego (Ożyhar i wsp., 1991). Stwierdzono, że zwiększenie długości odstępniaka do dwóch par zasad wpłynęło na zmniejszenie powinowactwa receptora do sekwencji regulatorowej (Ożyhar i wsp., 1991). Ponadto, centralne pary zasad zdegenerowanego palindromu (-3, -4, +3, +4, odpowiednio) wydają się nie być istotne dla wiązania receptora do elementu regulatorowego, natomiast bardzo ważne są pozycje: -6, -5, -2, -1 oraz w drugim ramieniu palindromu: +2, +5 i +6 (Ożyhar i wsp., 1991.) (Rys.3.20.). Warto podkreślić, że kompleks funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego na tych EcRE, w szczególności na *hsp27_{pal}*, różni się od kompleksów homodimerów receptorów hormonów steroidowych, które, jak pokazano, nie oddziałują z grupami funkcyjnymi par zasad zlokalizowanymi poza pozycjami -5 i +5 (3.3.3.1.).

77

Heterokompleks Usp/EcR wiąże *in vitro* również elementy zorganizowane w postaci DR o półmiejscu 5'-GGGTCA-3' (Antoniewski i wsp., 1996) lub 5'-AGGTCA-3' (Horner i wsp., 1995; Khoury Christianson i wsp., 1992) i odstępniku o długości 0 do 5 Par zasad. Hierarchia powinowactwa nieoczyszczonego receptora ekdysteroidowego w stosunku do elementów DR wygląda następująco: DR4>DR5>DR3= *hsp27_{pal}* >DR1>DR2>DR0 (Antoniewski i wsp., 1996). Co więcej, DR mogą funkcjonować jako EcRE także *in vivo* (Antoniewski i wsp., 1996). Jedyny zidentyfikowany do tej pory naturalny DR wiążący receptor ekdysteroidowy, zbudowany jest z dwóch sekwencji zgodnych 5'-AGGTCA-3', oddzielonych 12 parami zasad, pomiędzy którymi znajduje się sekwencja 5'-AGGCCA-3' (Rys.3.21.). Znajduje się on w regionie kodującym genów *ng-1* (ang. *new-glue protein 1 precursor*) i *ng-2* (Crispi i wsp., 1998) (Rys.3.21.). Receptory sieroce, takie jak DHR38, DHR39 czy βFTZ-F1, wiążą się również do tego elementu (Crispi i wsp., 1998). Ten duży szereg rozpoznawanych sekwencji EcRE sugeruje, że mechanizm funkcjonowania heterodimeru Usp/EcR jest wysoce złożony (Vögtli i wsp., 1998). Chociaż heterodimer Usp/EcR wiąże syntetyczny doskonały palindrom IR1 (5'-GAGGTCAATGACCTC-3', nie kodująca), to nigdy nie został znaleziony w naturze. Prawdopodobnie doskonale symetryczna sekwencja DNA nie musi wcale oznaczać, że jest ona właściwa dla mechanizmu odpowiedzialnego za kontrolę ekspresji genów (Lezzi i wsp., 1999). Palindromowe EcRE są w pewnym stopniu homologiczne z odwróconymi powtórzeniami motywu rdzeniowego PuG(G/T)TCA (Gronemeyer i Laudet, 1995). W przeciwieństwie do nich, są one zwykle bardzo zdegenerowane i mogą być traktowane jako wysoce asymetryczne HRE (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Możliwe jest, że są one pokrewne właściwym asymetrycznym elementom DR w zdolności do narzucania orientacji heterodimeru Usp/EcR na odpowiednim promotorze (Niedziela-Majka i wsp., 2000).

Przeprowadzone badania oddziaływania oczyszczonych DBD białek EcR i Usp z *D. melanogaster* (Niedziela-Majka i wsp., 1998; Niedziela-Majka i wsp., 2000) z *hsp27_{pal}* dostarczyły wskazówek, co do architektury heterodimeru UspDBD/EcRDBD na naturalnym elemencie EcRE. Wykonując eksperymenty funkcjonalne EMSA pokazano, że rekombinowane DBD wykazują różne preferencje w stosunku do półmiejsc *hsp27_{pal}* (Niedziela-Majka i wsp., 2000). 5'-końcowe półmiejsce wykazuje wyraźnie wyższe powinowactwo do obu DBD niż 3'-końcowe półmiejsce. Po drugie, UspDBD wiąże się do 5'-końcowego półmiejsc z około czterokrotnie wyższym powinowactwem w porównaniu do EcRDBD. Zasugerowano, że następnie EcRDBD wiąże się w sposób synergiczny do 3'-końcowego półmiejsc *hsp27_{pal}* (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Uzyskane rezultaty

dostarczyły dowodów, że UspDBD może funkcjonować jako specyficzna „kotwica”, która preferencyjnie wiąże 5'-końcowy fragment *hsp27_{pal}* i w konsekwencji lokalizuje heterokompleks Usp/EcR w zdefiniowanej orientacji na promotorze genu *hsp27*. Zgodnie z zaproponowanym modelem, kompleks heterodimerski wykazuje „polarność” w stosunku do półmiejsc *hsp27_{pal}*: UspDBD zajmuje 5'-końcowe półmiejsce a EcRDBD 3'-końcowe (5'-UspDBD/EcRDBD-3') (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Tym samym może on wiązać się do *hsp27_{pal}* w sposób charakterystyczny dla receptorów heterodimersujących z RXR („głowa do ogona”) (3.3.3.3.). Po raz pierwszy pokazano, że EcRE, które w większości przypadków są niedoskonałymi palindromami, mogą funkcjonować jako asymetryczne elementy regulatorowe w podobny sposób do działania elementów DR u kręgowców. Wyszło zatem przypuszczenie, iż dla oddziaływań białko-białko oraz białko-DNA mogłyby być istotne sekwencje CTE obu DBD (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Analizy eksperymentów EMSA zasugerowały, że sekwencje C-końcowe UspDBD i EcRDBD wnoszą różny wkład w tworzenie heterodimeru na *hsp27_{pal}* (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Pokazano, że kaseta A UspDBD nie jest odpowiedzialna za wiązanie *hsp27_{pal}* i heterodimersację z EcRDBD. Natomiast kaseta T UspDBD przypuszczalnie jest ważna dla tworzenia kompleksów na *hsp27_{pal}* (Niedziela-Majka i wsp., 2000). W przypadku EcRDBD wyniki zasugerowały, że jego sekwencja CTE, w szczególności przypuszczalna kaseta A, jest niezbędna dla tego białka do wiązania *hsp27_{pal}* i tworzenia na nim homodimerów i heterodimerów z UspDBD. Rola kasety T EcRDBD pozostała niejasna (Niedziela-Majka i wsp., 2000).

Otrzymane wyniki stanowiły hipotezę, dlatego też niezbędne stało się wykonanie dalszych badań rozstrzygających rolę reszt aminokwasowych w formowaniu heterokompleksu Usp/EcR na naturalnym elemencie *hsp27_{pal}*. Wprawdzie w przypadku EcRDBD pokazano, że kaseta A jest istotna dla wiązania EcRDBD do DNA i heterodimersacji z UspDBD na *hsp27_{pal}*, jednakże molekularnych podstaw specyficzności oddziaływania CTE EcRDBD z *hsp27_{pal}* i UspDBD nie określono.

4

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było określenie roli C-terminalnej sekwencji domeny wiążącej DNA białka EcR (EcRDBD) w specyficznej interakcji z elementem regulatorowym *hsp27_{pal}*. W szczególności zmierzano do identyfikacji reszt aminokwasowych obszaru kasety T EcRDBD istotnych dla tworzenia homodimeru EcRDBD i heterodimeru UspDBD/EcRDBD na *hsp27_{pal}*. Ponadto dążono do określenia minimalnego fragmentu kasety A z C-końcowego wydłużenia (CTE) EcRDBD wystarczającego dla specyficznego wiązania *hsp27_{pal}* i tworzenia kompleksów homo- i heterodimerycznych na tym elemencie.

SPIS WŁASNYCH PUBLIKACJI

5

Publikacje:

Ożyhar, A., Grad, I., Kowalska, A., **Orłowski, M.**, Sawicka, D., Rymarczyk, G., (2002) „*Badania molekularnych podstaw specyficzności interakcji receptora 20-hydroksyekdyzonu z DNA - w poszukiwaniu nowych narzędzi kontroli ekspresji genów (II)*”, II Sympozjum Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska. Rozdział w książce Oficyny Wydawniczej Politechniki Wrocławskiej (39-43).

Orłowski, M., Szyszka, M., Kowalska, A., Grad, I., Zoglowek, A., Rymarczyk, G., Dobryszyski, P., Krowarsch, D., Rastinejad, F., Kochman, M., Ożyhar, A., (2004) „*Plasticity of the ecdysone receptor DNA-binding domain*”, *Molecular Endocrinology*, dostępna od 10 czerwca 2004 w formie elektronicznej jako manuskrypt o numerze doi:10.1210/me.2004-0154.

Doniesienia konferencyjne:

Orłowski, M., Niedziela-Majka, A., Grad, I., Ożyhar, A., (2000) „*Mutageniza ukierunkowana kasety T białka EcR*”, IV Polskie Sympozjum: „Proekologiczne Pestycydy”, 12-16 czerwiec, Łądek Zdrój (plakat).

Ożyhar, A., Grad, I., Kowalska, A., Niedziela-Majka, A., **Orłowski, M.**, Rymarczyk, G., Sawicka, D., (2002) „*Domeny wiążące DNA receptora ekdyteroidowego - elementy budulcowe minimalnych czynników transkrypcji*”, XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, sekcja: Struktura i funkcja białek, 18-22 września, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław (referat wygłoszony przez prof. Andrzeja Ożyhara).

Orłowski, M., Szyszka, M., Grad, I., Kowalska, A., Krowarsch, D., Ożyhar, A., (2003) „*Mutational analysis of the EcRDBD recognition α -helix and T-box region uncovers critical determinants of the functional ecdysteroid receptor interaction with the response element*”, XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, sekcja: Przekazywanie sygnałów komórkowych, 16-20 września, AMG, Gdańsk (samodzielne doniesienie ustne).

Kowalska, A., Rymarczyk, G., Grad., I., **Orłowski, M.**, Krowarsch, D., Ożyhar, A., (2003) „*Residues of the C-terminal region (T-box) of the Ultraspiracle nuclear receptor DNA-binding domain crucial to specific interaction with the hsp27 response element*”, XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, sekcja: Przekazywanie sygnałów komórkowych, 16-20 września, AMG, Gdańsk (doniesienie ustne wygłoszone przez mgr inż. Agnieszkę Kowalską).

Orłowski, M., Szyszka, M., Grad., I., Kowalska, A., Krowarsch, D., Ożyhar, A., (2003) „*Mutational analysis of the EcRDBD recognition α -helix and T-box region uncovers critical determinants of the functional ecdysteroid receptor interaction with the response element*”, zaawansowany kurs FEBS: „From transcription to physiology: regulation of gene expression and protein function”, 8-14 wrzesień, Spetses, Grecja (plakat).

Jakób, M., Kołodziejczyk, R., Kowalska, A., **Orłowski, M.**, Grad, I., Krzywda, S., Bujacz, B., Ożyhar, A., Jaskólski, M., (2004) „*Crystallization and preliminary crystallographic studies of nuclear receptor complex EcR-Usp on DNA*”, Sesja Sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, 01-02 kwietnia 2004, Poznań (plakat wystawiony przez magistranta Michała Jakóba).

Orłowski, M., Szyszka, M., Kowalska, A., Grad, I., Zoglowek, A., Rymarczyk, G., Krowarsch, D., Ożyhar, A., (2004) „*Plasticity of the ecdysone receptor DNA-binding domain*”, 29 Kongres FEBS, sekcja: Proteins and peptides at work, 26.06. - 01.07., Warszawa (plakat).

Kowalska, A., Kołodziejczyk, R., **Orłowski, M.**, Grad, I., Jaskólski, M., Ożyhar, A., (2004) „*Crystallization and preliminary crystallographic studies of the Ultraspiracle DNA-binding domain in complex with the natural response element*”, 29 Kongres FEBS, sekcja: Proteins and peptides at work, 26.06. - 01.07., Warszawa (plakat zaprezentowany przez mgr inż. Agnieszkę Kowalską).



MATERIAŁY I METODY

6.1. MATERIAŁY

6.1.1. Odczynniki

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
Agar	Gibco BRL	30391-023
Agaroza	Gibco BRL	15510-027
Akrylamid	Merck	100633.0500
Albumina z jaj kurzych	Sigma	A-5503
[γ - 32 P]ATP	NEB TM Life Science	BLU/NEG/002A
Białka standardowe:		
(zestaw Low Molecular Weight Marker)	Bio-Rad	161-0304
(zestaw Protein Molecular Weight Marker)	Fermentas	SMO431
Bromek etydyny	Sigma	E-7637
Chloramfenikol	Roth	6295.1
Chlorowodorek guanidyny	Sigma	G-4505
Coomassie Blue R250	Serva	35051
DNaza I	Sigma	642K7650
dNTP	Fermentas	R-6513
DTT	Sigma	D-9163
Ekstrakt drożdżowy	Gibco BRL	30393-029
Glicerol	Roth	3783.2
Glutation (forma zredukowana)	Roth	6382.1
Glutathione Sepharose TM 4B (złoże)	Amersham Biosciences	17-0756-01
Heparin Sepharose TM CL-6B (złoże)	Amersham Biosciences	17-0467-01
Hydrolizat kazeiny	Gibco BRL	50014-034
IPTG	Roth	2316.3
Karbenicylina	Roth	6344.2
Kwas borny	Roth	6943.1
β -merkaptioetanol	Pierce	35600
NaCl	Merck	6406.0
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Roth	4984.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	Roth	9212.1
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Serva	13375

N'N'-bismetylenoakrylamid	Sigma	M-2002
Olej mineralny	Sigma	M-5904
Polimeraza DNA T7 v2.0	USB Corporation	70775Y/Z
Polimeraza DNA <i>Vent</i>	New England BioLabs	M0254S
Polimeraza DyNAzyme™ II	FINNZYMES	F-501S
Poli(dI-dC)	Amersham Biosciences	27-7880
RNazaA	Sigma	R-6513
SDS	Roth	2326.2
TEMED (1,4-N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina)	Roth	2367.3
Tris (2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol)	Roth	4855.2
Trombina	Sigma	T-7513

Enzymy restrykcyjne do pracy z DNA pochodziły z firm: Boehringer Mannheim, MBI Fermentas, New England BioLabs, Amersham Biosciences, Promega, Sigma. W pracy wykorzystywano wodę oczyszczaną w aparatach: Milli-Q Synthesis A10 i w Milli-Q Plus firmy Millipore. Wodę do pracy z DNA i preparatami bakteryjnymi dodatkowo autoklawowano.

6.1.2. Szczepy *Escherichia coli* (Novagen, 1992)

BL21(DE3)pLysS (Studier i Moffatt, 1986)

genotyp:

lon, *ompT*, (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*, (*cI* ts857 *ind1*, *sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7 gene 1*),
[pLysS: Cm, *lys*(T7)]

NOVA BLUE (Novagen, 1992)

genotyp:

endA1, *hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*,
lac[F', *proAB*, *lacI*^q ZΔM15, *Tn10*(tet^r)], *recA1*

6.1.3. Plazmidy

6.1.3.1. Plazmid ekspresyjny pGEX-2T

Wektor pGEX-2T (Amersham Biosciences) był wykorzystywany do ekspresji białek w fuzji z umieszczonym na N-końcu enzymem glutationo-S-transferazą (GST) ze *Schistosoma japonicum* (Smith i Johnson, 1988). Posiada on sekwencję kodującą peptyd rozpoznawany przez trombinę. Sekwencja umieszczona jest w ramce odczytu z genem *gst* przed sekwencją wielokrotnego klonowania, co umożliwia odtrawienie GST od białka fuzyjnego podczas oczyszczania. Synteza rekombinowanego białka jest kierowana przez promotor *tac* (P_{tac}), indukowany izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozydem (IPTG). Wektor ten posiada ponadto gen markerowy (*bla*) nadający bakteriom oporność na ampicylinę (Amp^r) oraz gen represora operonu laktozowego (*lacI^q*). Mapę wektora oraz jego sekwencję zamieszczono w Dodatku V.

6.1.3.2. Plazmidy zawierające cDNA *EcR* i *Usp* z *Bombyx mori*

pBluescript-SK⁺_BmEcR

Plazmid zawiera sekwencję cDNA kodującą izoformę B1 *EcR* z *B. mori*. Został on skonstruowany przez Luca Sweversa i współpracowników (Swevers i wsp., 1995) w laboratorium Kostasa Iatrou (obecny adres: Institute of Biology, National Center for Scientific Research „Demokritos” 153 10 Aghia Paraskevi Attikis, Athens, Greece). Sekwencję cDNA *EcR* oraz sekwencję aminokwasową białka *EcR* z *B. mori* zamieszczono w Dodatku III.

pBluescript-KS_BmCF1

Plazmid zawiera sekwencję cDNA kodującą *Usp* z *B. mori*. Został on skonstruowany przez Georgea Tzertzinisa (obecny adres: New England BioLabs, 32 Tozer Road, Beverly, MA 01915, USA) i współpracowników (Tzertzinis i wsp., 1994) w laboratorium Fotisa C. Kafatosa (obecny adres: EMBL Heidelberg, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany). Sekwencję cDNA *Usp* oraz sekwencję aminokwasową białka *Usp* z *B. mori* przedstawiono w Dodatku IV.

6.1.4. Podstawowe bufony i podłoża hodowlane

Bufory wykorzystywane w pracy przygotowywano według Sambrook i wsp. (1989).

Podłoże LB

ekstrakt drożdżowy	5,0 g/l
hydrolizat kazeiny	10,0 g/l
NaCl	10,0 g/l

Antybiotyki - roztwory podstawowe

karbenicylina	100 mg/ml
chloramfenikol	70 mg/ml

Do podłoży płynnych i stałych dodawano roztwory podstawowe antybiotyków tak, aby końcowe ich stężenie wynosiło: 50 µg/ml dla karbenicyliny, 35 µg/ml dla chloramfenikolu. Antybiotyki dodawano do podłoża stałego LB-agar (15 g agaru na 1 litr pożywki płynnej) po autoklawowaniu, przed wylaniem na szalki Petriego (Ø 90 mm), po ochłodzeniu do temperatury około 50°C.

Bufor TE

10 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM	EDTA

Bufor 10xTBE

890 mM	Tris-boran (pH 8,3)
20 mM	EDTA

Bufor A

50 mM	Tris-HCl (pH 7,8)
150 mM	NaCl
1 mM	DTT
10 µM	ZnCl ₂
10 % (v/v)	glicerol

Bufor B

20 mM	Tris-HCl (pH 7,8)
100 mM	NaCl
5 µM	ZnCl ₂
1 mM	DTT
10 % (v/v)	glicerol

Bufor C

50 mM	Na ₂ HPO ₄ (pH 7,8)
250 mM	NaCl
5 µM	ZnCl ₂
1 mM	β-merkaptotanol
10 % (v/v)	glicerol

Bufory doprowadzano do określonego pH w temperaturze pokojowej.

DTT lub β -merkaptioetanol dodawano do buforów w określonym końcowym stężeniu tuż przed użyciem.

Roztwory do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE):
(Laemmli, 1970)

Bufor do nanoszenia próbek (2xSB)

125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
4 % (w/v)	SDS
10 % (v/v)	β -merkaptioetanol
20 % (v/v)	glicerol
0,005% (w/v)	błękit bromofenolowy

Bufor do elektroforezy (5x)

125 mM	Tris-zasada (pH 8,3)
960 mM	glicyna
0,5 % (w/v)	SDS

Roztwór do barwienia SDS-PAG
(Fairbanks, 1971)

40% (v/v)	metanol
10% (v/v)	kwasek octowy
0,1% (w/v)	Coomassie Blue R250

Roztwór do odbarwiania SDS-PAG
(Fairbanks, 1971)

40% (v/v)	metanol
10% (v/v)	kwasek octowy

Roztwór do utrwalania SDS-PAG przed suszeniem

40% (v/v)	metanol
4% (v/v)	glicerol

Roztwór akrylamid/N'N'-bismetylenoakrylamid (30% T; 2,67% C)

akrylamid	272 g/l
N'N'-bismetylenoakrylamid	8 g/l

Składy wykorzystywanych w pracy żeli poliakrylamidowych:

Odczynnik	Żel rozdzielający 12%T; 2,67% C	Żel rozdzielający 15% T; 2,62% C	Żel zagęszczający 4% T; 2,67% C
akrylamid/bisakrylamid (30% T; 2,67%)	1: 2,5 (v/v)	1: 2 (v/v)	1: 7,5 (v/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	-----	-----	0,125 M
Tris-HCl (pH 8,8)	0,375 M	0,375 M	-----
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
nadsiarczan amonu	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)
TEMED	1: 100 (v/v)	1: 100 (v/v)	1: 100 (v/v)

gdzie: T - całkowite stężenie monomeru,
C - stężenie monomeru sieciującego (w/v) liczone według wzorów:

$$T\% = [(g \text{ akrylamid} + g \text{ N}'\text{N}'\text{-bismetylenoakrylamid}) / \text{objętość całkowita}] \times 100\%$$

$$C\% = [g \text{ N}'\text{N}'\text{-bismetylenoakrylamid} / (g \text{ akrylamid} + g \text{ N}'\text{N}'\text{-bismetylenoakrylamid})] \times 100\%$$

pH buforów do elektroforez w żelu poliakrylamidowym określone były w temperaturze pokojowej.

5 % żel poliakrylamidowy do eksperymentu EMSA (Fried i Crothers, 1989)

akrylamid 40%	14,5 ml
N'N'-bismetylenoakrylamid	9,9 ml
10 × TBE	3 ml
10% nadsiarczan amonu (w/v)	600 μl
TEMED	120 μl
	(na 120 ml)

6.1.5. Oligonukleotydy

Wykorzystane w niniejszej pracy oligonukleotydy oczyszczone były przez producenta przy wykorzystaniu HPLC.

6.1.5.1. Oligonukleotydy wykorzystywane do wprowadzenia mutacji techniką PCR przy wykorzystaniu metody tzw. „megaprimera” (6.2.1.1.)

W poniższych Tabelach (6.1. i 6.2.) kolorem zielonym oznaczono zmutowane kodony odpowiadające umieszczonym w drugiej kolumnie resztom aminokwasowym.

6.1.5.1.1. Mutacje aminokwasów regionu kasety T białka EcRDBD z *D. melanogaster*

Tabela 6.1. Oligonukleotydy wykorzystywane do wprowadzenia mutacji w regionie kasety T.

Symbol	Mutacja	Sekwencja oliogonukleotydu
WRA 145	R67A	5'-AC GCA TTC CGG CGC CAT ACC CAC G-3'
WRA 146	P68A	5'-AC GAC GCA TTC CGC CCG CAT ACC-3'
WRA 147	E69A	5'-GAC GAC GCA TGC CGG CCG CAT AC-3'
WRA 148	C70A	5'-CGG GAC GAC GGC TTC CGG CCG C-3'
WRA 149	V71A	5'-T CTC CGG GAC GGC GCA TTC CGG-3'
WRA 150	V72A	5'-G GTT CTC CGG GGC GAC GCA TTC C-3'
WRA 151	P73A	5'-ACA TTG GTT CTC CGC GAC GAC GCA-3'
WRA 152	E74A	5'-C ACA TTG GTT CGC CGG GAC GAC G-3'
WRA 153	N75A	5'- AT CGC ACA TTG GGC CTC CGG GAC G-3'
WRA 154	Q76A	5'-CTT CAT CGC ACA TGC GTT CTC CGG G-3'
WRA 261	V72I/P73Q	5'-CA TTG GTT CTC CTG GAT GAC GCA TTC-3'
WRA 262	N75P	5'-CGC ACA TTG GGG CTC CTG GAT GAC-3'

6.1.5.1.2. Mutacje aminokwasów regionu α -helisy rozpoznającej element regulatorowy białka EcRDBD z *D. melanogaster*

Tabela 6.2. Oligonukleotydy wykorzystywane do wprowadzenia mutacji w α -helisie rozpoznającej element regulatorowy białka EcRDBD.

Symbol	Mutacja	Sekwencja oliogonukleotydu
WRA 247	E19A	5'-C CTC ACC TGT GCG GGC TGC AAG G-3'
WRA 248	G20A	5'-C ACC TGT GAG GCC TGC AAG GGG T-3'
WRA 249	K22A	5'-GT GAG GGC TGC GCG GGG TTC TTT C-3'
WRA 250	G23A	5'-G GGC TGC AAG GCG TTC TTT CGA CG-3'
WRA 251	R26A	5'-AG GGG TTC TTT GCA CGC AGC GTT ACG-3'
WRA 252	R27A	5'-GG TTC TTT CGA GCC AGC GTT ACG AAG-3'
WRA 253	S28A	5'-TC TTT CGA CGC GCC GTT ACG AAG AGC-3'
WRA 276	T30A	5'-CGC AGC GTT GCG AAG AGC GCC G-3'
WRA 277	K31A	5'-GC AGC GTT ACG GCG AGC GCC GTC-3'

6.1.5.2. Pozostałe oligonukleotydy wykorzystywane w eksperymentach klonowania

Tabela 6.3. Pozostałe oligonukleotydy wykorzystywane w niniejszej pracy.

Symbol	Sekwencja oliogonukleotydu	Zastosowanie
WRA 5	5'-gcc cgg gga tcc <u>GCG</u> CCA CGG GTG CAA GA-3' (podkreślono kodon 256 reszty)	starter 5'-końcowy do amplifikacji EcRDBD _{102 (365)} <i>D.m.</i>
MO 2	5'-gcc cgg gga tcc <u>TTT</u> GTC CTT CTC CTT CTGGG-3' (podkreślono kodon 92(355) reszty)	starter 3'-końcowy do amplifikacji EcRDBD _{Δ92} <i>D.m.</i>

Symbol	Sekwencja oligonukleotydu	Zastosowanie
MO 4	5'-gcc cgg gga tcc <u>CTT</u> CTT TTC GCG CCG CTT C-3' (podkreślono kodon 85(348) reszty)	starter 3'-końcowy do amplifikacji EcRDBD _{Δ85} <i>D.m.</i>
WR 9	5'-CCACGGGTGCAAGAGGAG-3'	starter 5'-końcowy do sprawdzania orientacji sekwencji kodującej EcRDBD <i>D.m.</i> wklonowanej w pGEX-2T
WR 10	5'-TCAGTCACGATGAATTCCCG-3'	starter 3'-końcowy do sprawdzania orientacji sekwencji kodującej EcRDBD <i>D.m.</i> i <i>B.m.</i> wklonowanej w pGEX-2T
WRA 267	5'-gcc cgg gga tcc <u>GCA</u> CCT CGA CAG CAA GAG-3' (podkreślono kodon 198 reszty)	starter 5'-końcowy do amplifikacji EcRDBD ₁₀₁₍₃₀₇₎ <i>B.m.</i>
WRA 268	5'-gcc cgg gga tcc <u>GTC</u> TTC GAC TGT GGT CGT A-3' (podkreślono kodon 101(307) reszty)	starter 3'-końcowy do amplifikacji EcRDBD ₁₀₁₍₃₀₇₎ <i>B.m.</i>
WRA 269	5'-gcc cgg gga tcc <u>GGG</u> CTC CTG TAT GAC ACA T-3' (podkreślono kodon 75(281) reszty)	starter 3'-końcowy do amplifikacji EcRDBD _{Δ75} <i>B.m.</i>
MO 5	5'-gcc cgg gga tcc <u>TTT</u> GTC TTT CTT TTG TCT TTG C-3' (podkreślono kodon 89(294) reszty)	starter 3'-końcowy do amplifikacji EcRDBD _{Δ89} <i>B.m.</i>
WRA 271	5'-A CCT CGA CAG CAA GAG GAG-3'	starter 5'-końcowy do sprawdzania orientacji sekwencji kodującej EcRDBD <i>B.m.</i> wklonowanej w pGEX-2T
WRA 272	5'-gcc cgg gga tcc <u>AAC</u> CAT CCC TTG AGC GGC-3' (podkreślono kodon 104 reszty)	starter 5'-końcowy do amplifikacji UspDBD ₈₉₍₂₀₂₎ <i>B.m.</i>
WRA 273	5'-gcc ctg aat tcc <u>GCT</u> GCT GGG ATG AGC GTC-3' (podkreślono kodon 89(202) reszty)	starter 3'-końcowy do amplifikacji UspDBD ₈₉₍₂₀₂₎ <i>B.m.</i>
WRA 19	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' (sekwencja: 869-891 pz wektora pGEX-2T)	5'-końcowy starter do sekwencjonowania fragmentów wklonowanych w pGEX-2T
WRA 20	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3' (sekwencja: 1020-998 pz wektora pGEX-2T)	3'-końcowy starter do sekwencjonowania fragmentów wklonowanych w pGEX-2T
WRA 111 WRA 112	5' -AGCGACAAGGGTTCAATGCACCTTGTCGAATGAA-3' 3' -TCGCTGTTCCCAAGTTACGTGAACAGGTTACTT-5'	sonda <i>hsp27_{pal}</i> wykorzystywana w technice EMSA
WRA 265 WRA 266	5' -AGCGACAAGGGTTCAAGTACACAGTCCAATGAA-3' 3' -TCGCTGTTCCCAAGTTCATGTGTCAGGTTACTT-5'	sonda <i>hsp27_{ΔR}</i> wykorzystywana w technice EMSA

W sekwencjach oligonukleotydów do PCR (Saiki i wsp., 1988) małymi literami podano nukleotydy dodane w celach klonowania, kursywą oznaczono sekwencje wprowadzonych miejsc restrykcyjnych. Komplementarne do siebie oligonukleotydy, używane w EMSA, pokazano w jednej rubryce (nić górna:

5'→3', nić dolna: 3'→5'). Kolorem niebieskim oznaczono pary zasad 5'- i 3'-końcowego półmiejscza elementu *hsp27_{pal}* *D.m.*, *D. melanogaster*, *B.m.*, *B. mori*.

6.2. METODY

Eksperymenty przeprowadzano posługując się standardowymi metodami opisanymi obszernie w literaturze oraz przy wykorzystaniu procedur zalecanych przez producentów odczynników i do pracy z DNA (Tabela 6.4.). W eksperymencie używano preparatów UspDBD z *D. melanogaster* otrzymanych przez dr inż. Iwonę Grad (2001) oraz mgr inż. Agnieszkę Kowalską i wsp. (2003). W uzyskaniu klonów cDNA zawierających mutacje w regionie α -helisy rozpoznającej element regulatorowy korzystano z pomocy magistrantki Pani Moniki Szyszki (2002).

Poniżej przedstawiono jedynie metody opracowane samodzielnie, bądź zmodyfikowane na potrzeby wykonania eksperymentów opisanych w niniejszej pracy.

Tabela 6.4. Standardowe metody i procedury wykorzystywane w pracy.

Eksperyment	Metody/Procedury
Przygotowanie komórek kompetentnych	Hanahan, 1992
Transformacja komórek kompetentnych plazmidowym DNA	Sambrook i wsp., 1989
Hodowla komórek bakteryjnych	Sambrook i wsp., 1989
Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi, ligacja, defosforylacja	Sambrook i wsp., 1989; instrukcje dostarczone przez producentów enzymów
Izolacja DNA po reakcji PCR	Zestaw odczynników „NUCLEOTRAP®CR” firmy Macherey-Nagel; procedura opracowana przez producenta
Izolacja DNA z żelu agarozowego	Zestaw odczynników „NUCLEOTRAP®” firmy Macherey-Nagel; procedura opracowana przez producenta
Miniizolacja plazmidowego DNA	Sambrook i wsp., 1989; „Miniprep Express™” firmy BIO 101; procedura opracowana przez producenta
Izolacja plazmidowego DNA ze 100 ml hodowli bakteryjnej	Zestaw odczynników „NUCLEOBOND® AX100” firmy Macherey-Nagel; procedura opracowana przez producenta
Elektroforeza analityczna i preparatywna w żelu agarozowym	Sambrook i wsp., 1989
Znakowanie DNA izotopem ³² P	Sambrook i wsp., 1989

Pomiary widm dichroizmu kołowego (CD)	Johnson, 1990
Oznaczanie stężenia DNA i białek przez pomiar absorpcji promieni UV o długości fal 260 nm i 280 nm	Sambrook i wsp., 1989

W Tabeli zebrano zastosowane w niniejszej pracy metody i procedury, które wykorzystywano zgodnie z zaleceniami producentów poszczególnych zestawów odczynników oraz standardowe procedury biologii molekularnej i inżynierii genetycznej opisane w literaturze. W lewej kolumnie przedstawione są eksperymenty a w prawej odpowiadające im metody i procedury na podstawie których przeprowadzano dany eksperyment.

6.2.1. Podstawowe techniki używane do pracy z DNA

6.2.1.1. Mutagenеза ukierunkowana metodą „megaprimera”

W celu uzyskania szeregu mutantów cDNA EcRDBD z *D. melanogaster* zawierających mutacje w obszarze kasety T oraz α -helisy rozpoznającej element regulatorowy, posłużono się techniką mutagenезы ukierunkowanej metodą tzw. „megaprimera” (Barik, 1995). Reakcje PCRI i PCRII (Saiki i wsp., 1988) przeprowadzano zgodnie z warunkami opracowanymi przez Grad (1997) i Orłowskiego (2000). W PCRI używano syntetycznych oligonukleotydów wprowadzających ukierunkowane mutacje ((6.1.5.1.1.) i (6.1.5.1.2.)). Poszczególne reszty aminokwasowe zamieniano na alaninę. W reakcji PCRI używano 50 pmoli starterów standardowo używanych do sekwencjonowania wektora pGEX-2T (6.1.3.1.): 5'-końcowego WRA 19 lub 3'-końcowego WRA 20 (6.1.5.2.), 50 pmoli odpowiedniego oligonukleotydu wprowadzającego mutację oraz 16 ng matrycy pGEX-2T/EcRDBD (Niedziela-Majka i wsp., 1998; Niedziela-Majka, 1999). Przybliżoną temperaturę hybrydyzacji starterów obliczono na podstawie empirycznego wzoru: $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) [^{\circ}\text{C}]$ (Wahl i wsp., 1987). Temperatury hybrydyzacji były zbliżone do 72°C. Hybrydyzację odcinków starterów oraz reakcje syntezy DNA przeprowadzano przez 25 cykli PCR, w temperaturze 72°C, w optymalnych warunkach dla polimerazy DNA *Vent*, w probówkach firmy Eppendorf do PCR o pojemności 0,5 ml, w aparacie UNO Thermoblock (BIOMETRA). Przed rozpoczęciem reakcji ostrożnie nawarstwiano na powierzchnię mieszaniny w probówkach olej mineralny. Po 5 min denaturacji DNA w 94°C (tzw. „gorący start”) dodawano polimerazę DNA *Vent* (0,5 μl polimerazy *Vent* $\cong$ 1U). Następnie próbka przechodziła odpowiednią ilość razy przez

cykl denaturacji w 94°C w ciągu 60 s i hybrydyzacji połączonej z polimeryzacją w 72°C przez 60 s. Końcową polimeryzację prowadzono przez 2 min w 72°C. Mieszaninę reakcyjną schładzano do 4°C.

Otrzymany w wyniku PCRI „megaprimer” izolowano po elektroforezie preparatywnej lub bezpośrednio po PCRI (Tabela 6.4.), a następnie przeprowadzano PCRII. W reakcji tej używano na każdą próbkę 0,27 µg matrycy pGEX-2T/EcRDBD (Niedziela-Majka i wsp., 1998; Niedziela-Majka, 1999), 10 pmoli standardowego 3'-końcowego startera WRA 20 (6.1.5.2.) do sekwencjonowania wektora pGEX-2T (6.1.3.1.) oraz całości oczyszczonego „megaprimer” (około 20 µl), przez 30 cykli PCR. Hybrydyzacja i amplifikacja DNA przeprowadzana była w czasie 70 s. Pozostałe warunki reakcji były takie same jak podczas PCRI. Wyniki analizowano przez elektroforezę analityczną w żelu agarozowym (Tabela 6.4.).

6.2.1.2. Klonowanie

Produkty reakcji PCRII, cDNA EcRDBD_{XYZ}⁹, oczyszczano po elektroforezie preparatywnej w żelu agarozowym metodą NUCLEOTRAP[®] (Macherey-Nagel) (Tabela 6.4.). Uzyskane cDNA trawiono enzymem restrykcyjnym *Bam*HI, oczyszczano, a następnie ligowano do uprzednio strawionego tym samym enzymem restrykcyjnym i defosforylowanego wektora pGEX-2T (6.1.5.2.) (Tabela 6.4.) (Orłowski, 2000). Po transformacji komórek kompetentnych NOVA BLUE (6.1.2.) przeprowadzano miniizolację plazmidowego DNA. Następnie, w celu identyfikacji klonów które uległy transformacji, przeprowadzano analizę restrykcyjną uzyskanego plazmidowego DNA, trawiąc je enzymem restrykcyjnym *Bam*HI (Tabela 6.4.) (Orłowski, 2000).

⁹ Indeks XYZ oznacza taką domenę EcRDBD, w której reszta aminokwasowa X w pozycji Y została zmutowana na resztę Z.

6.2.1.3. Analiza plazmidowego DNA uzyskanych klonów

6.2.1.3.1. Sprawdzenie przy pomocy PCR orientacji wklonowanego cDNA *EcRDBD_{XYZ}*

W celu sprawdzenia orientacji cDNA *EcRDBD_{XYZ}* wklonowanych w wektor pGEX-2T, wykonywano PCR wykorzystując startery komplementarne do wektora pGEX-2T oraz sekwencji cDNA *EcRDBD* (WR 9 i WR 10 (6.1.5.2.)), 2,5U polimerazy DNA DyNAzyme™ II w optymalnych dla enzymu warunkach oraz 15÷20 ng uzyskanej matrycy DNA (Orłowski, 2000). DNA denaturowano przez 5 min w temperaturze 94°C, po czym dodawano 2,5U polimerazy DNA DyNAzyme™ II. Następnie przez 20 cykli próbki: inkubowano przez 60 s w 94°C (denaturacja), 60 s w 60°C (hybrydyzacja) i 30 s w 72°C (amplifikacja). Pozostałe warunki reakcji były takie same jak podczas PCRI (6.2.1.1.) (Orłowski, 2000). Wynik reakcji analizowano przeprowadzając elektroforezę w żelu agarozowym (Tabela 6.4.).

6.2.1.3.2. Sekwencjonowanie plazmidowego DNA

Sekwencjonowanie rekombinowanego plazmidowego DNA (pGEX-2T/*EcRDBD_{XYZ}*, w przypadku pochodnych pGEX-2T z wklonowaną sekwencją kodującą *EcRDBD_{XYZ}*) przeprowadzano metodą Sanger (Sanger i wsp., 1977). Wykorzystywano zestawy do sekwencjonowania: „ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit” (Amersham Biosciences) oraz „CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit” (Fermentas) oraz aparat AlfExpress (Amersham Biosciences). Reakcje przeprowadzano wykorzystując parę standardowych starterów do sekwencjonowania wektora pGEX-2T (6.1.5.2.), dodatkowo posiadających na 5'-końcach przyłączony znacznik fluorescencyjny Cy-5 (5-N-N'-dietylotetrametyloindodikarbocyanina). Matrycowy DNA rozcieńczano do stężenia 0,3 µg/µl, natomiast startery do 5 pmol/µl (Orłowski, 2000). Alternatywnie w przypadku zestawu „CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit” (Fermentas) matrycowe DNA i startery rozcieńczano do stężeń: 0,35 µg/µl i 2 pmol/µl. Pozostałe warunki reakcji były zgodne z procedurami zalecanymi przez producentów zestawów.

6.2.1.4. Otrzymanie pochodnych wektora pGEX-2T zawierających cDNA EcRDBD_{ΔX} posiadających mutacje delecyjne w C-końcowych sekwencjach oraz cDNA UspDBD z *B. mori*

W celu otrzymania mutantów cDNA EcRDBD_{ΔX}¹⁰, cDNA UspDBD typu „dzikiego” z *B. mori* oraz mutantów cDNA EcRDBD_{ΔX} z *D. melanogaster* zawierających mutacje delecyjne w sekwencjach C-końcowych, wykorzystano standardowe procedury opisane w Materiałach i Metodach (6.2.1.).

Reakcje PCR wykonywano na odpowiednich matrycach kodujących pełnej długości cDNA EcR i Usp z *B. mori* (6.1.3.2.) oraz pGEX-2T/EcRDBD (Niedziela-Majka i wsp., 1998; Niedziela-Majka, 1999), w standardowych warunkach (Sambrook i wsp., 1989). Fragmenty DNA otrzymane dla danego białka kodowały polipeptydy różniące się długością sekwencji leżących na C-końcu drugich modułów cynkowych (szczegóły podano w Wynikach, Roz.6.1.2.). Startery zaprojektowano tak, aby wygenerować miejsce *Bam*HI na obu końcach sekwencji kodujących cDNA EcRDBD_{ΔX} z *D. melanogaster* i z *B. mori* oraz *Bam*HI i *Eco*RI, odpowiednio na 5' i 3'-końcu sekwencji kodującej UspDBD z *B. mori* (6.1.5.2.).

Reakcje PCR przeprowadzane były w następujący sposób: 5 min wstępnej denaturacji w temperaturze 94°C, dodanie 1 U polimerazy DNA *Vent*, a następnie 5 cykli: 1 min denaturacji w temperaturze 94°C; 1 min hybrydyzacji w odpowiedniej dla danej pary starterów temperaturze; 0,5 min amplifikacji DNA w temperaturze 72°C, a następnie 20 cykli: 1 min denaturacji w 94°C i 1 min inkubacji w 72°C (hybrydyzacja i amplifikacja). Ostatnim etapem była amplifikacja DNA przez 2 min w temperaturze 72°C. Mieszaninę reakcyjną schładzano do temperatury 4°C.

Uzyskane cDNA EcRDBD_{ΔX} trawiono enzymem restrykcyjnym *Bam*HI, natomiast UspDBD enzymami *Bam*HI i *Eco*RI (Tabela 6.4.). Następnie, po elektroforezie preparatywnej i oczyszczeniu, ligowano je do trawionego odpowiednimi analogicznymi enzymami restrykcyjnymi i defosforylowanego wektora pGEX-2T (6.1.5.2.). Po transformacji komórek kompetentnych i miniizolacji plazmidowego DNA, przeprowadzano analizę uzyskanych plazmidowych DNA, trawiąc je odpowiednimi enzymami. Następnie sprawdzano orientację wklonowanych cDNA EcRDBD_{ΔX} (6.2.1.3.1.). Analizy orientacji nie wykonywano dla klonów zawierających cDNA UspDBD, ponieważ w przypadku tej domeny klonowanie było

¹⁰ Indeks ΔX oznacza mutantu EcRDBD zawierającego mutację delecyjną przy reszcie aminokwasowej X w C-końcowej sekwencji.

ukierunkowane. Poprawność sekwencji sprawdzano wykonując sekwencjonowanie (6.2.1.3.2.).

6.2.2. Metody wykorzystywane podczas syntezy i oczyszczania rekombinowanych białek

6.2.2.1. Kontrola syntezy białek fuzyjnych z GST w klonach komórek NOVA BLUE po transformacji mieszaniną ligacyjną

W celu zbadania zdolności uzyskanych klonów pGEX-2T/EcRDBD_{XYZ} do produkcji białek, przeprowadzano próbną indukcję ekspresji białek w fuzji z GST. Hodowlę przeprowadzano w około 4 ml, według procedury opisanej przez Niedzielę-Majkę (1999). Hodowlę prowadzono całą noc w 37°C, na wytrząsarce rotacyjnej przy 182 obr/min. Następnie do świeżych sterylnych probówek zawierających 4 ml pożywki płynnej LB z karbenicyliną (6.1.4.) dodawano 0,5 ml wyhodowanego wcześniej inoculum. Hodowlę prowadzono w 37°C, przy 182 obr/min, do momentu uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6±0,8. Następnie pobierano po 1 ml zawiesiny bakteryjnej do probówek Eppendorfa o pojemności 1,5 ml, aby przygotować próbki kontrolne. Pobrane zawiesiny odwirowywano w wirówce stołowej Eppendorfa 5415D przez 4 min, przy 13200 obr/min, w temperaturze pokojowej. Po odrzuceniu supernatantu osad zawieszano w 75 µl buforu 2×SB zawierającego β-merkaptobetanol (6.1.4.). Tak przygotowane próbki przechowywano w -20°C do późniejszej analizy. Po pobraniu próbek kontrolnych do pozostałych hodowli dodawano IPTG w stężeniu końcowym 0,5 mM, ZnCl₂ w stężeniu końcowym 50 µM i inkubowano przez 2 h w 37°C, przy 182 obr/min. Po inkubacji pobierano po 1 ml zawiesiny i postępowano z próbkami j.w.. Syntezę białka fuzyjnego analizowano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (6.2.3.1.) (Niedziela-Majka, 1999; Orłowski, 2000).

6.2.2.2. Przygotowanie zawiesin glicerolowych komórek BL21(DE3)pLysS transformowanych rekombinowanymi plazmidami pGEX-2T

Komórki szczepu BL21(DE3)pLysS transfekowano wybranym klonem plazmidu pGEX-2T z wklonowaną sekwencją kodującą cDNA EcRDBD_{XYZ}. Pojedynczą kolonię przenoszono

sterylną końcówką do pipet automatycznych (o pojemności 2-200 μ l) do pożywki płynnej LB zawierającej karbenicylinę i chloramfenikol w odpowiednich stężeniach (6.1.4.) i hodowano do uzyskania gęstości optycznej $OD_{600}=0,6\pm0,8$. Pobierano po 0,9 ml kultury bakteryjnej i dodawano 0,1 ml 80% (v/v) sterylnego roztworu glicerolu, dokładnie mieszano i zamrażano w -80°C .

6.2.2.3. Synteza białek fuzyjnych z GST w bakteriach BL21(DE3)pLysS

W celu zbadania rozpuszczalności produktów ekspresji, otrzymane mutanty EcRDBD_{XYZ} ekspresjonowano w komórkach szczepu BL21(DE3)pLysS (6.1.2.). Z przygotowanej zawiesiny komórek bakteryjnych w glicerolu (6.2.2.2.) pobierano niewielką ilość sterylną końcówką do pipety automatycznej (o pojemności 2-200 μ l) i przenoszono do 30 ml pożywki płynnej LB zawierającej karbenicylinę i chloramfenikol (6.1.4.). Hodowlę prowadzono około 16 h., w temperaturze 29°C , na wytrząsarce rotacyjnej (182 obr/min). Następnie pobierano po 2,5 ml tak uzyskanego inoculum i zaszczepiano nim 50 ml świeżej pożywki płynnej LB zawierającej karbenicylinę i chloramfenikol (6.1.4.). Hodowlę prowadzono w 29°C (182 obr/min) do osiągnięcia $OD_{600}=0,5\pm0,7$. Następnie po przygotowaniu próbek kontrolnych (6.2.2.1.) do pozostałych hodowli dodawano IPTG w stężeniu końcowym 0,5 mM oraz ZnCl_2 w stężeniu końcowym 50 μM i ponownie inkubowano przez 4 h w 29°C (182 obr/min). Kontrolę ekspresji białek przeprowadzano poprzez pobieranie po 1ml zawiesin komórek po 0,5 h, po 1 h i co godzinę od momentu dodania IPTG. Próbkę przygotowywano zgodnie z procedurą opracowaną przez Niedzielę-Majkę (1999). Syntezę białek analizowano elektroforetycznie w SDS-PAGE (6.2.3.1.), identyfikując prążki o ruchliwościach odpowiadających rekombinowanym białkom GST-EcRDBD_{XYZ} (Niedziela-Majka, 1999; Orłowski, 2000).

6.2.2.4. Przygotowanie ekstraktów komórek BL21(DE3)pLysS

W celu przygotowania inoculum do hodowli, pojedynczą kolonię pobraną z płytki po transformacji sterylną końcówką do pipet automatycznych (o pojemności 2-200 μ l) przenoszono do 30 ml pożywki płynnej LB z chloramfenikolem i karbenicyliną (6.1.4.) i inkubowano około 16 h (29°C , 182 obr/min). Alternatywnie, pojedynczą kolonię pobraną sterylnie z płytki po transformacji przenoszono do 30 ml pożywki płynnej LB z

antybiotykami (Niedziela-Majka, 1999). Hodowlę właściwą prowadzono w 400 ml LB, zaszczipiając 4 ml przygotowanego inoculum 2×200 ml pożywki LB. Hodowlę prowadzono do uzyskania gęstości optycznej $OD_{600}=0,5 \pm 0,7$. Następnie dodawano IPTG w stężeniu końcowym 0,5 mM oraz $ZnCl_2$ w stężeniu końcowym 50 μM i ponownie inkubowano przez 2 h. Po inkubacji z IPTG, 400 ml hodowli bakterii schładzano na lodzie, przenoszono do konicznych probówek o pojemności 50 ml typu *Grainer*¹¹ i wirowano w wirówce Eppendorf 5810R ($5000 \times g$, 4°C, 10 min). Pożywkę nad osadu odrzucano i dodawano kolejną porcję 50 ml hodowli; postępowanie powtarzano trzykrotnie tak, że ostatecznie w jednej probówce zbierano masę komórkową z 200 ml kultury bakteryjnej. Komórki przemywano 8 ml buforu A (6.1.4.) o temperaturze 4°C, ponownie odwirowywano j.w. i zawieszano w 8 ml buforu A, po czym zamrażano w -80°C. Następnie komórki bakteryjne poddawano lizie przez przeniesienie ich z -80°C na lód. W celu strawienia kwasów nukleinowych, ekstrakt inkubowano następnie z DNazą I (5 $\mu g/ml$) i RNazą A (7,5 $\mu g/ml$), delikatnie mieszając. Inkubację prowadzono na lodzie do momentu utraty lepkości (około 2 h).

6.2.2.5. *Oczyszczanie białek EcRDBD_{XYZ} zawierających mutacje w regionie kasety T i α -helisy rozpoznającej element regulatorowy*

Oczyszczanie EcRDBD_{XYZ} zawierających mutacje w regionie kasety T i α -helisy rozpoznającej element regulatorowy przeprowadzano zgodnie z procedurą przedstawioną schematycznie w Wynikach na Rys.7.3., opracowaną przez Niedzielę-Majkę (1999). Poniżej opisano jedynie główne kroki oczyszczania z uwzględnieniem ewentualnych odstępstw od oryginalnej procedury. Wszystkie etapy wykonywane były w temperaturze 0-4°C, z wyjątkiem oczyszczania na kolumnie Superdex 75HR (6.2.2.5.4.).

6.2.2.5.1. *Frakcjonowanie białek komórkowych przy pomocy siarczanu amonu*

Ekstrakty komórek BL21(DE3)pLysS/pGEX-2T/EcRDBD_{XYZ} otrzymane z 400 ml hodowli (6.2.2.4.) wirowano w wirówce Eppendorf 5810R ($17000 \times g$, 4°C, 90 min). Klarowny roztwór (około 16 ml) przenoszono (po około 8 ml) do dwóch probówek o pojemności 12 ml (typu *Grainer*) i białka wysalano siarczanem amonu (Niedziela-Majka,

¹¹ W eksperymentach używano probówek konicznych firmy Grainer (o pojemności 50 ml), będących odpowiednikiem wyrobu firmy Falcon.

1999). Sproszkowany $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dodawany był małymi porcjami w ciągu 1 h (przy ciągłym mieszaniu na mieszadle magnetycznym), do uzyskania określonego stężenia końcowego, po czym roztwór mieszano przez kolejne 30 min. Po wstępnym wysoleniu w zakresie 0-30% preparat odwirowywano ($16500 \times g$, 4°C , 30 min) i osad odrzucano. Supernatant ponownie poddawano wysoleniu w zakresie 30-50% wysycenia. Roztwór przechowywano przez noc w 4°C . Po odwirowaniu (j.w.) osad białek zawieszano w 1 ml buforu B (6.1.4.). W celu usunięcia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, roztwór białek nanoszono na kolumnę PD-10 wyrównoważoną buforem B (6.1.4.), a następnie frakcje szczytowe zawierające białka łączono i poddawano chromatografii na złożu Heparin Sepharose™ CL-6B (Amersham Biosciences) (6.2.2.5.2.) (Niedziela-Majka, 1999).

6.2.2.5.2. Chromatografia powinowactwa na złożu Heparin Sepharose™ CL-6B

Uzyskane po kolumnie PD-10 frakcje (6.2.2.5.1.) nanoszono grawitacyjnie na kolumnkę wypełnioną złożem Heparin Sepharose™ CL-6B wyrównoważoną buforem B (6.1.4) i przeprowadzano chromatografię w buforze B, stosując nieciągły gradient NaCl (100 mM, 400 mM i 650 mM) (Niedziela-Majka, 1999). Za każdym razem złożo przemywano 10 ml buforu B, zawierającego określone stężenie NaCl i zbierano 1 ml frakcje. Słabo związane białka odmywano 10 ml buforu B z NaCl w stężeniu 100 mM i 400 mM. Białka związane do złoża wymywano 10 ml buforu B z wysokim stężeniem NaCl (650 mM). Wykreślano profil kolumny mierząc absorbancję frakcji przy 280 nm. Frakcje zawierające białko fuzyjne GST-EcRDBD_{XYZ} łączono i zagęszczano do około 2 ml przez ultrafiltrację, wykorzystując aparat Amicon 30 (Millipore) zgodnie z zaleceniami producenta. W celu wymiany buforu B zawierającego NaCl o stężeniu 650 mM na niższe (150 mM), preparaty nanoszono na kolumnę PD-10 wyrównoważoną buforem B o stężeniu NaCl 150 mM. Frakcje (1 ml) zawierające GST-EcRDBD_{XYZ} zagęszczano ponownie do około 1,5 ml przez ultrafiltrację (j.w.).

6.2.2.5.3. Chromatografia powinowactwa na złożu Glutathione Sepharose™ 4B

W celu oddzielenia GST od EcRDBD_{XYZ}, uzyskany preparat białkowy w wyniku przeprowadzenia chromatografii powinowactwa na Heparin Sepharose™ CL-6B (6.2.2.5.2.), trawiono trombiną w probówce firmy Eppendorf, w ustalonych eksperymentalnie przez Niedzielę-Majkę (1999) warunkach. Po trawieniu, preparat (około 1,5 ml) nanoszono na kolumnę zawierającą 1 ml złoża Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences), zrównoważonego uprzednio buforem B (6.1.4.) z 150 mM NaCl. Następnie złoże inkubowano z preparatem białek przez 1 h, delikatnie mieszając. Po sedymentacji żelu, niezwiązane białka wymywano z kolumny buforem B z 150 mM NaCl i zbierano 1 ml frakcje. Profil kolumny wykreślano mierząc absorbancję frakcji przy 280 nm. Frakcje szczytowe łączono i zagęszczano do 0,2 ml przez ultrafiltrację, wykorzystując aparaty Amicon 10 (Millipore) zgodnie z zaleceniami producenta. Zagęszczony roztwór odwirowywano w wirówce Eppendorf 5810R ($18500 \times g$, 4°C, 20 min), w celu odrzucenia zdenaturowanych białek.

6.2.2.5.4. Sączenie molekularne na kolumnie Superdex 75HR

Sączenie molekularne wykonywano przy użyciu kolumny Superdex 75HR (Amersham Bioscience), stosując aparat do HPLC (Pharmacia LKB). Na kolumnę wyrównoważoną dwoma objętościami buforu C (6.1.4.) nakładano uzyskane po ultrafiltracji (6.2.2.5.3.) 0,2 ml białek. Przeprowadzano sączenie przy prędkości przepływu 0,5 ml/min, zbierając frakcje o objętości 0,25 ml. Frakcje zawierające oczyszczone białka łączono i po wymieszanu mierzono absorbancję preparatu przy 280 nm. Oczyszczone białko dzielono na 15-30 µl porcje i przechowywano w -80°C. Poszczególne frakcje analizowano w SDS-PAGE (6.2.3.1.).

6.2.2.6. Oczyszczanie białek EcRDBD_{ΔX} z *D. melanogaster* i *B. mori* zawierających mutacje delecyjne w C-końcowych sekwencjach oraz UspDBD z *B. mori*

Oczyszczanie mutantów EcRDBD_{ΔX} z *D. melanogaster* i *B. mori* zawierających mutacje delecyjne w C-końcowych sekwencjach oraz białka UspDBD typu „dzikiego” z *B. mori* przeprowadzano zgodnie z procedurą opracowaną dla białka UspDBD typu „dzikiego” z *D. melanogaster*, opisaną przez Grad (2001) oraz zmodyfikowaną przez Kowalską i wsp.

(2003). W celu uzyskania preparatu białka EcRDBD_{ΔX} z *D. melanogaster* pozbawionego przypuszczalnej kasety A, wykorzystano plazmid pGEX-2T/EcRDBD₃₃₈ (Niedziela-Majka, 1999). Ekstrakty komórek BL21(DE3)pLysS/pGEX-2T/EcRDBD_{ΔX} oraz BL21(DE3)pLysS/pGEX-2T/UspDBD, po lizie (6.2.2.4.) i odwirowaniu w wirówce Eppendorf 5810R ($17000 \times g$, 4°C, 90 min), наносzono bezpośrednio na kolumnę wypełnioną 0,7 ml złoża Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences), wyrównowanego uprzednio buforem B (6.1.4.) zawierającym 750 mM NaCl. Po 2 h inkubacji w temp. 4°C, w celu wypłukania niezwiązanych ze złożem białek, kolumnę przemywano dwudziestoma objętościami buforu A (750 mM NaCl). Po naniesieniu 0,7 ml porcji buforu A (750 mM NaCl) zamykano kolumnę i po delikatnym wymieszaniu inkubowano ponownie przez około 1 h. Ponownie przepłukiwano około dziesięcioma objętościami buforu A (750 mM NaCl), a następnie odtrawiano trombiną związane ze złożem białko. W tym celu po dodaniu do roztworu nad złożem 2,5 mM CaCl₂ inkubowano białka z 4,3 μg trombiny (35,3 U tzw. ang. „cleavage units”; stosunek wagowy proteazy do substratu wynosił około 1:1500) (Niedziela-Majka, 1998; Niedziela-Majka, 1999) przez noc w 4°C. Po całkowitym trawieniu, białko wypłukiwano z kolumny pięcioma objętościami buforu A (750 mM NaCl). Zbierano 1 ml frakcje i wykresłano profil kolumny, mierząc absorbancję frakcji przy 280 nm. Następnie frakcje zagęszczano (6.2.2.5.3.) i przeprowadzano sączenie molekularne na kolumnie Superdex 75HR (Amersham Biosciences) (6.2.2.5.4.).

6.2.3. Metody stosowane do analizy rekombinowanych białek

6.2.3.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE)

Elektroforezę prowadzono w układzie nieciągłym według Laemmliego (1970) w standardowych warunkach (Sambrook i wsp., 1989) (6.1.4.). Do wyznaczania względnych mas cząsteczkowych używano mieszanin białek standardowych LMW (Bio-Rad) lub PMW (Fermentas) (6.1.1.). Po zakończeniu elektroforezy z żeli usuwano SDS przez 20 min inkubacji w roztworze do odbarwiania SDS-PAGE (6.1.4.), a następnie barwiono je przez około 12 h w roztworze do barwienia SDS-PAGE (6.1.4.). Po odbarwieniu, żełe utrwalano przez 12 h w roztworze do utrwalania (6.1.4.), dokumentowano w aparacie Pharmacia

Biotech ImageMaster[®]VDR (Amersham Bioscience) i suszono w suszarce próżniowej do żeli poliakrylamidowych (Model 583, Bio-Rad).

6.2.3.2. Określanie czystości preparatów białkowych

Czystość preparatów białkowych sprawdzano przez ich analizę w żelach poliakrylamidowych barwionych Coomassie Blue R250 (6.2.3.1.).

6.2.3.3. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie oczyszczonych rekombinowanych białek określano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm (Gill i von Hippel, 1989). Molowe współczynniki absorpcji białek przyjęto za Niedzielą-Majką (1999) oraz wykorzystując program ProtParam Tool (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) (Tabela 6.5.).

Tabela 6.5. Wybrane parametry fizyko-chemiczne otrzymanych rekombinowanych białek typu „dzikiego” i posiadających mutacje delecyjne w C-końcowych sekwencjach.

Rekombinowane białko	<i>m</i> [Da]	ϵ_{280} [M⁻¹cm⁻¹]	$A_{280}^{0,1\%}$ [ml/mg x cm]
EcRDBD <i>D.m.</i>	13494	5840	0,433
UspDBD <i>D.m.</i>	12063	7000	0,580
EcRDBD _{Δ92} <i>D.m.</i>	12537	5840	0,466
EcRDBD _{Δ85} <i>D.m.</i>	11695	5840	0,499
EcRDBD _{Δ75} <i>D.m.</i>	10449	5720	0,547
EcRDBD <i>B.m.</i>	13492	5720	0,424
UspDBD <i>B.m.</i>	12173	7000	0,575
EcRDBD _{Δ89} <i>B.m.</i>	12165	5720	0,470
EcRDBD _{Δ75} <i>B.m.</i>	10524	5720	0,544

Przedstawione w Tabeli parametry białek uzyskano korzystając z programu ProtParam Tool (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>). Masy cząsteczkowe białek (*m*) obliczono na podstawie opublikowanych sekwencji aminokwasowych z uwzględnieniem reszt dołączonych z wektora pGEX-2T (Rys.7.10. (7.1.2.)). Pełne sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe białek EcR i Usp zamieszczono w Dodatku (I-IV). Wartości $A_{280}^{0,1\%}$ wykorzystywano do obliczania stężenia preparatów białek z pomiarów A_{280} .

6.2.3.4. Badanie oddziaływań rekombinowanych białek z DNA

Specyficzne oddziaływanie otrzymanych rekombinowanych białek z DNA analizowano wykorzystując technikę EMSA (ang., *electrophoretic mobility shift assay*) (Fried i Crothers, 1989). Postępowano zgodnie z procedurą opracowaną przez Niedzielę-Majkę (1999). Jako sondę DNA wykorzystywano ds oligonukleotydy (33 par zasad) (6.1.5.2.), zawierające sekwencję nukleotydową, do której badano wiązanie. W eksperymentach EMSA zaznakowaną ^{32}P na 5'-końcu sondę (20-45 fmoli) inkubowano ze wzrastającymi ilościami rekombinowanego białka lub równomolowej mieszaniny białek, w końcowej objętości 25 μl , w buforze C (6.1.4.) bez ZnCl_2 , zawierającym 100 mM NaCl i 0,5 mg/ml albuminy z jaj kurzych. Próbkę zawierały nadmiar molowy wysokocząsteczkowego niespecyficznego kompetitora - poli(dI-dC) (110 ng). Po zakończeniu elektroforezy, żełe przenoszono na bibułę *Whatman 3* i suszono w temperaturze 80°C przez 2 h, w suszarce próżniowej do żeli poliakrylamidowych (Model 583, Bio-Rad). Po wysuszeniu, żełe eksponowano do specjalnych odwzorowujących płyt (Imaging Plates BAS-MS 2325 i/lub 2340, Fuji Photo Film, Japan). Sygnały fluorescencyjne z płyt skanowano wykorzystując aparat Fuji Film FLA-3000 Fluorescent Image Analyzer (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Germany). Skany rejestrowano przy rozdzielczości 50- μm z 16-bitową głębią, a następnie poddawano ilościowej analizie wykorzystując oprogramowanie AIDA Bio-Package (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Germany).

6.2.3.5. Pomiary widm dichroizmu kołowego (CD)

Widma dichroizmu kołowego (CD; ang., *circular dichroism*) rekombinowanych białek rejestrowano na spektropolarymetrze Jasco J-715 (Jasco International, Japan), w kuwecie o długości drogi optycznej 0,1 cm, termostатовanej w 20°C, w buforze C (6.1.4.), z 1,0 s czasem odpowiedzi i rozdzielczością 1,0 nm. Eliptyczność monitorowano w zakresie 190-260 nm. Stężenia białek wynosiły 10,0 μM . Każde zarejestrowane przez aparat widmo CD stanowiło rezultat akumulacji i uśrednienia pięciu widm pojedynczego pomiaru. Prezentowane w Wynikach widma CD (Rys.7.7. (7.1.1.4.), Rys.7.9. (7.1.1.5.) i Rys.7.20. (7.2.1.4.)) stanowią średnią z trzech niezależnych pomiarów.

Przewidywanie zawartości struktury drugorzędowej rekombinowanych białek na podstawie analizy widm CD przeprowadzono używając programu: CONTIN/LL z pakietu CDDPro (<http://lamar.colostate.edu/sreeram/CDDPro>) (Sreerama i Woody, 2000).

6.2.3.6. Denaturacja chemiczna z użyciem chlorowodorku guanidyny

Profile denaturacyjne rekombinowanych białek monitorowano poprzez pomiary fluorescencji reszt tyrozylowych (długość fali UV wzbudzenia (λ_{ex}) wynosiła 275 nm, natomiast długość fali UV emisji (λ_{em}) 305 nm), w aparacie Fluorolog-3 (Jobin-Yvon/Spex Horiba, France), w kwarcowych kuwetach o długości drogi optycznej 1,0 cm, termostatowanych w 18°C. Stężenia białek wynosiły 11,5 μM (9,0 μM dla mutantu V72I/P73Q/N75P). Do danego roztworu rekombinowanego białka w buforze C (6.1.4.), znajdującego się podczas przeprowadzania eksperymentu w kuwecie, dodawano stężony (7,0 M) roztwór chlorowodorku guanidyny (GdmCl). W celu uzyskania odpowiedniego stężenia denaturanta w próbce, zdefiniowane objętości badanej próbki pobierano z inkubowanego roztworu, a następnie odpowiadające im objętości stężonego (7,0 M) roztworu chlorowodorku guanidyny dodawano do kuwety tak, aby utrzymywać końcową objętość inkubowanego roztworu, wynoszącą 500 μl . Każdy punkt pomiarowy obliczano uwzględniając zmiany w stężeniu białka i denaturanta w badanym roztworze znajdującym się w kuwecie.

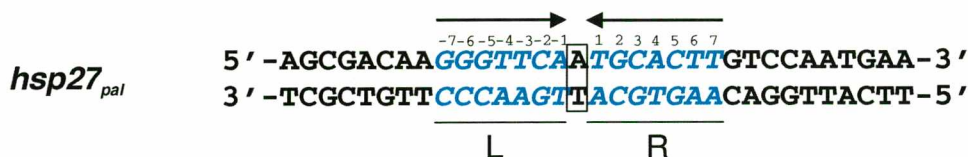
6.2.3.7. Renaturacja

W celu sprawdzenia zdolności zdenaturowanych chlorowodorkiem guanidyny białek do odzyskania swoich natywnych aktywności wiązania *hsp27_{pal}*, przeprowadzono eksperymenty renaturacji. Badanie oddziaływania renaturowanych białek z DNA analizowano wykorzystując technikę EMSA (6.2.3.4.).

W tym celu białka (8,7 μM , bufor C (6.1.4.)) poddawano denaturacji poprzez inkubację na lodzie, przez 1 h, z 4,0 M chlorowodorkiem guanidyny, a następnie rozcieńczano buforem C tak, aby uzyskać 0,625 M stężenie denaturanta. Próbkę inkubowano przez 0,5 h na lodzie. Po inkubacji przygotowywano próbki do eksperymentu EMSA (6.2.3.4.), w których końcowe stężenie białka wynosiło 218 nM a denaturanta 0,1 M. Eksperyment przeprowadzano w standardowych warunkach (6.2.3.4.), przy czym wszystkie próbki przed naniesieniem na żel inkubowano przez 1 h z zaznakowaną ^{32}P na 5'-końcu sondą *hsp27_{pal}*.

7.1. ROLA C-TERMINALNEJ SEKWENCJI BIAŁKA EcRDBD W SPECYFICZNYM ODDZIAŁYWANIU Z ELEMENTEM REGULATORYWYM *hsp27_{pal}*

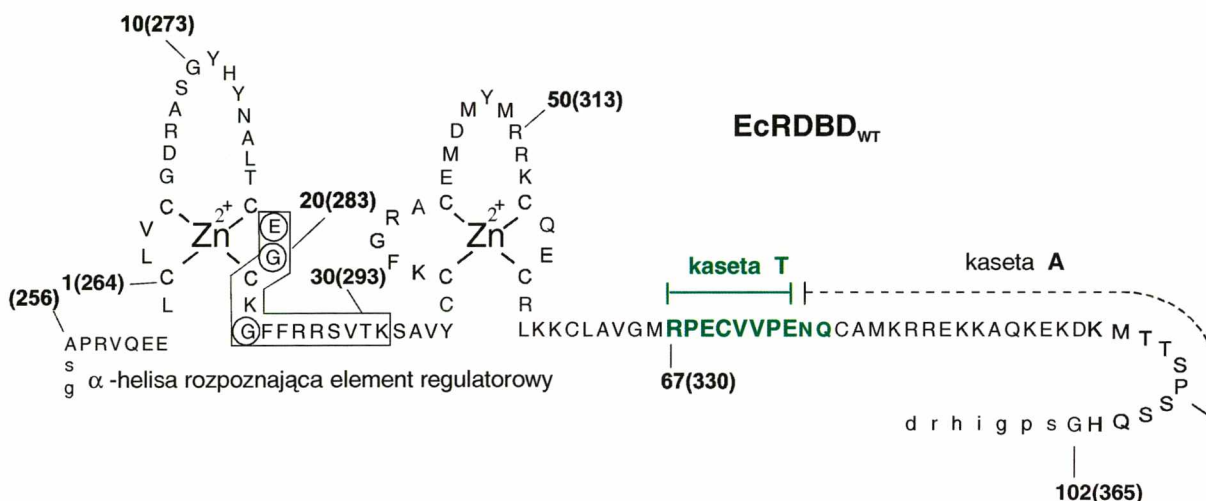
Jednym z kluczowych elementów dla homo- i heterodimeryzacji niektórych receptorów jądrowych kręgowców na elementach regulatorowych zorganizowanych w postaci bezpośredniego powtórzenia jest region CTE domeny wiążącej DNA, w szczególności wchodzące w jego skład kasety: T i A (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Wyniki otrzymane przez Niedzielę-Majkę i wsp. (2000) pokazały, że heterodimer utworzony przez UspDBD i EcRDBD wiąże się do elementu *hsp27_{pal}* (Rys.7.1.) w sposób synergiczny ze zdefiniowaną „polarnością” (3.4.3.). Ponadto pokazano, że EcRDBD w nieobecności partnera, białka UspDBD, wiąże się kooperatywnie do *hsp27_{pal}* w postaci homodimeru. Przypuszcza się, że w tworzeniu kompleksów na *hsp27_{pal}* najprawdopodobniej istotna jest sekwencja CTE EcRDBD (Niedziela-Majka i wsp., 2000).



Rys.7.1. Sekwencja wykorzystywanego w pracy ds oligonukleotydu *hsp27_{pal}*.

Sekwencja obejmuje fragment regionu promotorowego genu *hsp27 D. melanogaster* (Riddihough i Pelham, 1987). Niedoskonały palindrom centralny (Ożyhar i wsp., 1991; Antoniewski i wsp., 1993) zaznaczono strzałkami. Cyfry oznaczają kolejność reszt nukleotydowych (kolor niebieski) niedoskonałego palindromu w stosunku do osi symetrii elementu. Ramką oznaczono reszty nukleotydowe odstępnika. Przez (L) oznaczono 5'-końcowe półmiejscę, natomiast przez (R) 3'-końcowe półmiejscę elementu *hsp27_{pal}*.

7.1.1. Mutacje białka EcRDBD w regionie przypuszczalnej kasety T



Rys.7.2. Schemat struktury pierwszorzędowej EcRDBD_{WT}¹².

Reszty ponumerowano w stosunku do pierwszej cysteiny koordynującej atom cynku w module I, bądź (w nawiasach) w stosunku do pierwszej N-końcowej reszty całego białka (Dodatek I). Małymi literami zaznaczono reszty aminokwasowe dodane do DBD z wektora pGEX-2T, przy czym na N-końcu pokazano jedynie reszty pozostałe po trawieniu trombiną GST-EcRDBD_{WT}. Na zielono zaznaczono mutowane reszty regionu kasety T. Pierwszą resztą z kasety T, którą poddano mutacji była R67, natomiast ostatnią E74. Mutagenezie poddano również dwie reszty, N75 i Q76 należące do N-końca przypuszczalnej kasety A, którą oznaczono linią przerywaną. Ramka obejmuje przypuszczalną α -helisę rozpoznającą element regulatorowy. Kółkami zaznaczono reszty kasety P. Na podstawie Niedzieli-Majki (1999).

Wpływ określonych reszt aminokwasowych w białku na jego funkcje biologiczne i właściwości fizykochemiczne bada się często konstruując szereg mutantów posiadających w miejscu danej reszty podstawiony inny aminokwas. W celu zbadania roli poszczególnych reszt aminokwasowych wchodzących w skład kasety T białka EcRDBD (Rys.7.2.) w tworzeniu specyficznych kompleksów na *hsp27_{pal}*, postanowiono wprowadzić w tym regionie mutacje punktowe. Jedną z najpowszechniej wykorzystywanych w laboratorium biologii molekularnej i inżynierii genetycznej metod wprowadzania mutacji punktowych jest technika mutagenezy ukierunkowanej metodą tzw. „megaprimer” (Barik, 1995) (6.2.1.1.).

Otrzymano dziesięć mutantów cDNA EcRDBD z *D. melanogaster*, w których poszczególne kodony aminokwasów z regionu kasety T zamieniono na kodony małego, pozbawionego rozbudowanego łańcucha bocznego aminokwasu jakim jest alanina. Technika ta określana jest mianem tzw. „skaningu alaninowego” (Morrison i Weiss, 2001). Pierwszą resztą, której kodon poddano mutacji była R67, natomiast ostatnią E74. Mutagenezie ukierunkowanej

¹² Indeks WT oznacza białko tzw. typu „dzikiego” (ang., *wild type*), co oznacza białko zawierające oryginalną, tzn. nie poddaną mutacji sekwencję.

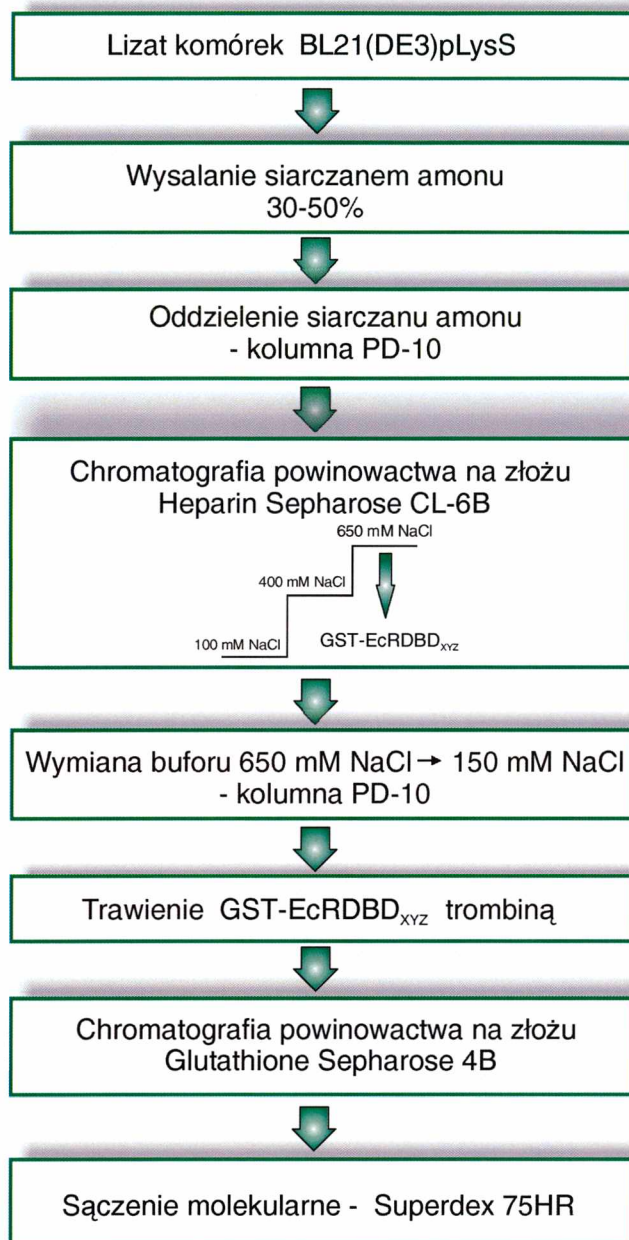
poddano również dwie dodatkowe reszty, N75 i Q76 należące do N-końca przypuszczalnej kasety A (Rys.7.2.).

7.1.1.1. Otrzymanie zmutowanych białek *EcRDBD_{XYZ}*¹³ oraz *EcRDBD_{WT}*

W celu przeprowadzenia analiz oddziaływania mutantów *EcRDBD_{XYZ}* posiadających mutacje punktowe w regionie kasety T z DNA, koniecznym było uzyskanie oczyszczonych preparatów białkowych. Do izolacji zmutowanych białek z ekstraktów bakteryjnych postanowiono posłużyć się procedurą opracowaną przez Niedzielę-Majkę (1999), opisaną szczegółowo w Materiałach i Metodach (6.2.2.5.). Metoda ta wykorzystuje zdolność domen wiążących DNA do wiązania analogu kwasu nukleinowego jakim jest heparyna (Heparin Sepharose™ CL-6B) oraz specyficzne oddziaływanie glutationo-S-transferazy (białka ekspresjonowano w fuzji z umieszczoną na N-końcu GST) (6.2.2.3.) z jej zimmobilizowanym ze złożem (Glutathione Sepharose™ 4B) naturalnym substratem jakim jest glutation. Etapy dializy obecne w oryginalnej procedurze (Niedziela-Majka, 1999) postanowiono zastąpić sączeniem molekularnym na kolumnie PD-10, ponieważ podczas wstępnych preparacji zaobserwowano, że użycie kolumny PD-10 ogranicza wytrącanie się białek z roztworu. Dodatkowym powodem modyfikacji oryginalnej procedury była chęć uproszczenia metody, co umożliwiałoby szybszą izolację mutantów (skrócenie czasu preparacji z czterech dni do około trzech) oraz zwiększenie wydajności oczyszczania. Ostatecznie posłużono się zmodyfikowaną procedurą, składającą się z pięciu głównych etapów (Rys.7.3.). Uzyskany lizat komórek BL21(DE3)pLysS/pGEX-2T/*EcRDBD_{XYZ}* (6.2.2.4.) wysalano stopniowo siarczanem amonu w określonym zakresie wysycenia (6.2.2.5.1.), a następnie, po oddzieleniu (NH₄)₂SO₄ na PD-10, przeprowadzano chromatografię na złożu Heparin Sepharose™ CL-6B (6.2.2.5.2.). Po wymianie buforu zawierającego 650 mM NaCl na bufor o niższym stężeniu soli (150 mM NaCl) (PD-10), białka GST-*EcRDBD_{XYZ}* trawiono przez noc trombiną (6.2.2.5.3.), a następnie, po chromatografii powinowactwa na złożu Glutathione Sepharose™ 4B (6.2.2.5.3.), białka *EcRDBD_{XYZ}* oczyszczono przy pomocy sączenia molekularnego na kolumnie Superdex 75HR (6.2.2.5.4.). Ostatecznie uzyskano preparaty w wysokim stopniu oczyszczone, co zostało stwierdzone dzięki analizie w elektroforezie SDS-PAGE (Rys.7.4.).

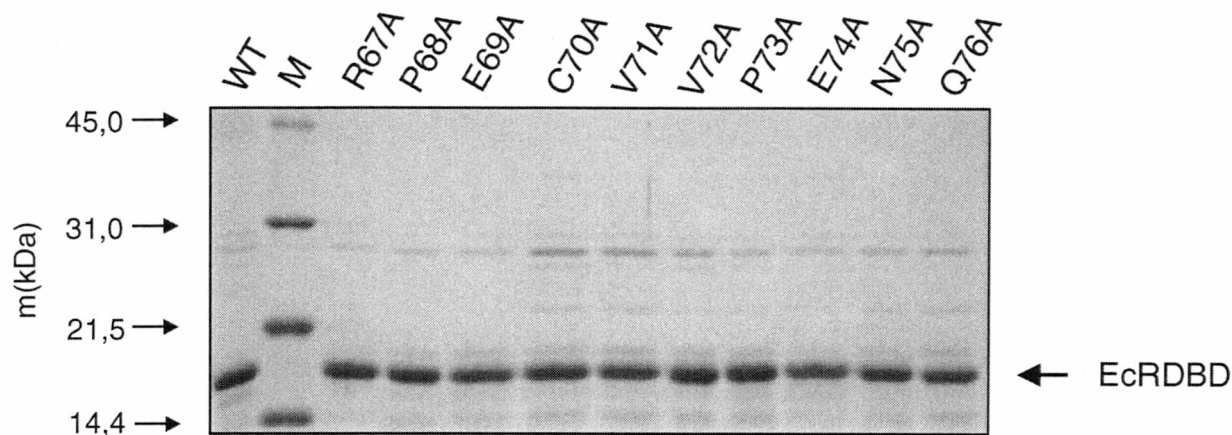
¹³ W dalszej części pracy używany będzie skrót *EcRDBD_{XYZ}* lub XYZ oznaczający zmutowane domeny wykorzystywane w eksperymentach. Oznaczenia podstawione w miejsce XYZ oznaczają domenę, w której reszta aminokwasowa X w pozycji Y została zmutowana na resztę aminokwasową Z.

Oczyszczanie rekombinowanych białek EcRDBD_{XYZ}



Rys.7.3. Schemat procedury oczyszczania białek EcRDBD_{XYZ} zawierających mutacje w regionie kasety T.

Białka GST-EcRDBD_{XYZ} ekspresjonowano w komórkach BL21(DE3)pLysS. Białka ekstraktu wysolone w zakresie 30-50% wysycenia siarczanem amonu poddawano chromatografii na złożu Heparin Sepharose™ CL-6B. GST-EcRDBD_{XYZ} eluowano z kolumny przy 650 mM NaCl i trawiono trombiną. Większość GST usuwano przez wiązanie do złoża Glutathione Sepharose™ 4B, natomiast pozostałą ilość GST oddzielano od EcRDBD_{XYZ} w filtracji żelowej na kolumnie Superdex 75HR. Więcej szczegółów w Materiałach i Metodach (6.2.2.5.).



Rys.7.4. Elektroforetyczna analiza czystości białek EcRDBD_{XYZ} zawierających mutacje w obszarze kasety T.

Na rysunku przedstawiono zdjęcie fragmentu żelu poliakrylamidowego (12%) po elektroforezie wykonanej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Żel barwiono barwnikiem Coomassie Blue R250. Poszczególne ślady oznaczają: WT- białko EcRDBD_{WT}, M- białka standardowe (zestaw Low Molecular Weight Marker, Bio-Rad), których masy zaznaczono po lewej stronie żelu oraz preparaty oczyszczonych mutantów (po około 2 µg), których skróty umieszczono nad żelem.

7.1.1.2. Wpływ mutacji kasety T na homodimeryzację EcRDBD na elemencie regulatorowym *hsp27_{pal}*

Aby zbadać wpływ poszczególnych mutacji na homodimeryzację EcRDBD_{XYZ} na elemencie *hsp27_{pal}* (Rys.7.1.), wykonano eksperymenty EMSA (6.2.3.4.). Technika ta polega na obserwacji zmiany ruchliwości elektroforetycznej znakowanego fragmentu DNA, po związaniu się do niego białka, analizowanej metodą elektroforezy w warunkach niedenaturujących, w żelu poliakrylamidowym (Fried i Crothers, 1989). Eksperymenty EMSA przeprowadzono dla każdego ze zmutowanych, oczyszczonych EcRDBD_{XYZ} w takich samych warunkach jak dla białka typu „dzikiego”, co umożliwiło bezpośrednią analizę wpływu wprowadzonych mutacji w EcRDBD na wiązanie *hsp27_{pal}*. Wzrastające ilości rekombinowanych EcRDBD_{XYZ} i EcRDBD_{WT} (końcowe stężenie 1000 nM) inkubowano z sondą *hsp27_{pal}*. Miareczkowanie sondy wzrastającymi ilościami białka pozwala uzyskać informacje dotyczące zarówno zmian powinowactwa białka do elementu regulatorowego, jak i jego zdolności do dimeryzacji w szerokim zakresie stężeń. Należy jednak pamiętać, że wynik otrzymany w EMSA może zależeć od warunków w jakich wykonano eksperyment. Dlatego dla każdego z białek przeprowadzono cztery serie niezależnych eksperymentów.

Rezultaty otrzymane w każdej z serii eksperymentów były powtarzalne. Na Rys.7.5. przedstawiono przykładowe wyniki otrzymane w jednej z serii. Wyniki EMSA (autoradiogramy) zamieszczono w postaci małych „wstawek” na wykresach przedstawiających analizę ilościową danego eksperymentu. Kontrolę stanowiło miareczkowanie sondy EcRDBD_{WT}. Uzyskane wyniki dla EcRDBD_{WT} zgadzały się z opublikowanymi wcześniej wynikami eksperymentów dla białka EcRDBD_{WT} (Niedziela-Majka i wsp., 2000), według których EcRDBD_{WT} tworzy z *hsp27_{pal}* dwa typy kompleksów, oznaczonych jako CI_E i CII_E. Jak pokazano na Rys.7.5.B i Rys.7.5.H, krzywe miareczkowania, a także autoradiogramy EMSA, otrzymane dla dwóch mutantów P68A i E74A były identyczne z wynikami otrzymanymi w eksperymencie kontrolnym dla EcRDBD_{WT}. Pasma CI_E odpowiada pojedynczej cząsteczce związanej z sondą (monomerowi), natomiast CII_E - synergicznie tworzonemu homodimerowi EcRDBD_{WT} (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Jak można zaobserwować, wyniki EMSA wyraźnie pokazały, że tylko dwa mutanty P68A i E77A wykazywały identyczne z EcRDBD_{WT} powinowactwo do *hsp27_{pal}*, tworząc w sposób synergiczny kompleksy CII_E (Rys. 7.5.B i H). Mutanty R67A i V71A wiązały się z obniżonym powinowactwem do *hsp27_{pal}*, zarówno jako monomery i homodimery (Rys.7.5.A i E). Najsilniejszy defekt wiązania DNA zaobserwowano w przypadku, kiedy druga z reszt prolinyłowych (P73) została zastąpiona alaniną (Rys.7.5.G). Co ciekawe, w przypadku reszty V72, podstawienie w jej miejsce alaniny spowodowało istotny wzrost powinowactwa obu kompleksów: monomeru i homodimeru do *hsp27_{pal}* (Rys.7.5.). Wyniki uzyskane dla mutantów N75A i Q76A w każdej serii eksperymentów były trudne do interpretacji i nie dawały jednoznacznych wniosków (nie pokazano).

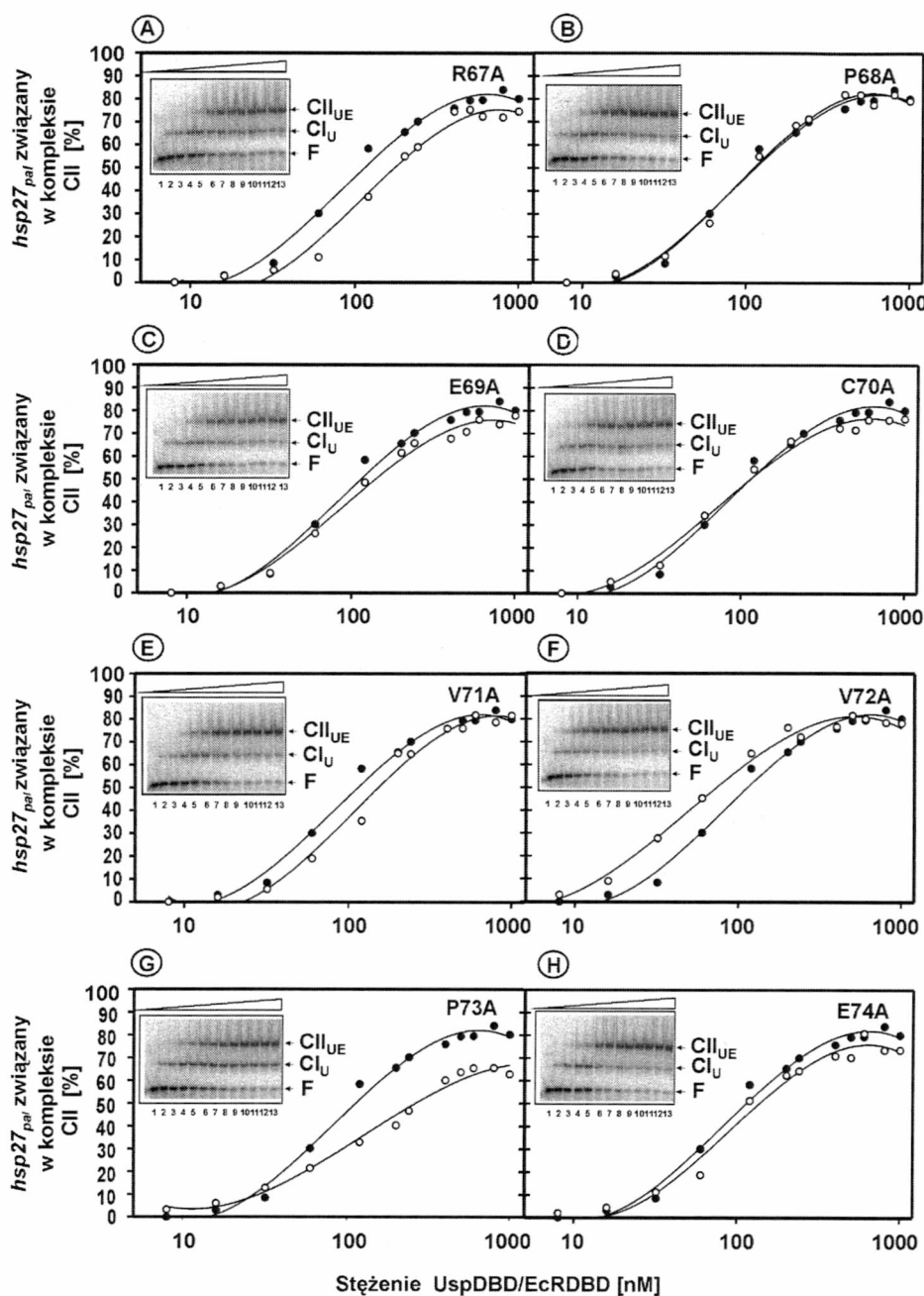
7.1.1.3. *EcRDBD* w kompleksie z *UspDBD* na elemencie regulatorowym *hsp27_{pal}* wykazuje zaskakującą tolerancję na wprowadzone mutacje w kasecie T

W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy mutacje w regionie kasety T wpływają na zdolność tworzenia przez białko *EcRDBD* heterodimerów z białkiem *UspDBD* na *hsp27_{pal}*.

Wykonano eksperymenty EMSA, w których dla każdego *EcRDBD_{XYZ}* przeprowadzono miareczkowanie wzrastającymi ilościami obu białek w równomolowych stężeniach tak, aby suma stężeń obu domen odpowiadała stężeniu *EcRDBD* użytemu we wcześniejszych eksperymentach (7.1.1.2.) (zakres stężeń od 8 nM do 1000 nM). Na Rys.7.6. przedstawiono wyniki jednej z czterech serii analiz zdolności tworzenia heterodimerów *UspDBD/EcRDBD_{XYZ}* na *hsp27_{pal}*, przeprowadzonego w warunkach analogicznych jak dla *EcRDBD_{XYZ}* (Rys.7.5.). Pasma oznaczone CII_{UE} reprezentują heterodimery *UspDBD/EcRDBD_{XYZ}*. Widoczne jest także pasmo odpowiadające monomerowi *UspDBD* (CI_U). Jak można zaobserwować, zmiany w powinowactwie domen *EcRDBD_{XYZ}* w stosunku do *hsp27_{pal}* są generalnie odzwierciedlone w wynikach otrzymanych dla *UspDBD/EcRDBD_{XYZ}* na tym elemencie. W szczególności, defekt w wiązaniu DNA zaobserwowano dla mutantów R67A, E69A, C70A i V71A (Rys.7.6.A,C,D i E), przy czym największy spadek powinowactwa do *hsp27_{pal}* wystąpił w przypadku reszty P73 zastąpionej alaniną (Rys.7.6.G). Heterodimer utworzony z udziałem V72A wiązał DNA z większym powinowactwem w stosunku do kompleksu *UspDBD/EcRDBD* typu „dzikiego” (Rys.7.6.F). Należy podkreślić fakt, iż zakres obserwowanych zmian, w stosunku do zmian obserwowanych wcześniej dla homodimerów *EcRDBD_{XYZ}* był znacznie niższy oraz to, że region kasety T, poza jednym wyjątkiem (P73A), z łatwością akceptował podstawienia wszystkich reszt aminokwasowych, kiedy *EcRDBD* tworzył heterokompleks z partnerem, *UspDBD*.

Powyższe spostrzeżenia sugerują, że cząsteczka *EcRDBD* przejawia plastyczność struktury w kontakcie z partnerem - *UspDBD*.

Wyniki otrzymane dla N75A i Q76A w każdej serii, podobnie jak to miało miejsce w przypadku homodimerów, nie prowadziły do konkluzyjnych wniosków (nie pokazano). W dalszych eksperymentach postanowiono nie analizować tych mutantów.

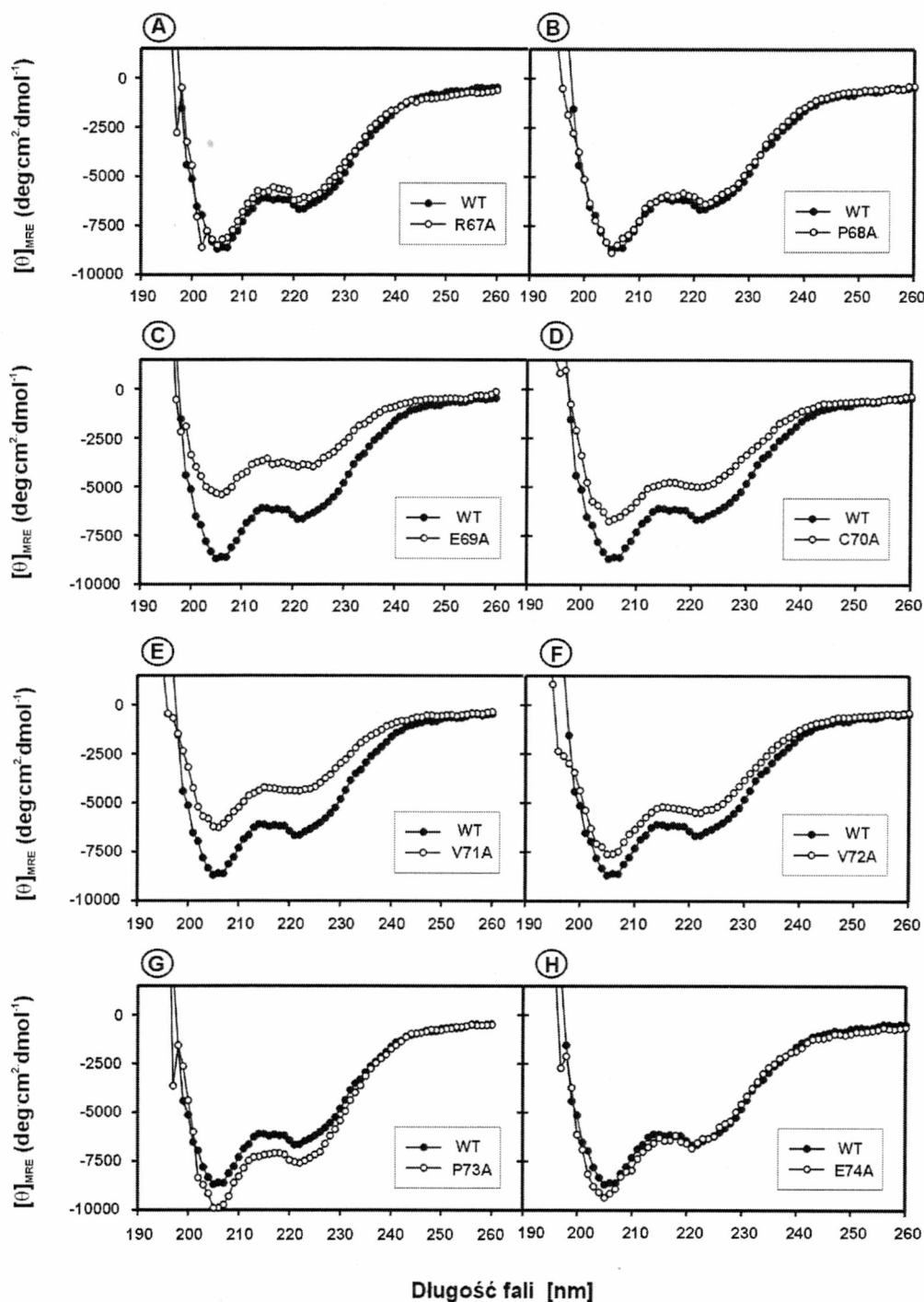


Rys.7.6. Analiza oddziaływań mutantów kasety T białka EcRDBD w obecności białka UspDBD z *hsp27_{pal}*.

EMSA wykonywano miareczkując *hsp27_{pal}* wzrastającymi ilościami równomolowej mieszaniny homogennych EcRDBD_{XYZ} i UspDBD (A-H). Kompleksy tworzone przez jedną DBD (monomer) oznaczono CI, a te pochodzące od heterodimerów UspDBD/EcRDBD_{XYZ} przez CII (indeks E pochodzi od EcRDBD; U od UspDBD); F, wolna sonda. Sumaryczne stężenie białek w poszczególnych próbkach odpowiadało stężeniom użytym podczas miareczkowania EcRDBD. Stężenia białek były następujące (ślady 1-13): 0, 8, 16, 32, 60, 120, 200, 240, 400, 500, 600, 800 i 1000 nM. *Pełne kółka* reprezentują kompleksy CII utworzone przez heterodimer UspDBD/EcRDBD typu „dzikiego”, natomiast *puste kółka* opisują kompleksy CII uformowane przez heterodimery UspDBD/EcRDBD_{XYZ}. Każdy punkt na wykresach odpowiada ilości związanej sondy (w %) w określonym kompleksie, dla danego stężenia białka, w porównaniu z wolną, niezwiązaną sondą *hsp27_{pal}*. Rysunek pokazuje wyniki reprezentacyjnej serii eksperymentów; podobne rezultaty uzyskano w czterech niezależnych eksperymentach. Pozostałe szczegóły jak w podpisie do Rys.7.5..

7.1.1.4. Mutacje niektórych reszt aminokwasowych kasety T EcRDBD wprowadzają zmiany w jego strukturze

W kolejnych eksperymentach postanowiono zbadać, czy zaobserwowane przy wykorzystaniu techniki EMSA efekty dla mutantów kasety T białka EcRDBD w wiązaniu do *hsp27_{pal}* są wynikiem utraty danej reszty istotnej dla kontaktu z partnerem lub z DNA, czy też są one skutkiem zmiany struktury EcRDBD indukowanej poprzez podstawienie alaniną danego aminokwasu. W tym celu przeprowadzono pomiary widm dichroizmu kołowego (CD) (ang., *circular dichroism*). Zmiany widm dichroizmu kołowego stanowią czuły wskaźnik zmian konformacyjnych głównego łańcucha polipeptydowego w białku (Johnson, 1990). Widma CD białek w obszarze dalekiego nadfioletu dostarczają dokładnych danych o konformacji głównego łańcucha polipeptydowego. Pomiary są z reguły wykonywane w zakresie pomiędzy 175 nm a 240 nm, z uwagi na liczne w tym zakresie nakładające się pasma absorpcji grup amidowych peptydów (Johnson, 1990). Spektroskopia w obszarze dalekiego nadfioletu jest bardzo czuła na obecność struktur α -helikalnych, co jest istotne w przypadku DBD receptorów jądrowych, których rdzeń złożony jest z dwóch prostopadłych α -helis (3.3.2.). Na Rys.7.7. przedstawiono wyniki przeprowadzonych pomiarów. Widmo CD białka EcRDBD_{WT} wykazywało dwa minima przy 222 nm i 206 nm (Rys.7.7., pełne kółka). Pierwsze minimum (przy 222 nm) jest charakterystyczne dla widm CD struktur α -helikalnych w globularnych białkach, natomiast to przy 206 nm jest zbliżone do drugiego charakterystycznego pasma dla struktur α -helikalnych (208 nm) (Johnson, 1990). Jednakże przesunięcie i amplituda minimum przy 206 nm może świadczyć o udziale w widmie CD innych konformacji niż α -helisy (Johnson, 1990). Jak pokazano na Rys.7.7., tylko trzy z przeanalizowanych mutantów (R67A, P68A, E74A) (Rys.7.7.A,B i H) posiadały widma bardzo zbliżone do widma EcRDBD_{WT} (ilościowe analizy widm CD mutantów kasety T zamieszczono w Tabeli 7.1.). Dwa z tych białek (P68A, E74A) przejawiały identyczne powinowactwo do *hsp27_{pal}* jak białko EcRDBD_{WT}. R67A wiązało *hsp27_{pal}* z obniżonym powinowactwem jako homo- i heterodimer z UspDBD. Widma CD czterech innych mutantów (E69A, C70A, V71A, V72A) (Rys.7.7.C-F) posiadały mniejsze intensywności w porównaniu z widmem CD białka EcRDBD_{WT}, co może oznaczać, że w przypadku tych białek zamiana reszt na alaninę mogła obniżyć zawartość i zmienić udział elementów struktury drugorzędowej (szczegóły w Tabeli 7.1.). Tylko dwa z tych mutantów (V71A, V72A) wykazywały znaczące zmiany powinowactwa w eksperymentach EMSA, podczas



Rys.7.7. Widma CD mutantów kasety T białka EcRDBD.

Widma dichroizmu kołowego (CD) roztworów rekombinowanych białek ($10,0 \mu\text{M}$) rejestrowano na spektropolarymetrze Jasco J-715, w kuwecie o długości optycznej $0,1 \text{ cm}$, z czasem odpowiedzi $1,0 \text{ s}$ i rozdzielczością $1,0 \text{ nm}$. Eliptyczność monitorowano w zakresie $190\text{--}260 \text{ nm}$. Każde zarejestrowane przez aparat widmo CD stanowiło rezultat akumulacji i uśrednienia pięciu skanów pojedynczego pomiaru. Pełnymi kółkami oznaczono widmo białka $\text{EcRDBD}_{\text{WT}}$, natomiast pustymi kółkami pokazano widma określonych $\text{EcRDBD}_{\text{XYZ}}$. $[\theta]_{\text{MRE}}$ oznacza molową eliptyczność resztową (ang., *mean residue ellipticity*) ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$). Pozostałe szczegóły podano w Materiałach i Metodach (6.2.3.5.).

gdy w przypadku dwóch pozostałych (E69A, C70A) wiązanie *hsp27_{pal}* było nieznacznie obniżone. Widmo CD mutantu P73A (Rys.7.7.G) ponownie podkreśliło unikalność zachowania reszty P73 w toku ewolucji w sekwencji kasety T białka EcRDBD. Porównanie widm CD białka P73A i EcRDBD_{WT} pokazało, że podstawienie reszty P73 alaniną wzmocniło intensywność widma, co znalazło odzwierciedlenie we wzroście zawartości struktur drugorzędowych (Tabela 7.1.).

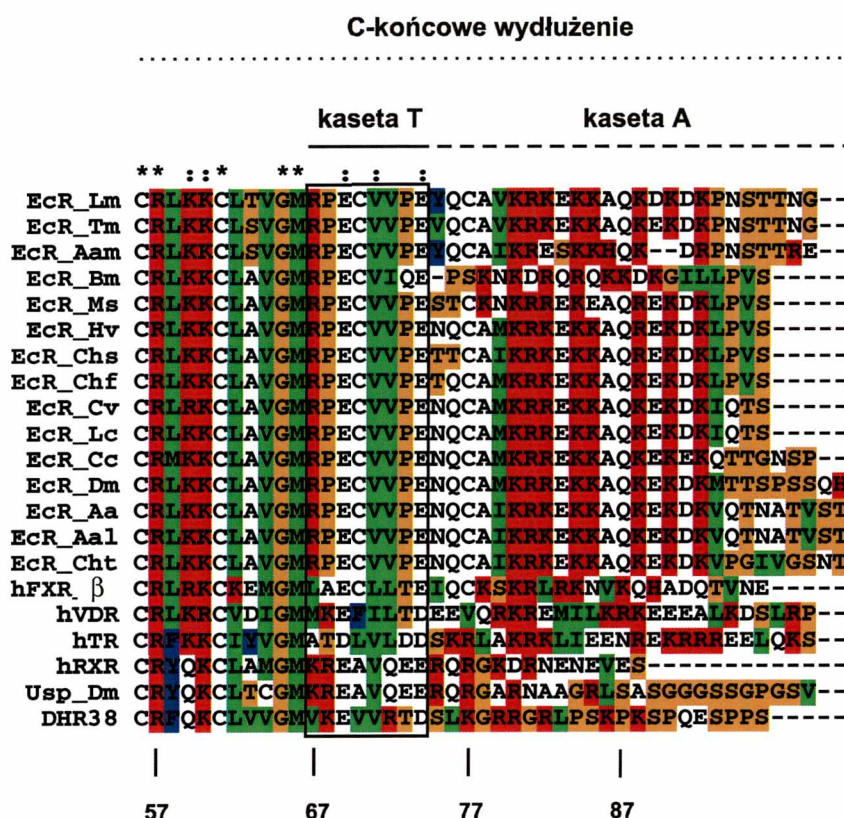
Tabela 7.1. Procentowa zawartość struktur drugorzędowych mutantów kasety T obliczona na podstawie widm CD.

Białko	α -helisa			β -struktura			β -zgięcia	struktury nieuporządkowane	RMSD
	regularna	zaburzona	suma	regularna	zaburzona	suma			
WT	10,6	9,9	20,5	11,3	7,3	18,6	14,6	46,4	0,063
R67A	8,2	9,2	17,4	10,9	7,1	18,0	15,1	49,6	0,137
P68A	9,1	9,2	18,3	10,7	6,9	17,6	14,7	49,4	0,047
E69A	3,6	5,8	9,4	17,8	9,0	26,8	15,2	48,7	0,061
C70A	6,9	8,0	14,9	15,5	8,8	24,3	15,2	45,7	0,042
V71A	5,8	7,6	13,4	16,2	8,8	25,0	14,7	47,0	0,038
V72A	7,3	8,9	16,2	12,7	7,5	20,2	14,2	49,5	0,050
P73A	10,7	11,0	21,7	6,2	4,8	11,0	15,1	52,1	0,115
E74A	9,0	9,2	18,2	9,5	6,8	16,3	15,7	49,7	0,073

W Tabeli podano procentową zawartość struktur drugorzędowych dla każdego z rekombinowanych białek, obliczoną programem CONTIN/LL z pakietu CDPPro (6.2.3.5.), w oparciu o widma CD przedstawione na Rys.7.7. W przypadku α -helisy i β -struktury w kolumnach opisanych „suma” podano sumę wartości obliczonych dla struktury regularnej i zaburzonej. RMSD (ang. „root mean square deviation”) - jest to współczynnik rozbieżności między eksperymentalnym widmem CD, a widmem uzyskanym z obliczeń przy wykorzystaniu procentowych zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych.

7.1.1.5. Właściwości mutanta *EcRDBD* z *D. melanogaster* zawierającego charakterystyczną sekwencję kasety T pochodzącej z *B. mori*

Porównanie sekwencji aminokwasowych *EcRDBD* pochodzących z różnych organizmów wskazuje, że kasety T jest obszarem o wysoce zachowanej podczas ewolucji sekwencji pomiędzy wszystkimi przeanalizowanymi sekwencjami *EcR* (Rys.7.8.). Wyjątek stanowi sekwencja pochodząca z *Bombyx mori*. Można zauważyć substytucję reszty P73 resztą Q oraz podstawie V72 resztą I. Reszta P jest obecna w sekwencji *B. mori* dwie pozycje (75) dalej w kierunku C-końca białka, w stosunku do tej z *D. melanogaster*, tuż przed potencjalną kaseta A.



Rys.7.8. Porównanie C-końcowych wydłużeń DBD białek *EcR* i innych przykładowych receptorów jądrowych.

Porównanie sekwencji wykonano programem ClustalX (1.81) (<http://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). ' * ' - oznacza pozycje posiadające jedną wysoce zachowaną resztę; ' : ' - oznacza, że jedna z występujących „silnych” grup reszt jest w pełni zachowana. Reszty aminokwasowe ponumerowano w stosunku do pierwszej cysteiny koordynującej atom cynku w module I (Rys.7.1.). Klamrą oznaczono regiony obejmujące kaseta T. Sekwencje pochodzą z bazy SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/sprot/>). Użyte skróty: *Drosophila melanogaster* (Dm, kod dostępu: EcR: P34021; Usp: P20153), *Bombyx mori* (Bm, P49881), *Manduca sexta* (Ms, P49883), *Aedes aegypti* (Ae, P49880), *Locusta migratoria* (Lm, O97095), *Tenebrio molitor* (Tm, O02035), *Heliothis virescens* (Hv, O18473), *Chilo suppressalis* (Chs, Q8MYA6), *Choristoneura fumiferana* (Chf, O77240), *Calliphora vicina* (Cv, Q9GPH1), *Ceratitis capitata* (Cc, O76827), *Lucilia cuprina* (Lc, O18531), *Chironomus tentans* (Cht, P49882), *Aedes albopictus* (Aal, Q9U3Y4), *Amblyomma*

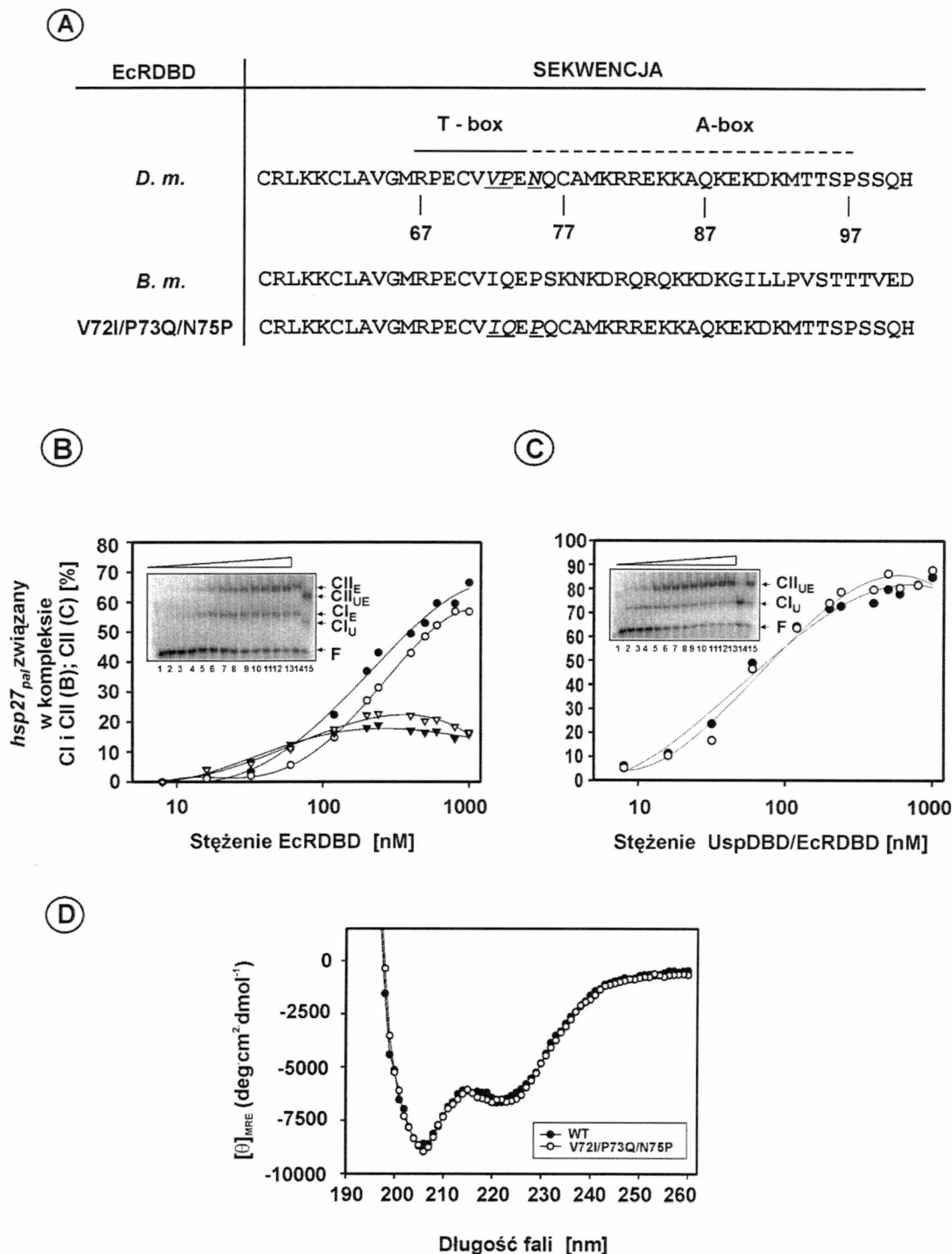
americanum (Aam, 044338), ludzki receptor kwasu 9-*cis*-retinowego (α) (hRXR, P19793), ludzki receptor hormonów tarczycy (hTR, P10828), ludzki receptor jądrowy aktywowany pochodnymi farnesolu (hFXR_ β , Q96RI1-2|Q96RI1), ludzki receptor 1,25-dihydroksyvitaminy D₃ (hVDR, P11473), receptor HR38 z *Drosophila melanogaster* (DHR38, P49869).

Aby zbadać, czy przedstawione powyżej substytucje zachowują strukturalno-funkcjonalną integralność kasety T, skonstruowano potrójnego mutantu EcRDBD z *D. melanogaster*, posiadającego w pozycjach 72, 73 i 75 reszty, które są obecne w sekwencji *B. mori* (V72I/P73Q/N75P, odpowiednio) (Rys.7.9.A). W celu otrzymania klonu cDNA EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P}, wykorzystano standardowe procedury opisane w Materiałach i Metodach (6.2.1.), używając odpowiednich starterów wprowadzających mutacje (6.1.5.1.1.). Białko to, oczyszczone zgodnie z metodą opisaną powyżej dla białek EcRDBD_{XYZ} (6.2.2.5.), poddano analizie w standardowych warunkach wykonując EMSA (6.2.3.4.). Jak pokazano na Rys.7.9.B, jedyną cechą odróżniającą EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P} od EcRDBD_{WT} z *D. melanogaster* jest nieznaczne obniżenie jego zdolności do tworzenia homodimerów. Ponadto obecność trzech reszt z *B. mori* nie wpłynęła znacząco na tworzenie kompleksów heterodimerycznych z partnerem, białkiem UspDBD (Rys.7.9.C). Aby sprawdzić, czy wprowadzone substytucje wpłynęły na strukturę białka, przeprowadzono pomiary CD. Zarejestrowane widmo EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P} wykazało bardzo zbliżony kształt do widma EcRDBD_{WT} (Rys.7.9.D), co świadczy o braku znaczącego wpływu podstawień na konformację białka. Nieznacznie wzrósł tylko udział struktury helikalnej (Tabela 7.2.).

Tabela 7.2. Procentowa zawartość struktur drugorzędowych białka EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P}.

białko	α -helisa			β -struktura			β -zgięcia	struktury nieuporządkowane	RMSD
	regularna	zaburzona	suma	regularna	zaburzona	suma			
WT	10,6	9,9	20,5	11,3	7,3	18,6	14,6	46,4	0,063
V72I/ P73Q/ N75P	11,2	10,3	21,5	10,6	7,4	18,0	15,5	45,0	0,073

W Tabeli przedstawiono procentową zawartość struktur drugorzędowych dla każdego z rekombinowanych białek, obliczoną programem CONTIN/LL z pakietu CDPPro (6.2.3.5.), w oparciu o widma CD przedstawione na Rys.7.9.D. Pozostałe szczegóły jak w opisie pod Tabelą 7.1. (7.1.1.4.).



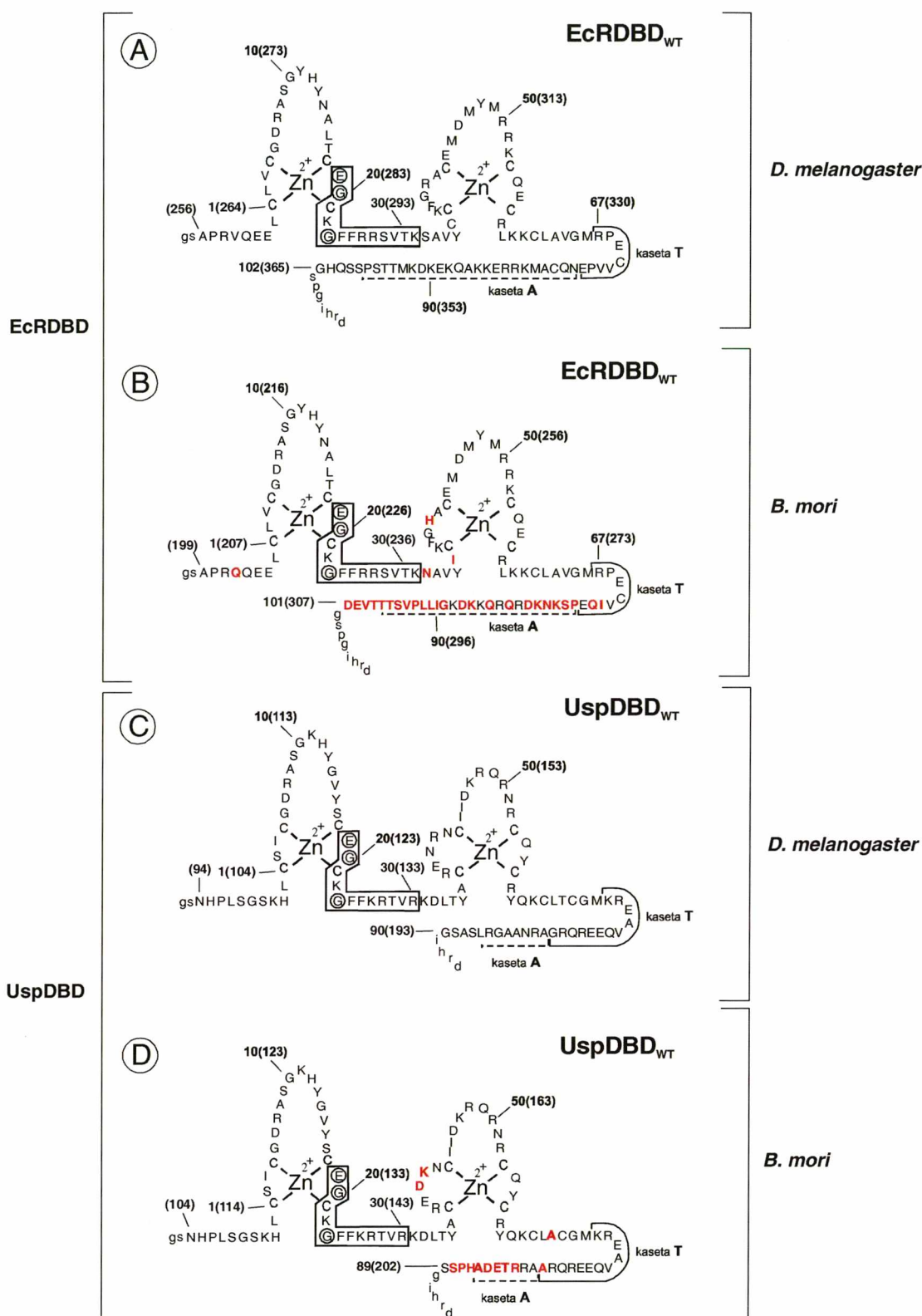
Rys.7.9. Charakterystyka białka EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P}.

Białko EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P} (mutant EcRDBD z *D. melanogaster* (*D. m.*) posiadający w pozycjach 72, 73 i 75 reszty charakterystyczne dla sekwencji obecnej w *B. mori* (*B. m.*) (A)), oczyszczono do postaci homogennej (niepokazano) (6.2.2.5.). Przeanalizowano następnie jego zdolność do wiązania *hsp27_{pal}* (6.2.3.4.) (puste kółka) w nieobecności (B) i w obecności partnera UspDBD z *D. melanogaster* (C), porównując z powinowactwem białka EcRDBD_{WT} z *D. melanogaster* (pełne kółka). Kontrole: (B) - ślad 14: EcRDBD_{WT} w stężeniu 600 nM; ślad 15: UspDBD/EcRDBD_{WT} w stężeniu 600 nM (po 300 nM każdej DBD). (C) - ślad 14: UspDBD w stężeniu 600 nM; ślad 15: UspDBD/EcRDBD_{WT} w stężeniu 600 nM (po 300 nM każdej DBD). Panel (D) przedstawia wynik pomiarów CD białka EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P} i EcRDBD_{WT} z *D. melanogaster*. Pozostałe szczegóły jak w podpisach pod Rys. 7.5, 7.6. i 7.7..

Uzyskane wyniki sugerują, że aminokwasowe substitucje dla sekwencji *B. mori* zachowują integralność strukturalno-funkcjonalną regionu kasety T, przynajmniej jeżeli chodzi o zdolność specyficznego wiązania *hsp27_{pal}*. Podkreślona została unikalność zachowania reszty P73 (*D. melanogaster*; P75 *B. mori*), która najprawdopodobniej pełni ważną funkcję w utrzymaniu odpowiedniej konformacji regionu potencjalnej kasety A.

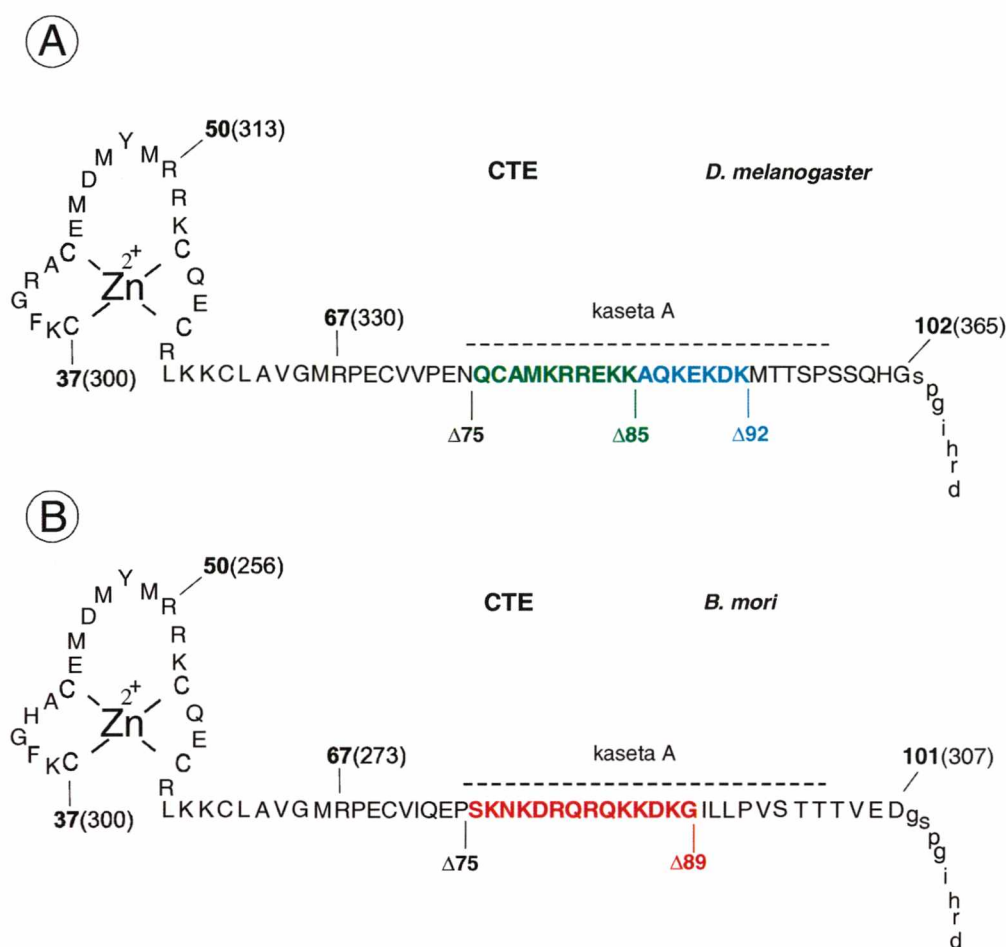
7.1.2. Analiza oddziaływania z *hsp27_{pal}* mutantów delecyjnych EcRDBD w regionie przypuszczalnej kasety A z *D. melanogaster* i *B. mori* pozwoliła na określenie minimalnej długości fragmentów sekwencji CTE wystarczających do tworzenia kompleksów na tym elemencie

Chociaż w obrębie modułów cynkowych domeny wiążące DNA receptorów jądrowych wykazują wysoką homologię sekwencji, to w regionie C-końcowego wydłużenia występują bardzo małe sekwencyjne i strukturalne podobieństwa w rodzinie (Rys.7.8.). Decyduje to o unikalności i specyficzności oddziaływań białko-białko i białko-DNA tej części DBD. Reszty wchodzące w skład kasety A z CTE DBD receptorów wiążących się do elementów DR tworzą rozległe kontakty z DNA, biorąc udział w dyskryminacji elementu regulatorowego oraz w tworzeniu funkcjonalnego kompleksu receptor-DNA (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Wyniki otrzymane przez Niedzielę-Majkę i wsp. (2000) pokazały, że w przypadku EcRDBD z *D. melanogaster* w wiązaniu elementu *hsp27_{pal}* i formowaniu heterokompleksu z UspDBD na *hsp27_{pal}* niezbędny jest region przypuszczalnej kasety A, ulokowany między resztą N75 a G102 (Rys.7.2.). Jednakże nie pokazano jak długi fragment kasety A jest zaangażowany w specyficzne rozpoznawanie *hsp27_{pal}*. Przeprowadzone analizy przewidywania struktury drugorzędowej przez Niedzielę-Majkę (1999), jak i w ramach realizacji celów niniejszej pracy (wyników nie pokazano), sugerowały, że region kasety A może tworzyć długą α -helisę. Tym samym może on wykazywać podobieństwo strukturalne do analogicznych obszarów w CTE TRDBD i VDRDBD (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Region CTE domen wiążących DNA białek EcR pochodzących z różnych organizmów charakteryzuje się zdumiewającym zachowaniem w toku ewolucji (Rys.7.8.). Jednym wyjątkiem jest sekwencja CTE z *B. mori*, odmienna od tej z *D. melanogaster* i innych przedstawicieli rodziny białek EcR (porównaj Rys.7.10.A z Rys.7.10.B).



Rys.7.10. Porównanie struktur pierwszorzędowych EcRDBD i UspDBD z *D. melanogaster* i *B. mori*.

Schematy struktur pierwszorzędowych: EcRDBD z *D. m.* (A); EcRDBD z *B. m.* (B); UspDBD z *D. m.* (C); UspDBD z *B. m.* (D). Kolorem czerwonym zaznaczono reszty aminokwasowe w EcRDBD i UspDBD pochodzących z *B. m.*, które różnią się w porównaniu z sekwencjami białek z *D. m.*. Pełne sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe białek EcR i Usp zamieszczono w Dodatku (I-IV). Numeracja reszt zgodna z opisem pod Rys.7.2. (7.7.1.).



Rys.7.11. Schemat struktur pierwszorzędowych obejmujących sekwencje CTE EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori*.

Na rysunku przedstawiono schematycznie sekwencje CTE białka EcRDBD z *D. m.* (A) i EcRDBD z *B. m.* (B). Linia przerywaną podkreślono region przypuszczalnej kasety A u *D. m.* (na podstawie Niedzieli-Majki (1999)) i analogiczny obszar u *B. m.*. (A) - kolorem zielonym oznaczono fragment sekwencji potencjalnej kasety A kończący się resztą K85 (mutant $\Delta 85$), kolorem niebieskim fragment, w którym natywna sekwencja CTE kończy się przy reszcie K92 (mutant $\Delta 92$). (B) - kolorem czerwonym oznaczono sekwencję mutantu $\Delta 89$, którego ostatnią resztą aminokwasową pochodzącą z CTE jest G89. Mutanty $\Delta 75$ z *D. m.* (A) i *B. m.* (B) pozbawione są przypuszczalnej kasety A. Małymi literami oznaczono reszty pochodzące z wektora pGEX-2T. Numeracja reszt zgodna z opisem pod Rys.7.2. (7.1.1.).

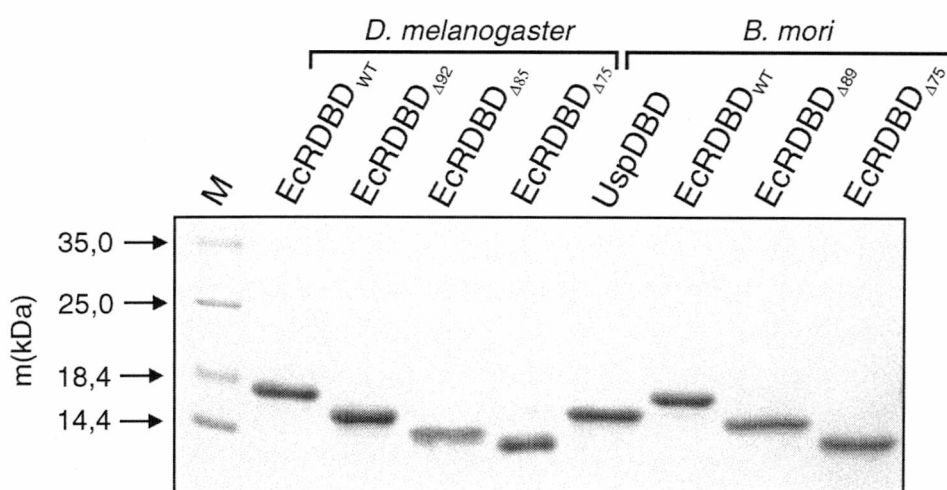
W kolejnych eksperymentach postanowiono zatem określić minimalny fragment kasety A białka EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* niezbędny do specyficznego oddziaływania i tworzenia kompleksów z *hsp27_{pal}*. W tym celu skonstruowano szereg mutantów delecyjnych białka EcRDBD_{ΔX}¹⁴ (6.2.1.4. i 6.2.2.6.) różniących się długością sekwencji CTE w tym regionie (Rys.7.11.). Sekwencje CTE domen wiążących DNA receptorów jądrowych

¹⁴ Indeks ΔX oznacza takiego mutantu delecyjnego EcRDBD, w którym sekwencja natywna kończy się przy reszcie X.

charakteryzują się dużą zawartością reszt aminokwasowych o charakterze zasadowym, takich jak reszty K i R (Rys.7.8.), tworząc specyficzne i rozległe kontakty m.in. z posiadającym duży ładunek ujemny szkieletem fosforanowym DNA (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). W przypadku CTE białka EcRDBD z *D. melanogaster* obejmującego region kasety A, wyróżnić możemy dwa fragmenty sekwencji o wyraźnie zasadowej charakterystyce: pierwszy od reszty Q76 do K85 oraz drugi zawarty między resztą Q87 a K92. W związku z tym wprowadzono delecje, gdzie natywna sekwencja mutanta $\Delta 85$ kończy się przy reszcie K85, natomiast białka $\Delta 92$ przy K92 (Rys.7.11.A). Białko EcRDBD z *B. mori*, posiada w tym regionie odcinek zasadowy zawarty pomiędzy P75 a G89. Ostatnią natywną resztą aminokwasową mutanta $\Delta 89$ pochodzącą z CTE jest G89 (Rys.7.11.B). Białka EcRDBD $\Delta 75$ z *D. melanogaster* i *B. mori* pozbawione są całkowicie regionu kasety A.

7.1.2.1. Otrzymanie EcRDBD ΔX oraz UspDBD

Oczyszczanie EcRDBD ΔX pochodzących z *D. melanogaster* i *B. mori*, zawierających mutacje delecyjne w CTE (i białek EcRDBD_{WT}) oraz białka UspDBD typu „dzikiego” (Rys.7.10.D) z *B. mori* przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną przez Grad (2001) dla białka UspDBD z *D. m.*, zmodyfikowaną przez Kowalską i wsp. (2003), szczegółowo opisaną w Materiałach i Metodach (6.2.2.6.).



Rys.7.12. Elektroforetyczna analiza czystości białek EcRDBD ΔX i białka UspDBD.

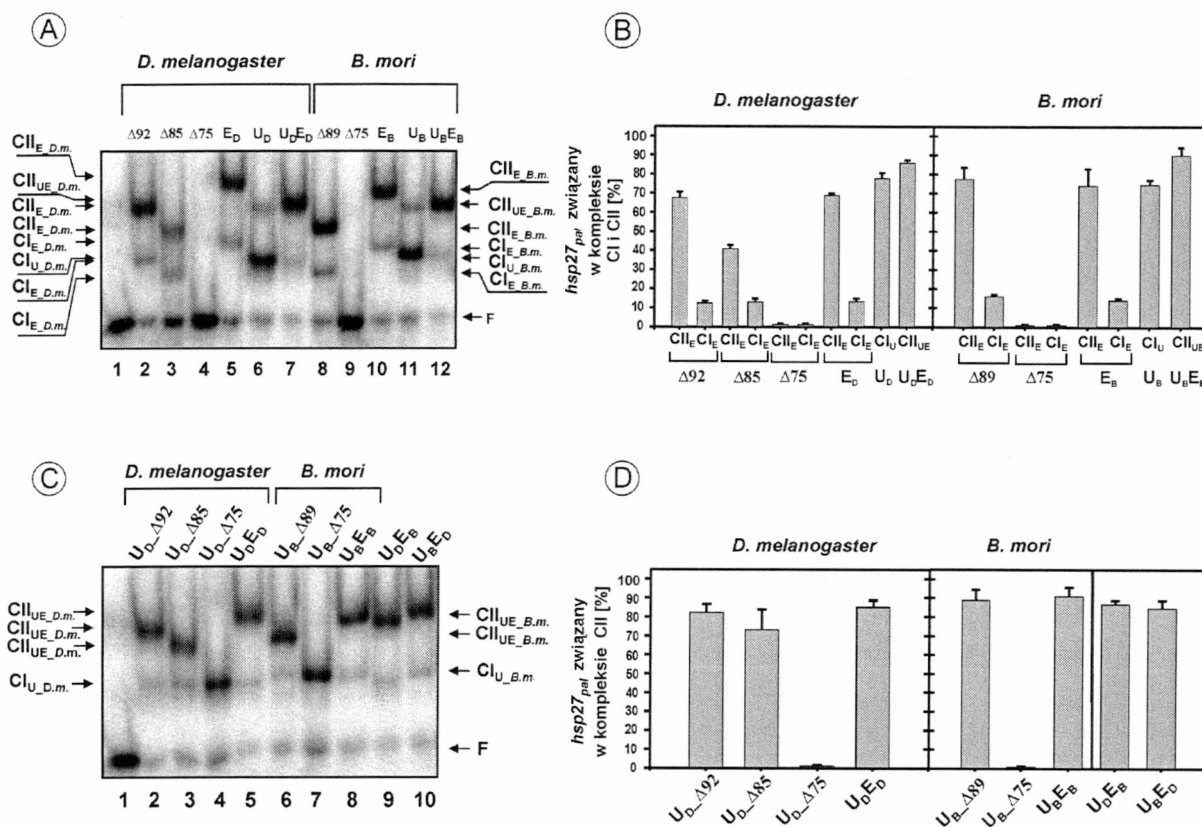
Na rysunku przedstawiono zdjęcie żelu poliakrylamidowego (15%) po elektroforezie wykonanej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Żel barwiono barwnikiem Coomassie Blue R250. M- białka standardowe (zestaw Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), których masy zaznaczono po lewej stronie żelu. Na żel naniesiono po około 2 μ g preparatów, których oznaczenia umieszczono nad żelem.

Postanowiono wykorzystać tą metodę z uwagi na krótszy czas preparacji białka w porównaniu z procedurą zastosowaną dla oczyszczenia EcRDBD_{XYZ} (6.2.2.5.). Ze względu na to, że białka te posiadają delecje w sekwencjach C-końcowych, tym samym są krótsze od białka typu dzikiego, obawiano się, że mogłoby to wpłynąć na obniżenie ich stabilności, a co za tym idzie wydajności oczyszczania podczas dłuższej preparacji. Ostatecznie uzyskano homogenne preparaty (Rys.7.12.).

7.1.2.2. Analiza zdolności tworzenia kompleksów na *hsp27_{pal}* przez mutanty delecyjne EcRDBD_{ΔX}

W celu odpowiedzenia na pytanie, jaki fragment sekwencji z regionu potencjalnej kasety A (Niedziela-Majka i wsp., 2000) jest istotny dla oddziaływania białka EcRDBD z *hsp27_{pal}*, przeprowadzono szereg eksperymentów EMSA w standardowych warunkach (6.2.3.4.). Właściwości mutantów EcRDBD_{ΔX} w tworzeniu homodimerów na *hsp27_{pal}* zilustrowano na Rys.7.13.A, natomiast analizę ilościową oddziaływań zamieszczono na Rys.7.13.B. Jak można zobaczyć, mutant Δ92 wykazywał identyczne powinowactwo do *hsp27_{pal}* jak białko EcRDBD_{WT}, zarówno jako monomer jak i homodimer (Rys.7.13.A, porównaj ślady: 2 i 5; patrz także 7.13.B). Co jest interesujące, monomer mutantu Δ85 wiązał *hsp27_{pal}* z identycznym powinowactwem jak forma monomeryczna białka EcRDBD_{WT}, natomiast wykazywał wyraźny defekt w tworzeniu homodimeru na DNA (Rys.7.13.A, porównaj ślady: 3 i 5; patrz także 7.13.B). Uzyskany wynik dla EcRDBD_{Δ75} z *D. melanogaster* (Rys.7.13.A, ślad: 4, patrz także 7.13.B) zgadzał się z opublikowanymi wynikami wcześniejszych eksperymentów dla tego białka pozbawionego regionu kasety A (EcRDBD_{ΔA}) (Niedziela-Majka i wsp., 2000), gdzie zaobserwowano brak wiązania się mutantu do *hsp27_{pal}*. W przypadku mutantu Δ89 z *B. mori*, białko to wiązało *hsp27_{pal}* w sposób nieodróżnialny od białka typu „dzikiego” (Rys.7.13.A, porównaj ślady: 8 i 10; patrz także 7.13.B). Natomiast mutant Δ75 z *B. mori* wykazywał brak powinowactwa do *hsp27_{pal}*, podobnie jak EcRDBD_{Δ75} z *D. melanogaster* (Rys.7.13.A, ślad: 9; patrz także 7.13.B).

Aby zbadać wpływ utraty fragmentów sekwencji przypuszczalnej kasety A białka EcRDBD z *D. melanogaster* i z *B. mori* na zdolność tworzenia heterodimerów z UspDBD, wykonano dodatkowo eksperymenty EMSA z UspDBD (z *D. m.* lub *B. m.*) (Rys.7.13.C, analiza ilościowa przedstawiona na panelu D). Jak można zaobserwować, zmiany w powinowactwie domen EcRDBD_{ΔX} w stosunku do *hsp27_{pal}* są odzwierciedlone w formowaniu heterodimerów



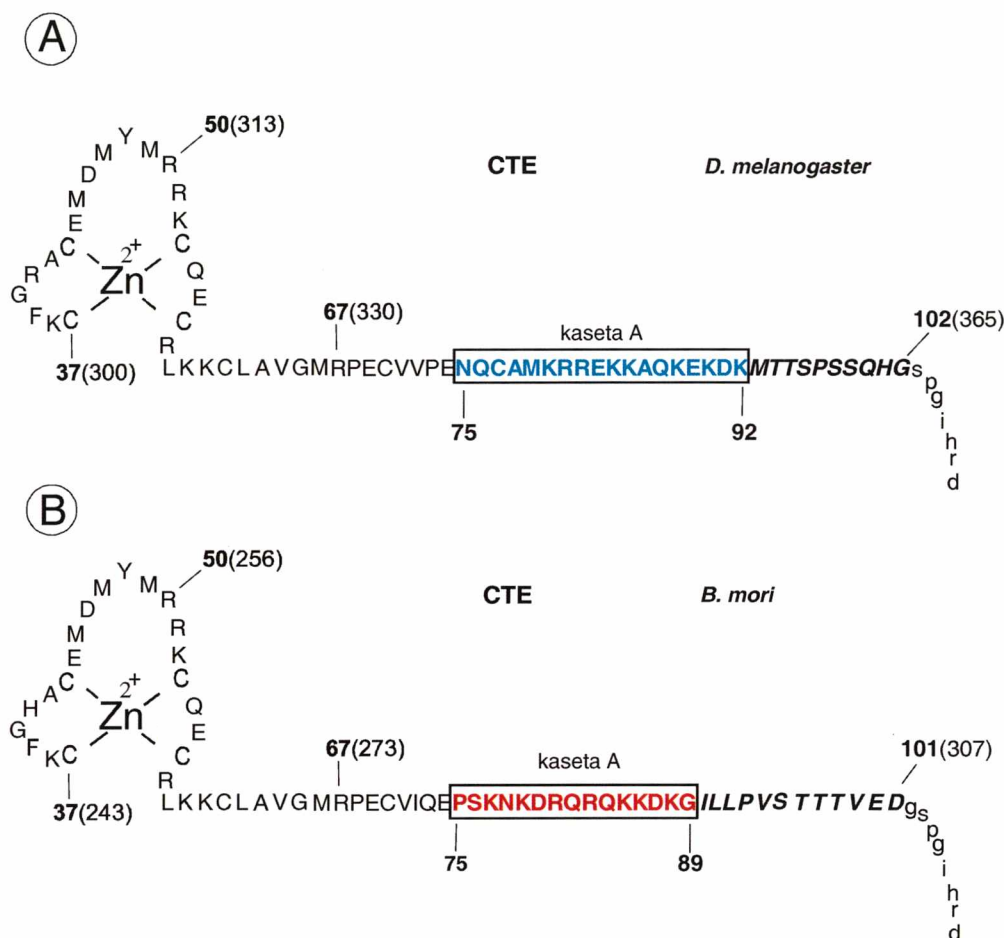
Rys.7.13. Analiza oddziaływań białek EcRDBD_{ΔX} posiadających w CTE mutacje delecyjne z *hsp27_{pal}*.

EMSA wykonywano inkubując znakowaną ³²P sondę *hsp27_{pal}* z określonymi EcRDBD_{ΔX} (A, ślady: 2-4 i 8-9) lub z równomolowymi ilościami odpowiednich EcRDBD_{ΔX} i białek UspDBD_{WT} (C, ślady: 2-4 i 6-7).

Panele (B) i (D) przedstawiają wyniki analiz ilościowych eksperymentów EMSA, których reprezentacyjne autoradiogramy zamieszczono odpowiednio na panelach: (A) (ślady: 2-12) i (C) (ślady: 2-10). Kolumny z odchyleniami standardowymi oznaczają średnią wartość uzyskaną z trzech niezależnych eksperymentów. Stężenia białek: 600 nM (A) (ślady: 2-12) i (C) (ślady: 2-10) (w przypadku kompleksów z odpowiednimi UspDBD po 300 nM określonych DBD). Indeksy U_D i U_B oraz E_D i E_B oznaczają białka UspDBD_{WT} i EcRDBD_{WT} z *D. m.* i *B. m.*, odpowiednio. Pozostałe szczegóły jak w podpisie pod Rys.7.5. (7.1.1.2.) i Rys.7.6. (7.1.1.3.).

UspDBD/EcRDBD_{ΔX} na tym elemencie. Heterodimer UspDBD/EcRDBD_{Δ92} wykazywał identyczne powinowactwo do *hsp27_{pal}*, jak heterodimer typu „dzikiego” (Rys.7.13.C i D, ślady: 2 i 5). W przypadku mutanta Δ85 obecność partnera, UspDBD, zniosła efekt braku fragmentu sekwencji z CTE (istotnego jak się wydaje dla tworzenia homodimeru - patrz wyżej) powodując, że heterokompleks UspDBD/EcRDBD_{Δ85} wiązał element regulatorowy ze zbliżonym powinowactwem jak UspDBD/EcRDBD_{WT} (Rys.7.13.C i D, ślady: 3 i 5). Podobnie jak to miało miejsce w przypadku homodimeru EcRDBD_{Δ75}, uzyskane wyniki dla heterodimeru UspDBD/EcRDBD_{Δ75} z *D. melanogaster*. (Rys.7.13.C i D, ślad: 4) zgadzały

się z wynikami otrzymanymi przez dla kompleksu UspDBD/EcRDBD $\Delta\Delta$ na *hsp27_{pal}* (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Heterodimer UspDBD/EcRDBD Δ_{89} z *B. mori* wiązał *hsp27_{pal}* w sposób nierozróżnialny od UspDBD/EcRDBD_{WT} (Rys.7.13.C, ślady: 6 i 8; patrz także D). Co ciekawe, brak kasety A (mutant Δ_{75}) okazał się być również kluczowy dla EcRDBD z *B. mori* w zdolności kooperatywnego oddziaływania z UspDBD na *hsp27_{pal}* (Rys.7.13.C, ślad: 7; patrz także D).



Rys.7.14. Minimalne fragmenty kasety A z CTE EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* wystarczające do specyficznego tworzenia kompleksów na *hsp27_{pal}*.

Na zamieszczonym schemacie zaznaczono kolorami i ramkami sekwencje kasety A białka EcRDBD wystarczające do wiązania *hsp27_{pal}*. Kolorem niebieskim oznaczono region kasety A dla EcRDBD z *D. melanogaster* (A), natomiast czerwonym sekwencję dla EcRDBD z *B. mori* (B). Sekwencje CTE obu domen, które najprawdopodobniej nie biorą udziału w oddziaływaniu z *hsp27_{pal}* pogrubiono i zaznaczono kursywą. Numeracja reszt zgodna z Rysunkiem 7.10. (7.1.2.).

Dodatkowo postanowiono również sprawdzić, czy DBD białek EcR i Usp pochodzących z *D. melanogaster* i z *B. mori* są w stanie tworzyć wzajemne kompleksy heterodimeryczne. W tym celu z zaznakowaną sondą *hsp27_{pal}* inkubowano równomolowe ilości odpowiednich domen DBD typu „dzikiego”¹⁵. Jak zaobserwowano, heterodimer utworzony przez UspDBD z *D. melanogaster* i EcRDBD z *B. mori* wykazywał identyczne powinowactwo do *hsp27_{pal}* jak kompleks heterodimeryczny uformowany odpowiednio przez UspDBD z *B. mori* z białkiem EcRDBD z *D. melanogaster* (Rys.7.13.C, porównaj ślady: 9 i 10; patrz także D). Wynik ten może świadczyć o tym, że różnice w sekwencjach DBD białek EcR i Usp (w szczególności te występujące w CTE) pochodzących z *D. melanogaster* i *B. mori* (Rys.7.10.) nie dyskryminują wzajemnie partnerów w oddziaływaniu z *hsp27_{pal}* na poziomie domen wiążących DNA.

Uzyskane powyżej rezultaty pozwalają na identyfikację minimalnego regionu CTE tworzącego kasetę A białka EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* wystarczającego do formowania kompleksów na *hsp27_{pal}*. W przypadku EcRDBD z *D. melanogaster*, fragment tworzący kasetę A zawarty jest pomiędzy resztą N75 a K92 (Rys.7.14.A), natomiast u *B. mori* jest to sekwencja ograniczona resztami P75 i G89 (Rys.7.14.B).

7.2. ANALIZA MUTANTÓW α -HELISY ROZPOZNAJĄCEJ ELEMENT REGULATORY EcRDBD W ZDOLNOŚCI DO SPECYFICZNEGO ODDZIAŁYWANIA I TWORZENIA KOMPLEKSÓW Z *hsp27_{pal}* PODKREŚLIŁA PLASTYCZNOŚĆ EcRDBD

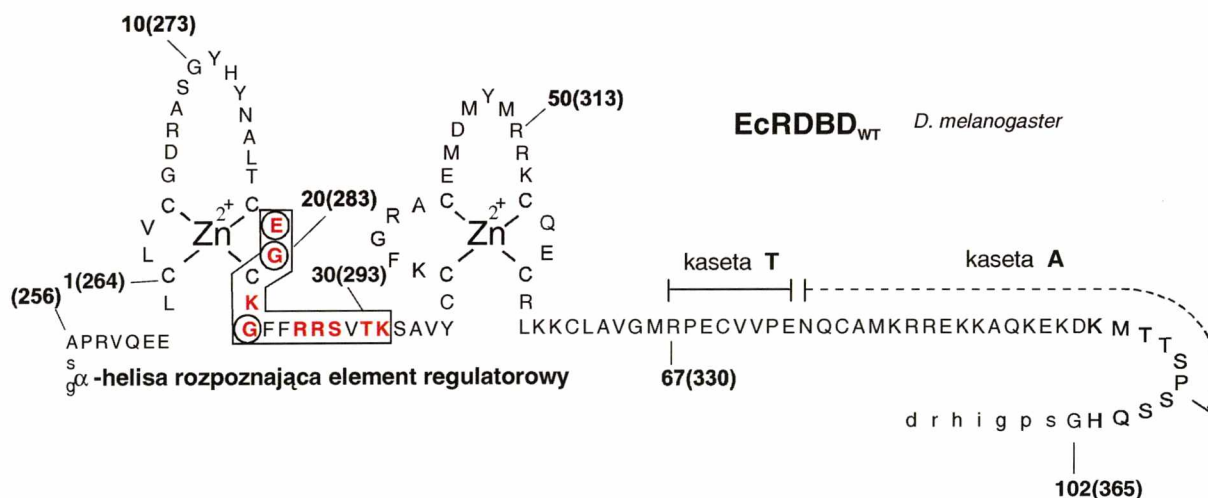
7.2.1. Mutacje białka EcRDBD w regionie α -helisy rozpoznającej element regulatorowy

Przedstawione powyżej wyniki, a w szczególności zaskakująca tolerancja EcRDBD na podstawienia reszt aminokwasowych kasety T alaniną, zrodziły pytanie, czy obserwowany efekty dotyczy tylko regionu C-końcowego, czy też jest to właściwość, która może być obserwowana również dla innych regionów domeny. Oprócz sekwencji CTE, w DBD receptorów jądrowych znajduje się drugi niezmiernie istotny dla funkcji region zlokalizowany

¹⁵ Typy „dzikie” białek EcRDBD i UspDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* zawierają sekwencje aminokwasowe przedstawione na Rys.7.10. (7.1.2.).

na C-końcu pierwszego modułu cynkowego. Tworzy on α -helisę rozpoznającą element regulatorowy (3.3.2.). Wchodzące w jej skład reszty aminokwasowe odpowiedzialne są za specyficzność wiązania receptorów jądrowych do DNA (Rys.7.15.). Rola α -helisy białka UspDBD w rozpoznawaniu elementu *hsp27_{pal}* została przeanalizowana przez Grad i wsp. (2001).

W celu odpowiedzenia na postawione pytanie, skonstruowano dziewięć mutantów cDNA EcRDBD z *D. melanogaster*, w których poszczególne kodony aminokwasów z tego regionu zamieniono na kodony alaniny. Pierwszą resztą, którą poddano mutacji była E19, natomiast ostatnią K31 (Rys.7.15.). Nie poddano mutagenезie następujących reszt: C18, C21 - ze względu na ich ważną rolę strukturalną w utrzymywaniu właściwej struktury pierwszego modułu cynkowego, F24, F25 i V29 - z uwagi na to, że reszty te wchodzą w skład hydrofobowego rdzenia DBD i ich utrata mogłaby wywołać znaczące zmiany w strukturze (Grad i wsp., 2001).

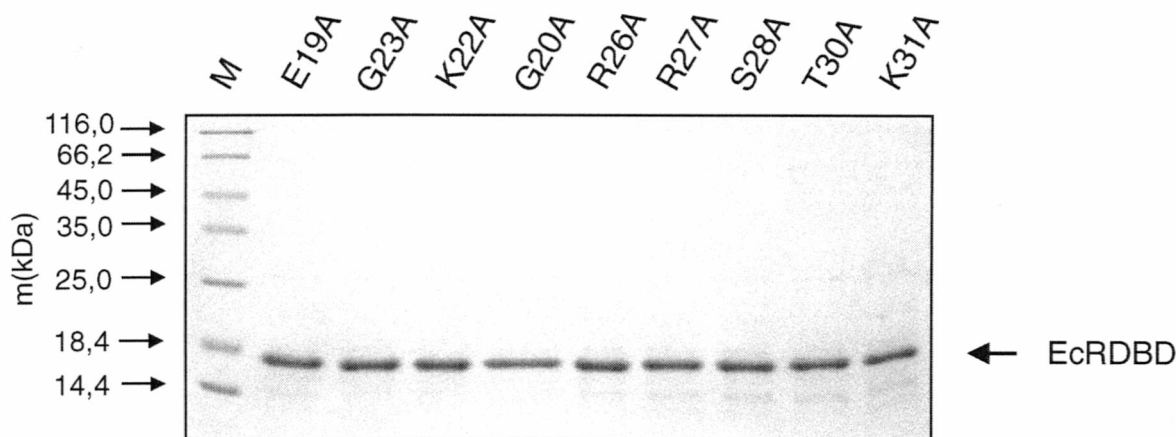


Rys.7.15. Struktura pierwszorzędowa EcRDBD z *D. melanogaster* z zaznaczonymi pozycjami reszt α -helisy rozpoznającej element regulatorowy poddanych mutagenезie.

Ramką oznaczono reszty wchodzące w skład potencjalnej α -helisy rozpoznającej element regulatorowy. Kółkami zaznaczono reszty kasety P. Kolorem czerwonym pokazano reszty, które zostały poddane mutacji na alaninę. Pierwszą resztą, którą zmutowano była E19 a ostatnią K31. Nie poddano mutagenезie następujących reszt: C18, C21, F24, F25 i V29. Więcej szczegółów w tekście. Pozostałe oznaczenia takie jak w podpisie do Rys.7.1. (7.1.).

7.2.1.1. Otrzymanie zmutowanych *EcRDBD*_{XYZ}

Oczyszczone preparaty mutantów *EcRDBD*_{XYZ} posiadających mutacje w regionie α -helisy (Rys.7.16.) oraz białka *EcRDBD*_{WT} uzyskano posługując się identyczną metodą, którą wykorzystano do otrzymania mutantów kasety T *EcRDBD* (7.1.1.1.). Opisano ją dokładnie w Materiałach i Metodach (6.2.2.5.).



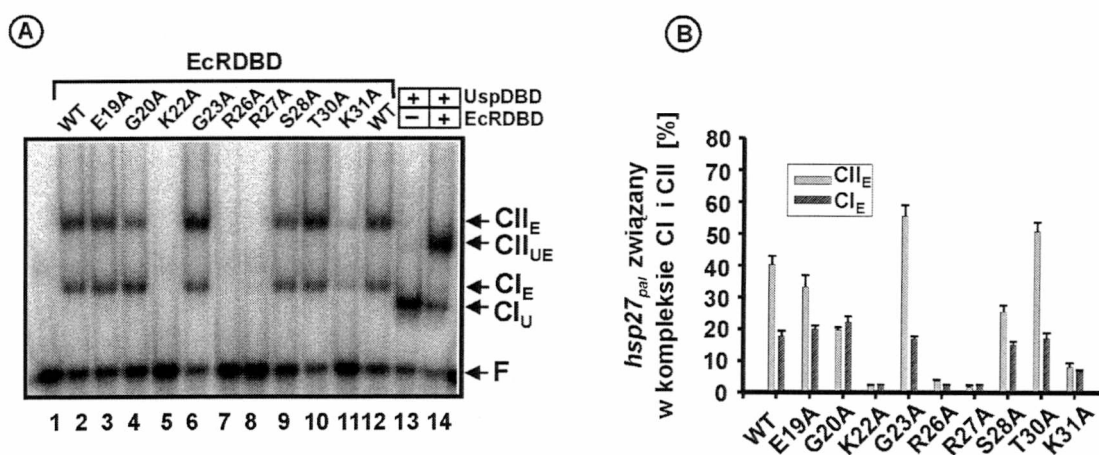
Rys.7.16. Elektroforetyczna analiza czystości białek *EcRDBD*_{XYZ} zawierających mutacje w regionie α -helisy rozpoznającej element regulatorowy.

Rysunek przedstawia zdjęcie żelu poliakrylamidowego wykonane po elektroforezie w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Żel barwiono barwnikiem Coomassie Blue R250. M-białka standardowe (zestaw Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Pozostałe oznaczenia jak w podpisie do Rys.7.12. (7.1.2.1.).

7.2.1.2. Wpływ mutacji α -helisy rozpoznającej element regulatorowy na homodimeryzację *EcRDBD* na *hsp27*_{pal}

Aby zidentyfikować krytyczne dla oddziaływań *hsp27*_{pal} reszty α -helisy, przeprowadzono eksperymenty EMSA w standardowych warunkach (6.2.3.4.) dla serii mutantów *EcRDBD*_{XYZ}, w pojedynczym stężeniu (240 nM). Na Rys.7.17.A przedstawiono przykładowy autoradiogram, natomiast analizę ilościową eksperymentów zamieszczono na Rys.7.17.B. Jak zaobserwowano, powinowactwo homodimerów do *hsp27*_{pal} zostało wyraźnie obniżone w wyniku podstawienia alaniny w pozycjach G20, K22, R26, R27, S28 i K31 (Rys.7.17.A, ślady: 4-5, 7-9 i 11; patrz także B). Spośród tych białek, mutanty K22A, R26A,

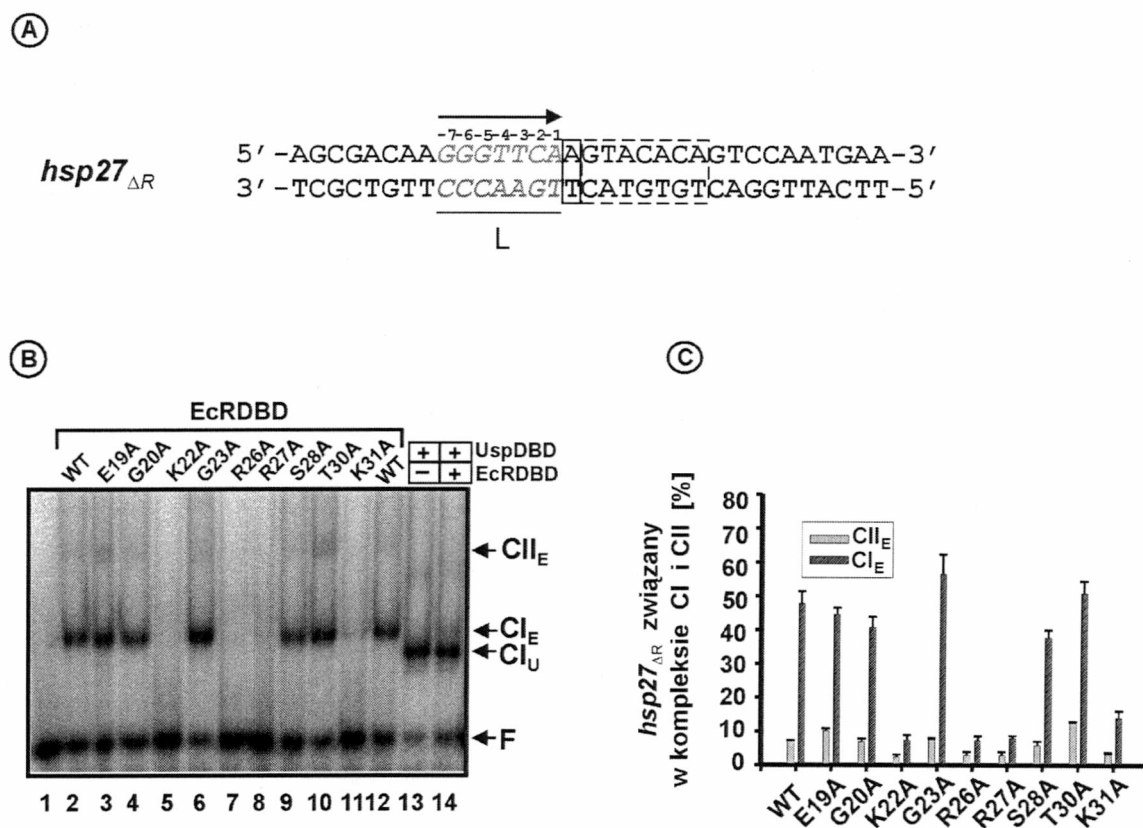
R27A i K31A wykazywały największy defekt w wiązaniu DNA, podczas gdy zdolność tworzenia homodimerów przez mutanty G20A i S28A nieznacznie uległa osłabieniu w porównaniu do EcRDBD_{WT} (Rys.7.17.A, porównaj ślady: 4 i 9 z 2; patrz także B). Co ciekawe, zastąpienie glicyny w pozycji 23 i treoniny w pozycji 30 alaniną spowodowało wzrost powinowactwa kompleksów homodimerycznych tych mutantów do *hsp27_{pal}* (Rys.7.17.A, ślady: 6 i 10; patrz także B). Interesujący jest wynik uzyskany dla E19 (Rys.7.17.A, ślad: 2; patrz także B). Podstawienie tej reszty alaniną nie zmieniło znacząco siły wiązania DNA, w porównaniu z typem „dzikim”. Wynik ten był o tyle zaskakujący, gdyż reszta E19 jest jedną z trzech specyficznych dla danego receptora reszt α -helisy wchodzących w skład kasety P (3.3.2.). Oznaczać to może, że reszta E19 w EcRDBD jest niezbędna do rozpoznawania specyficznych par zasad elementu *hsp27_{pal}*.



Rys.7.17. Reszty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy kluczowe dla formowania homodimerów EcRDBD na *hsp27_{pal}*.

Znakowaną sondę *hsp27_{pal}* inkubowano z homogennymi EcRDBD_{XYZ}, UspDBD (A, ślad: 13) (kontrola) lub z równomolowymi ilościami białka EcRDBD_{WT} i partnera UspDBD (kontrola) (A, ślad: 14). Panel (B) przedstawia wynik analiz ilościowych eksperymentów EMSA, których reprezentacyjny autoradiogram zamieszczono odpowiednio na panelu (A) (ślady: 2-11). Kolumny z odchyleniami standardowymi oznaczają średnią wartość uzyskaną z trzech niezależnych eksperymentów. Stężenia białek: 240 nM (A) (ślady: 2-14); w przypadku kompleksów z UspDBD po 120 nM określonych DBD. Pozostałe szczegóły jak w podpisie pod Rys.7.6. (7.1.1.3.).

Ponieważ wyniki uzyskane przez Niedzielę-Majkę i wsp. (2000) pokazały, że w nieobecności białka UspDBD, EcRDBD wykazuje wyższe powinowactwo do 5'-końcowego półmiejscza elementu *hsp27_{pal}* niż do półmiejscza 3'-końcowego (Rys.7.1.), można przypuszczać, że otrzymane powyżej rezultaty (Rys.7.17.) mogą być przypisane wpływowi mutacji na oddziaływanie pojedynczej cząsteczki EcRDBD (monomeru) z półmiejscem o wysokim powinowactwie (5'-końcowym).



Rys.7.18. Analiza wiązania mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD do *hsp27_{ΔR}*.

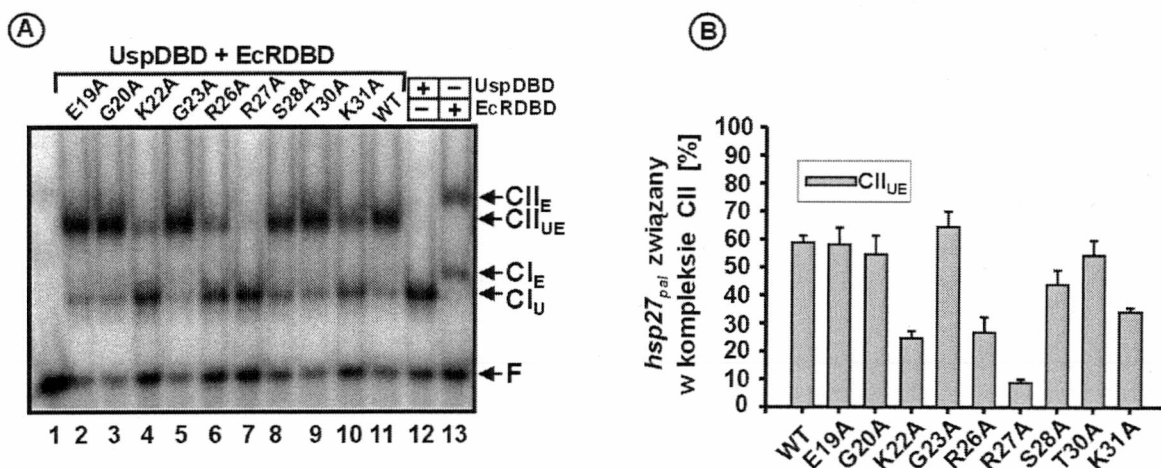
(A) Pochodna sekwencji *hsp27_{pal}* posiadająca tylko 5'-końcowe półmiejscze (L); zmutowane 3'-końcowe półmiejscze oznaczono przerywaną ramką. Pozostałe szczegóły jak w podpisie pod Rys.7.1.. Na panelu (B) przedstawiono reprezentacyjny autoradiogram, natomiast wynik analiz ilościowych eksperymentów EMSA (B, ślady: 2-11) zamieszczono na panelu (C). Inne szczegóły zgodne z podpisem pod Rys.7.17..

Wykonano więc dodatkowo eksperymenty EMSA wykorzystując jako sondę pochodną elementu *hsp27_{pal}*, posiadającą tylko półmiejscze 5'-końcowe (*hsp27_{ΔR}*, Rys.7.18.A). Wyniki

eksperymentów zamieszczono na Rys.7.18. (B,C). Obserwowane zmiany powinowactwa monomerów EcRDBD_{XYZ} do *hsp27_{ΔR}* były podobne do uzyskanych wcześniej dla homodimerów EcRDBD_{XYZ} na *hsp27_{pal}* (porównaj Rys.7.17.B z Rys.7.18.C). Jednakże, uważne porównanie tych wyników eksperymentów pokazało, że przynajmniej dla dwóch mutantów (G20A i S28A) (porównaj Rys.7.17.A, ślady: 4 i 9 z Rys.7.18.B, ślady: 4 i 9) zakres zmian powinowactwa homodimeru EcRDBD był większy niż ten zaobserwowany dla monomeru. Może to oznaczać, że reszty G20 i S28 są zaangażowane w wiązanie 3'-końcowego półmiejscu elementu *hsp27_{pal}*, lub w utrzymanie odpowiedniej konformacji cząsteczki EcRDBD związanej do tego półmiejscu w uformowanym homodimerze EcRDBD.

7.2.1.3. Mutanty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD wykazują plastyczność podczas tworzenia heterodimerów z UspDBD na *hsp27_{pal}*

W celu przeanalizowania oddziaływania mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD z białkiem UspDBD typu „dzikiego” na *hsp27_{pal}*, wykonano eksperymenty EMSA (6.2.3.4.) używając równomolowych stężeń końcowych obu DBD (120 nM) (Rys.7.19.). Uzyskane wyniki pokazały, że tylko reszta R27 białka EcRDBD jest bezwzględnie niezbędna w tworzeniu heterodimeru (Rys.7.19.A, ślad: 7). Kontrastuje to z wynikami otrzymanymi dla homodimerów (i monomerów) EcRDBD_{XYZ}, gdzie mutacje reszt K22 i R26 okazały się być również kluczowymi dla wiązania *hsp27_{pal}* (Rys.7.17.A, ślady: 5 i 7). Oznacza to, że w heterodimerze z UspDBD, białko EcRDBD lepiej toleruje te podstawienia. Co więcej, zakres obserwowanych zmian w powinowactwie heterodimerów UspDBD/EcRDBD_{XYZ} utworzonych przez mutanty E19A, G20A, G23A, S28A i K31A do *hsp27_{pal}* był zdecydowanie mniejszy niż dla homodimerów i monomerów (porównaj Rys.7.17.A i B z Rys.7.19.A i B). Może to sugerować, że reszty z α -helisy rozpoznającej element regulatorowy białka EcRDBD wykazują różne właściwości w homodimerach i heterodimerach. Ponadto, podobnie jak zaobserwowano to dla mutantów kasety T (7.1.1.3.), stanowić to może odzwierciedlenie dużej tolerancji EcRDBD na wprowadzone mutacje podczas tworzenia kompleksu heterodimerycznego z partnerem, białkiem UspDBD.

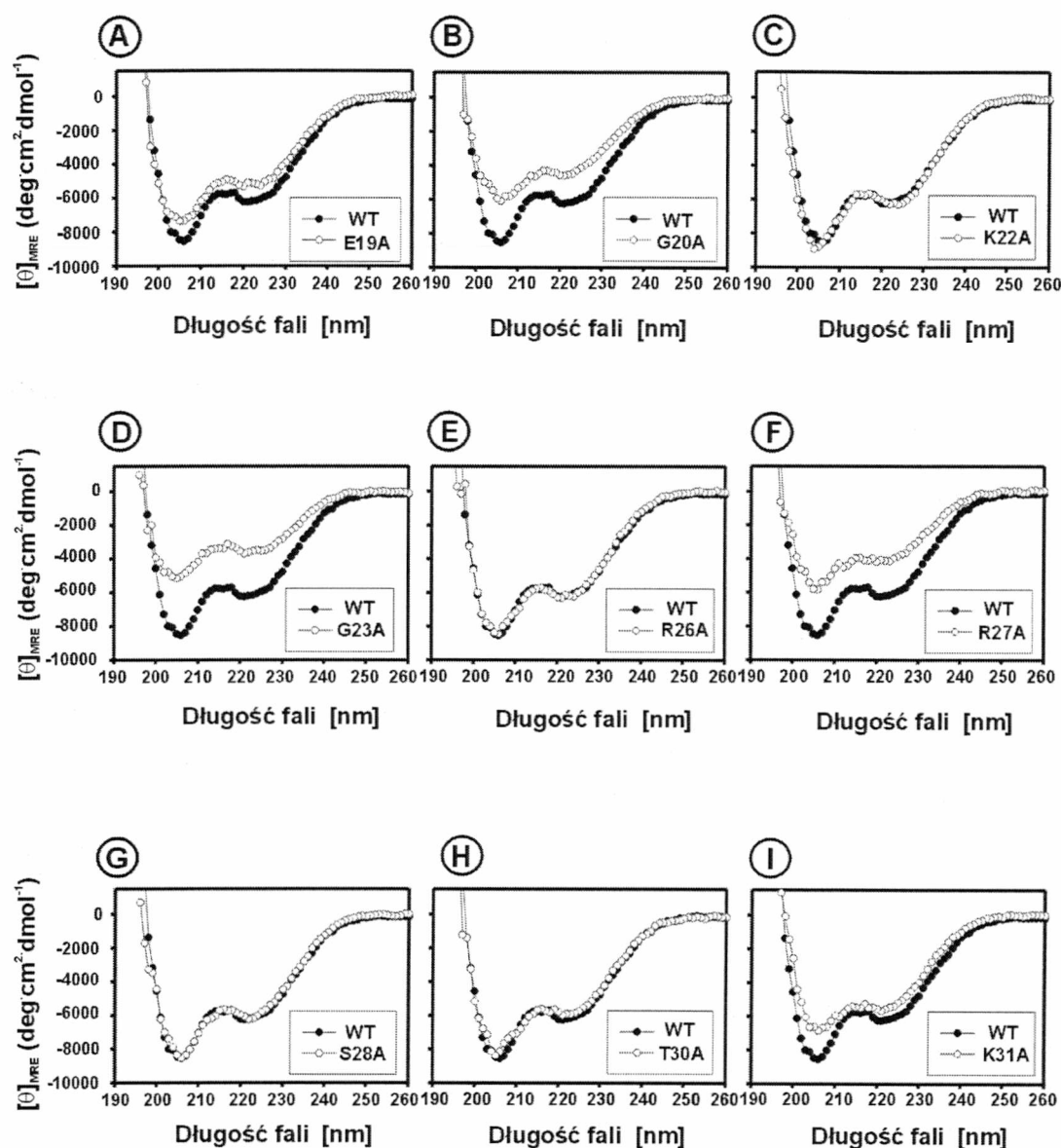


Rys.7.19. Kluczowe reszty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy dla formowania heterodimerów EcRDBD z UspDBD na *hsp27_{pal}*.

EMSA wykonywano inkubując *hsp27_{pal}* z równomolowymi ilościami EcRDBD_{XYZ} i partnera UspDBD (A, ślady 2-11). Panel (A) przedstawia reprezentacyjny autoradiogram, natomiast (B) przedstawia wyniki analiz ilościowych eksperymentów EMSA (ślady: 2-11 na panelu (A)). Kolumny z odchyleniami standardowymi oznaczają średnią wartość uzyskaną z trzech niezależnych eksperymentów. Stężenia białek wynosiły: 120 nM (po 60 nM określonych DBD) (A) (ślady: 2-11); ślad 12, 120 nM białka UspDBD; ślad 13, 120 nM białka EcRDBD_{WT}. Kompleksy monomeryczne oznaczono CI, natomiast dimeryczne przez CII. Indeks E pochodzi od EcRDBD a U od UspDBD, odpowiednio; F - wolna sonda.

7.2.1.4. Wpływ mutacji aminokwasów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy białka EcRDBD na jego strukturę

W kolejnym eksperymencie postanowiono sprawdzić, czy zaobserwowane wcześniej zmiany powinowactwa mutantów α -helisy rozpoznającej DNA białka EcRDBD do *hsp27_{pal}* są wynikiem utraty danej reszty, czy też są one skutkiem wpływu podstawienia resztą alaniny danego aminokwasu na strukturę EcRDBD. W tym celu przeprowadzono pomiary CD w analogicznych warunkach jak dla mutantów kasety T (6.2.3.5.). Jak pokazano na Rys.7.20.C, E, G i H, widma CD mutantów K22A, R26A, S28A i T30A były zasadniczo identyczne z widmem CD białka typu „dzikiego” (w Tabeli 7.3. zamieszczono ilościową analizę zmian w strukturze drugorzędowej). Wobec tego zaobserwowane zmiany aktywności wiązania DNA dla tych białek mogą być zinterpretowane jako utrata kontaktu danych reszt z *hsp27_{pal}*. Intensywności widm CD dla pozostałych EcRDBD_{XYZ} były obniżone w stosunku do widma EcRDBD_{WT}, co świadczyć może o zmniejszeniu zawartości struktury drugorzędowej (patrz Tabela 7.3.) lub przesunięciem w równowadze pomiędzy sfałdowanymi a rozfałdowanymi



Rys.7.20. Widma CD mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD.

Eliptyczność monitorowano w zakresie 190-260 nm. Każde zarejestrowane przez aparat widmo CD stanowiło rezultat akumulacji i uśrednienia pięciu skanów pojedynczego pomiaru. *Pełnymi kółkami* oznaczono widmo białka $\text{EcRDBD}_{\text{WT}}$, natomiast *pustymi kółkami* pokazano widma określonych $\text{EcRDBD}_{\text{XYZ}}$. $[\theta]_{\text{MRE}}$ oznacza molową eliptyczność resztową ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$). Pozostałe szczegóły opisano w Materiałach i Metodach (6.2.3.5.).

cząsteczkami EcRDBD. Mogłoby to oznaczać, że zaobserwowane funkcjonalne efekty dla reszt E19, G20, G23, R27 i K31 mogą być interpretowane zarówno jako konsekwencja strukturalnych perturbacji wywołanych wprowadzoną mutacją jak i utraty poszczególnych reszt. Co ciekawe, pośród tych reszt tylko podstawienie reszty R27 alaniną prowadziło do znaczącego defektu wiązania DNA w przypadku homo- i heterodimerów. Równocześnie mutanty G20A i G23A, które razem z białkiem R27A wykazywały największe zmiany w widmach CD, zachowały pełną zdolność do tworzenia heterodimerów na *hsp27_{pal}*.

Tabela 7.3. Procentowa zawartość struktur drugorzędowych mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy, obliczona na podstawie analiz widm CD.

białko	α -helisa			β -struktura			β -zgięcia	struktury nieuporządkowane	RMSD
	regularna	zaburzona	suma	regularna	zaburzona	suma			
WT	10,6	9,9	20,5	11,3	7,3	18,6	14,6	46,4	0,063
E19A	8,1	8,5	16,6	14,0	8,2	22,2	13,9	47,3	0,066
G20A	4,9	6,2	11,1	16,4	8,9	25,3	16,6	46,9	0,048
K22A	9,8	9,0	18,8	9,9	6,5	16,4	13,5	51,2	0,042
G23A	3,5	5,5	9,0	19,6	9,4	29,0	14,8	47,3	0,073
R26A	9,7	9,3	19,0	11,4	7,4	18,8	15,8	46,5	0,092
R27A	3,8	5,8	9,6	19,0	9,2	28,2	15,5	46,6	0,057
S28A	9,3	9,5	18,8	10,9	6,8	17,7	14,4	49,1	0,063
T30A	8,6	8,7	17,3	11,4	7,3	18,7	15,6	48,4	0,062
K31A	8,0	8,4	16,4	15,3	8,7	24,0	16,4	43,2	0,039

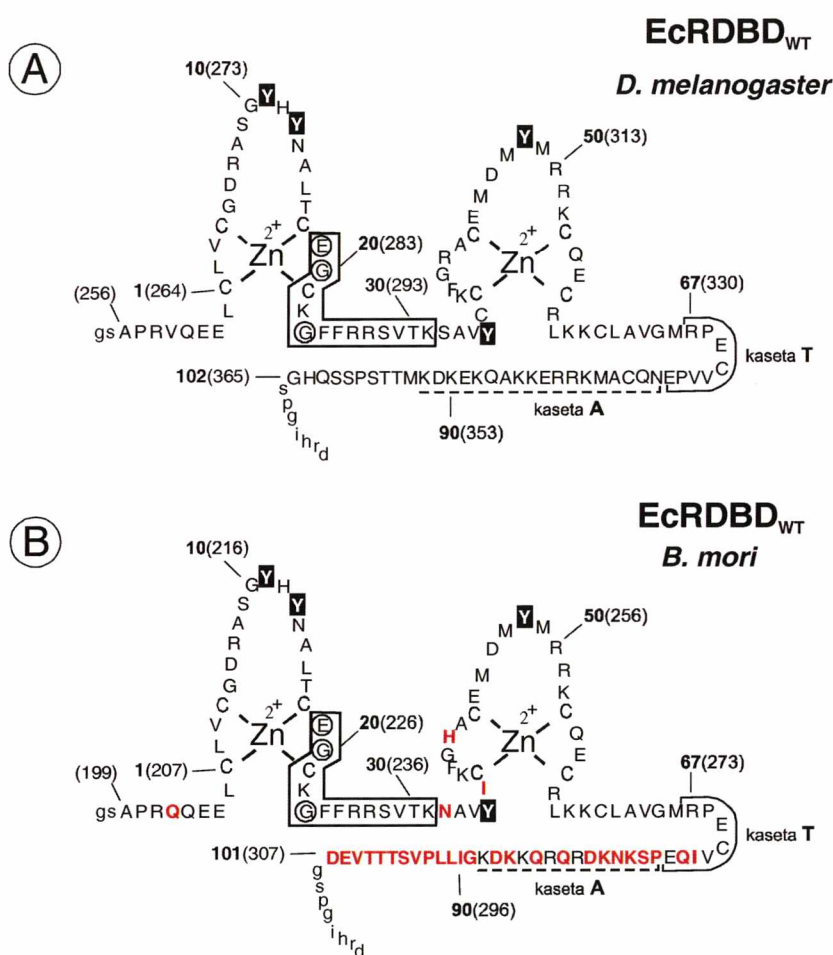
W Tabeli przedstawiono procentową zawartość struktur drugorzędowych dla każdego z rekombinowanych białek, obliczoną programem CONTIN/LL z pakietu CDPPro (6.2.3.5.), w oparciu o widma CD przedstawione na Rys.7.20.. Pozostałe szczegóły takie jak w podpisie pod Tabelą 7.1. (7.1.1.4.).

7.3. BADANIE STABILNOŚCI TERMODYNAMICZNEJ EcRDBD

7.3.1. Denaturacja chemiczna z użyciem chlorowodorku guanidyny pokazała, że EcRDBD jest białkiem niestabilnym

Wyniki uzyskane po przeprowadzeniu analiz mutacyjnych dwóch niezmiernie istotnych regionów EcRDBD oraz badań strukturalnych pokazały, że wiele z mutantów EcRDBD wykazywało tolerancję na podstawienia reszt aminokwasowych alaniną. W szczególności sposób było to widoczne w obecności białka UspDBD. To spostrzeżenie sugeruje, że białko EcRDBD przejawia plastyczność pozwalającą mu na pewnego rodzaju jednoczesne „dopasowanie” zarówno do partnera, UspDBD jak i sekwencji właściwego elementu regulatorowego. Aby sprawdzić, czy to spostrzeżenie jest odzwierciedlone w stabilności

EcRDBD, początkowo przeprowadzono wstępne eksperymenty denaturacji termicznej. Profile denaturacyjne monitorowano spektrofotometrycznie przy długości fali 222 nm, w zakresie temperatur od 4°C do 96°C. Zaobserwowano brak kooperatywnego przejścia dla białek EcRDBD. Co więcej, w temperaturach powyżej 70°C dochodziło do agregacji białek i nieodwracalnej ich denaturacji (wyników nie pokazano). Postanowiono zatem przeprowadzić eksperymenty denaturacji chemicznej z użyciem chlorowodoru guanidyny (GdmCl) (6.2.3.6.). Proces denaturacji chemicznej monitorowano poprzez pomiar emisji fluorescencji reszt tyrozylowych zaliczanych do naturalnie występujących w białkach chromoforów, z uwagi na obecny w ich strukturze pierścień aromatyczny (Ghelis i Yon, 1982). EcRDBD (*D. melanogaster* i *B. mori*) posiada cztery reszty tyrozylowe: Y11, Y13, Y35 i Y48 (Rys.7.21.).

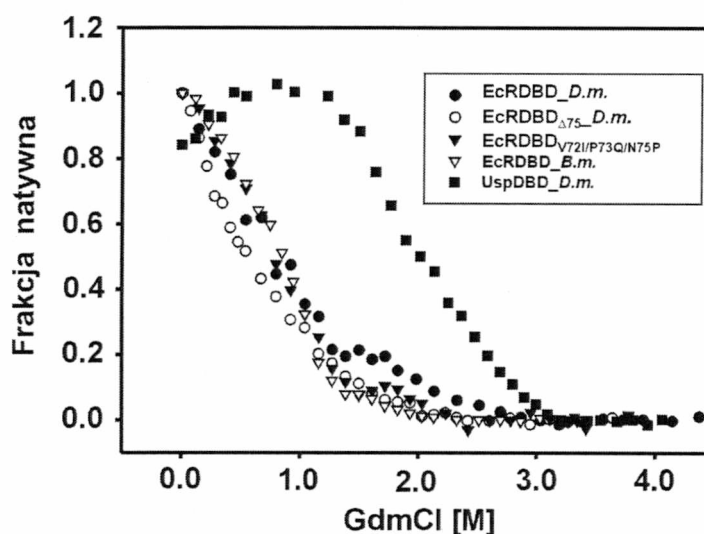


Rys.7.21. Lokalizacja reszt tyrozylowych w EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori*.

Schemat struktury pierwszorzędowej: EcRDBD z *D. m.* (A); EcRDBD z *B. m.* (B). Kolorem czerwonym zaznaczono reszty aminokwasowe w EcRDBD pochodzącym z *B. m.*, które różnią się w porównaniu z sekwencją białka z *D. m.*. Reszty tyrozylowe (Y11, Y13, Y35 i Y48) zaznaczono kolorem białym na tle czarnego prostokąta. Ramka obejmuje α -helisę rozpoznającą element regulatorowy. Kółkami

zaznaczono reszty kasety P. Linia przerywaną oznaczono regiony kaset A obu białek zidentyfikowane na podstawie uzyskanych wyników (7.1.2.2.). Pełne sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe EcR zamieszczono w Dodatku I (*D. m.*) i III (*B. m.*). Numeracja reszt zgodna z podpisem pod Rys.7.10. (7.1.2.).

Wyniki przedstawione na Rys.7.22. pokazały, że EcRDBD jest białkiem niestabilnym. Począwszy od najniższych stężeń denaturanta (od ~ 0,1 M) obserwowano stopniowy spadek udziału frakcji natywnych i wzrost form rozwiniętych (Rys.7.22., *pełne kółka*). W celu sprawdzenia, czy profil ten jest charakterystyczny tylko dla EcRDBD z *D. melanogaster*, postanowiono poddać denaturacji białko EcRDBD z *B. mori*. Uzyskana krzywa (Rys.7.22., *puste trójkąty*) praktycznie pokrywała się z krzywą EcRDBD z *D. melanogaster*, co sugeruje podobieństwo w strukturze białek EcRDBD. Potwierdził to również rezultat otrzymany dla potrójnego mutantu EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P} (Rys.7.22., *pełne trójkąty*). Wcześniejsze doniesienia dotyczące eksperymentów denaturacji białek GRDBD i ERDBD (Low i wsp., 2002) pokazały, że białka te, pozbawione zasadowego CTE, wykazywały większą stabilność.



Rys.7.22. Profile denaturacyjne EcRDBD.

Proces denaturacji rekombinowanych DBD monitorowano poprzez pomiary fluorescencji reszt tyrozylowych zgodnie z opisem zamieszczonym w Materiałach i Metodach (6.2.3.6.). Rysunek przedstawia krzywe dla następujących domen: EcRDBD z *D. melanogaster* (*D. m.*), *pełne kółka*; EcRDBD_{Δ75} (*D. m.*), *puste kółka*; EcRDBD_{V72I/P73Q/N75P}, *pełne trójkąty*; EcRDBD z *B. mori* (*B. m.*), *puste trójkąty*; UspDBD (*D. m.*), *pełne kwadraty*. Pomiary wykonywano w niniejszych eksperymentach tylko dla wymienionych domen EcRDBD. Krzywa dla białka UspDBD (*D. m.*) została wykonana przez mgr inż. Agnieszkę Kowalską (Kowalska i wsp., 2003) i zamieszczono ją na Rysunku za zgodą Autorki.

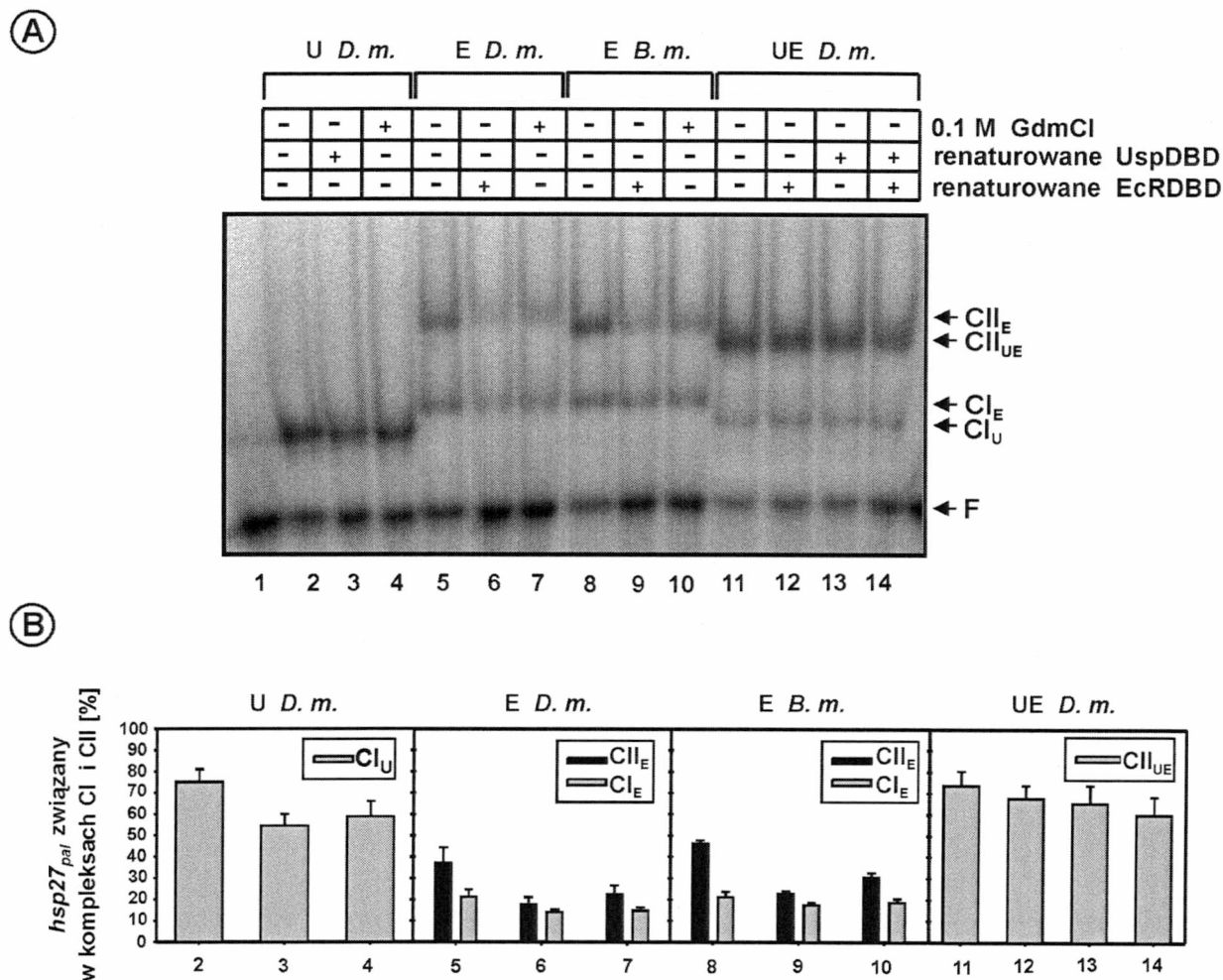
Aby zbadać, czy stabilność EcRDBD jest zależna od obecności regionu CTE, wykonano pomiary dla mutantu pozbawionego naładowanych dodatnio reszt kasety A (EcRDBD $_{\Delta 75}$ z *D. melanogaster*) (7.1.2.)) (EcRDBD $_{\Delta A}$; Niedziela-Majka i wsp., 2000). Jak zaobserwowano krzywa denaturacyjna dla tego białka była bardzo zbliżona jest do krzywej dla białka typu „dzikiego” (Rys.7.23., *puste kółka*). Uzyskane wyniki oznaczają, że sekwencja kasety A nie destabilizuje EcRDBD. Tak więc brak stabilności jest inherentną cechą rdzenia domeny. Krzywa denaturacji białka UspDBD (Kowalska i wsp., 2003) (Rys.7.22., *pełne kwadraty*) wykazywała wyraźne kooperatywne przejście, zbliżone do zaobserwowanego ostatnio dla domen wiążących DNA ssaczycy receptorów steroidowych (Low i wsp., 2002). Oznaczać to może, że EcRDBD jest dużo mniej stabilnym białkiem niż jego partner - białko UspDBD.

7.3.2. Renaturowany EcRDBD jest zdolny do wiązania *hsp27_{pal}*

W kolejnym eksperymencie postanowiono zbadać, czy uprzednio zdenaturowany GdmCl EcRDBD po renaturacji jest zdolny do odtworzenia swojej aktywnej struktury. W tym celu, EcRDBD z *D. melanogaster* i z *B. mori* poddano wstępnej denaturacji inkubując je w 4,0 M GdmCl, a następnie po rozcieńczeniu próbek tak, aby stężenie denaturanta wyniosło 0,1 M, zbadano ich zdolność do specyficznego wiązania elementu *hsp27_{pal}*, porównując ją z próbkami kontrolnymi (Rys.7.23.A i B). Kontrole stanowiły białka, które nie zostały poddane denaturacji oraz białka inkubowane z 0,1 M GdmCl. Planując eksperyment wybrano takie stężenie końcowe GdmCl, przy którym udział natywnych frakcji EcRDBD wyniósł około 95% (patrz Rys.7.22.). Końcowe stężenie białka dobrano tak, aby było ono wystarczające do przeprowadzenia eksperymentów EMSA (218 nM) (6.2.3.7.). Jak zaobserwowano, homodimer utworzony przez EcRDBD z *D. melanogaster* odzyskał około 79% aktywności wiązania *hsp27_{pal}* (Rys.7.23.A i B, *ślady*: 6 i 7), natomiast kompleks homodimeryczny EcRDBD z *B. mori* około 75% (Rys.7.23.A i B, *ślady*: 9 i 10). UspDBD wiązało *hsp27_{pal}* z prawie 90% aktywnością próbki kontrolnej (Rys.7.23.A i B, *ślady*: 3 i 4). Należy zwrócić uwagę, iż w przypadku heterodimerów z *D. melanogaster* utworzonych przez niedenaturowane i renaturowane DBD, zaobserwowano prawie identyczne powinowactwo do elementu regulatorowego, które wynosiło około 90% aktywności wiązania DNA przez heterodimer niepoddany działaniu denaturanta (Rys.7.23.A i B, *ślady*: 11-14).

Uzyskane rezultaty potwierdzają wyniki eksperymentów denaturacji (7.3.1.), tzn. to, że w przeciwieństwie do partnera UspDBD, białko EcRDBD (zarówno z *D. melanogaster* jak i z

B. mori) charakteryzuje się niższą stabilnością. Nie mniej jednak, nawet po cyklu denaturacja/renaturacja EcRDBD jest w stanie odzyskać swoją aktywną konformację, co przejawia się zdolnością do tworzenia kompleksów homo- i heterodimerycznych na *hsp27_{pal}*.



Rys.7.23. Charakterystyka renaturowanego białka EcRDBD.

Eksperymenty EMSA wykonano inkubując *hsp27_{pal}* z określonymi białkami typu „dzikiego” z *D. melanogaster* (*D. m.*) i z *B. mori* (*B. m.*). Panel (A) pokazuje rezultaty uzyskane dla białek (8,7 μM), które inkubowano wstępnie z 4,0 M chlorowodorkiem guanidyny (GdmCl), a następnie rozcieńczono tak, aby uzyskać 0,1 M stężenie denaturanta (opisane z prawej strony jako renaturowane DBD) (ślady: 3, 6, 9 i 14) oraz dla takich domen, które nie były traktowane GdmCl (ślady: 2, 5, 8 i 11) lub denaturant został dodany w końcowym stężeniu 0,1 M (opisane jako 0,1 M GdmCl) (ślady: 4, 7 i 10); ślad 12 - UspDBD inkubowano w obecności renaturowanego EcRDBD; ślad 13 - EcRDBD inkubowano z renaturowanym UspDBD. Stężenia białek: ślady 1-10, 218 nM określonej DBD; ślady 11-14, po 109 nM danej DBD. Panel (B) przedstawia analizę ilościową eksperymentów, których reprezentacyjne zdjęcie zamieszczono na panelu (A). Analizę wykonano na aparacie Fuji Film FLA-3000 Fluorescent Image Analyzer, wykorzystując oprogramowanie AIDA Bio-Package (6.2.3.4.). Kolumny z odchyleniami standardowymi oznaczają średnią wartość uzyskaną z trzech niezależnych eksperymentów. Kompleksy monomeryczne oznaczono CI, natomiast dimeryczne przez CII. Indeks E pochodzi od EcRDBD a U od UspDBD, odpowiednio; F - wolna sonda.

DYSKUSJA

8

Funkcjonalny receptor owadziego hormonu 20-hydroksyekdyzonu jest szczególnie atrakcyjnym obiektem badawczym. 20E jest hormonem nietoksycznym dla organizmu człowieka. Właściwość ta stwarza ogromne możliwości w projektowaniu minimalnych czynników transkrypcji zdolnych do modulowania ekspresji genów będących pod kontrolą 20E, co może znaleźć zastosowanie w terapiach genowych i agrochemii do kontroli populacji owadów (3.4.2.). Co więcej, w przeciwieństwie do receptorów hormonów steroidowych kręgowców, EcR nie jest sam zdolny do wiązania swojego liganda, 20E. Wiązanie hormonu przez EcR i aktywacja genów zależnych od 20E stymulowane są przez tworzenie heterodimeru z partnerem, białkiem Usp (3.4.2.). Pomimo, że w przeciwieństwie do heterodimerów receptorów jądrowych kręgowców badania nad białkami EcR i Usp nie są prowadzone tak intensywnie, z uwagi na kombinację właściwości wykazywaną przez EcR, zajmuje on wyjątkowe miejsce pomiędzy członkami nadrodziny. Kolejną intrygującą cechą funkcjonalnego receptora 20E jego preferencja wiązania wysoce zdegenerowanych palindromowych elementów regulatorowych z odstępnikami pomiędzy półmiejscami długości 1 pary zasad (3.4.3.). Ten atrybut wyraźnie odróżnia heterodimer Usp/EcR od heterodimerów receptorów jądrowych kręgowców, które preferują inherentnie asymetryczne sekwencje regulatorowe zorganizowane w postaci bezpośrednich powtórzeń (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Najczęściej obecnie badaną naturalną sekwencją EcRE jest *hsp27_{pal}* (3.4.3.). Badania Niedzieli-Majki i wsp. (2000) po raz pierwszy pokazały, że naturalne EcRE mogą funkcjonować jako asymetryczne elementy regulatorowe w podobny sposób do działania DR u kręgowców oraz, że w formowaniu heterodimeru UspDBD/EcRDBD na *hsp27_{pal}* prawdopodobnie zaangażowane są reszty aminokwasowe z różnych regionów obu DBD, tworząc asymetryczną powierzchnię dimeryzacyjną (3.4.3.). Wyniki te częściowo zostały

potwierdzone w opublikowanych pod koniec ubiegłego roku dwóch strukturach krystalicznych heterodimerów UspDBD/EcRDBD i RXRDBD/EcRDBD na syntetycznym doskonałym elemencie palindromowym IR1 (5'-AGGTCAATGACCT-3') (Devarakonda i wsp., 2003). Otrzymane struktury krystaliczne pokazały, że w przeciwieństwie do DBD receptorów kręgowców tworzących heterodimery z RXRDBD na DR w konfiguracji „głowa do ogona” (3.3.3.3.), kompleksy te na sztucznym elemencie palindromowym ułożone są w sposób charakterystyczny dla DBD receptorów hormonów steroidowych (3.3.3.1.), mianowicie „głowa do głowy” (Devarakonda i wsp., 2003). RXRDBD i UspDBD wiążą się z 5'-końcowym półmiejscem IR1, natomiast EcRDBD w obu kompleksach wiąże się do półmiejsc 3'-końcowego. Identyczne fragmenty DBD EcR, Usp i RXR są zaangażowane w oddziaływanie białko-białko pomiędzy podjednostkami. Jednakże, z uwagi na różnice w strukturach pierwszorzędowych pomiędzy odpowiednimi fragmentami EcRDBD a UspDBD i RXRDBD, powierzchnia dimeryzacyjna wykazuje wyraźny asymetryczny charakter (Devarakonda i wsp., 2003), co potwierdziło wcześniejsze wyniki uzyskane na podstawie badań biochemicznych heterodimeru UspDBD/EcRDBD na *hsp27_{pal}* (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Kontrastuje to z wynikami otrzymanymi dla kompleksów DBD receptorów steroidowych na elementach palindromowych oraz DR, gdzie obie podjednostki angażują w tworzenie symetrycznych kontaktów identyczne reszty aminokwasowe (3.3.3.1. i 3.3.3.2.).

Tak więc, receptor EcR wykazuje cechy typowe zarówno dla przedstawicieli receptorów steroidowych jak i niesteroidowych. Może on zatem stanowić ogniwo ewolucyjne pomiędzy receptorami hormonów steroidowych kręgowców a receptorami niesteroidowymi (Devarakonda i wsp., 2003).

W celu wykorzystania DBD funkcjonalnego receptora ekdystteroidowego do konstruowania minimalnych przełączników transkrypcyjnych, niezbędne są badania molekularnych podstaw specyficzności oddziaływania z sekwencjami DNA, łącznie z analizami strukturalnymi i funkcjonalnymi.

W niniejszej pracy postanowiono zbadać rolę C-terminalnej sekwencji domeny wiążącej DNA białka EcR w specyficznym rozpoznawaniu naturalnego elementu *hsp27_{pal}*.

8.1. ROLA SEKWENCJI CTE EcRDBD W SPECYFICZNYM ODDZIAŁYWANIU Z ELEMENTEM REGULATOROWYM *hsp27_{pal}*

Badania mutacyjne oraz analizy struktur krystalicznych DBD receptorów jądrowych związanych z asymetrycznymi elementami DR podkreśliły istotne znaczenie sekwencji CTE w tworzeniu kompleksów na DNA (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Region CTE, w którego skład wchodzi kaseta T i kaseta A, stanowi unikalny i charakterystyczny element strukturalny, który pośredniczy w dimeryzacji na asymetrycznych HRE i wnosi znaczący wkład w specyficzność wiązania DNA (3.3.3.3.).

8.1.1. Mutacje EcRDBD w regionie przypuszczalnej kasety T

W przeciwieństwie do kasety A, której główną rolą jest oddziaływanie z elementem regulatorowym, kaseta T wykazuje równocześnie wiele funkcji, takich jak np. udział w tworzeniu specyficznych kontaktów z parami zasad DNA, formowanie płaszczyzny dimeryzacyjnej i co najważniejsze, odpowiednie ukierunkowanie dalej położonej kasety A w celu przyjęcia przez nią właściwej pozycji na HRE (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Uważa się, że reszty kasety T, łącznie z α -helisą kasety A, są ważnymi elementami definiującymi właściwą konformację CTE, biorącą udział w dyskryminacji sekwencji HRE (3.3.3.3.1.). Jak pokazano na Rys.7.8. (7.1.1.5.), z wyjątkiem dwóch pozycji w sekwencji *B. mori*, reszty aminokwasowe kasety T są zachowane w toku ewolucji pomiędzy wszystkimi innymi białkami EcR. W przypadku reszt P68 i E74, ich zachowana pozycja w sekwencji kasety T nie może być w prosty sposób wyjaśniona, gdyż zgodnie z uzyskanymi wynikami, reszty te wydają się być zbędne przynajmniej w wiązaniu DNA i stabilizacji struktury EcRDBD. Co jest interesujące, reszta R67, jak się wydaje, powinna być zaangażowana w kontakty z DNA, a nie w stabilizację domeny. W strukturze kryształu heterodimeru UspDBD/EcRDBD na IR1, reszta ta nie tworzy żadnych kontaktów z IR1 (Devarakonda i wsp., 2003). Możliwe jest, że zaobserwowany dla niej efekt związany jest z oddziaływaniem z naturalnym elementem, jakim jest *hsp27_{pal}*. Wyniki otrzymane dla pozostałych przeanalizowanych reszt aminokwasowych wyraźnie pokazują, że są one zaangażowane w stabilizację struktury białka, co wykazały zmiany w widmach CD.

8.1.1.1. Reszty C70, V71, V72 i P73, tworzące rdzeń kasety T EcRDBD, pełnią ważną rolę strukturalną

W przypadku mutantów V71A, V72A i P73A zaobserwowano wyraźne zmiany w powinowactwie do *hsp27_{pal}*, zarówno monomerów jak i dimerów. Reszty te, łącznie z C70, tworzą hydrofobowy rdzeń regionu kasety T i zlokalizowane są w tej części domeny, gdzie w strukturze krystalicznej kompleksu UspDBD/EcRDBD na IR1 zaobserwowano znaczącą zmianę w orientacji łańcucha polipeptydowego (Devarakonda i wsp., 2003). Odpowiedzialne za nią są dwa kolejne skręty: β -skręt, utworzony przez reszty C70, V71, V72 i P73, oraz γ -skręt złożony z reszt P73, E74 i N75 (Devarakonda i wsp., 2003). Zaangażowanie w drugi skręt reszty N75 i obecność tuż za nią Q76 tłumaczyłoby niekonkluzywność wyników otrzymanych dla mutantów N75A i Q76A.

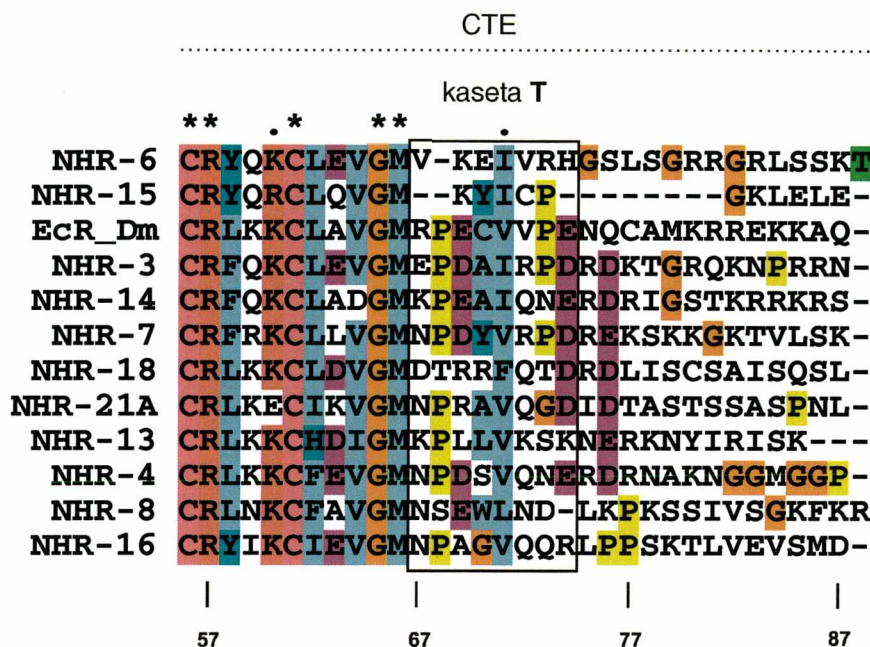
8.1.1.2. Wyjątkowa rola reszty P73 w utrzymywaniu prawidłowej konformacji CTE EcRDBD

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na wyjątkową rolę reszty P73 w EcRDBD. Reszta ta zlokalizowana jest na N-końcu sekwencji kasety A. Podstawienie w jej miejsce alaniny wywołało dramatyczny spadek zdolności wiązania homodimeru i znaczący wpływ na tworzenie heterodimeru na *hsp27_{pal}*. W strukturze krystalicznej UspDBD/EcRDBD/IR1 (Devarakonda i wsp., 2003) reszta ta nie tworzy żadnych kontaktów istotnych dla stabilizacji rdzenia domeny. Najprawdopodobniej zaangażowana jest ona we właściwe sfałdowanie regionu CTE. Teoretycznie, EcRDBD pozbawiony kasety A posiada wszystkie reszty aminokwasowe niezbędne dla tworzenia heterodimeru z UspDBD na elemencie regulatorowym. Tak przynajmniej można wnioskować z uzyskanej struktury krystalicznej. Jednakże, wyniki badań biochemicznych dla EcRDBD z *D. melanogaster* (Niedziela-Majka i wsp., 2000) oraz EcRDBD z *B. mori* otrzymane w niniejszej pracy wyraźnie wskazują, że region kasety A jest niezbędny dla tworzenia przez to białko homo- i heterodimerów na naturalnym elemencie *hsp27_{pal}*. Możliwe jest, że reszta P73, której grupy: karbonylowa i amidowa zaangażowane są w tworzenie istotnych wiązań wodorowych β - i γ -skrętów, stanowi kluczową resztę dla utrzymania właściwej konformacji i pozycji kasety A EcRDBD. Podobna funkcja może być przypisana reszcie V72. W strukturze UspDBD/EcRDBD/IR1 (Devarakonda i wsp., 2003) reszta V72 zlokalizowana jest poza rdzeniem DBD. Co więcej, jej łańcuch boczny nie jest zorientowany w kierunku szkieletu fosforanowego DNA. Z kolei rola V71 wydaje się być bardziej skomplikowana. W strukturze

krystalicznej jednakże jest ona zaangażowana w oddziaływania z łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych rdzenia domeny: V29 i Y13. Unikalność „trypletu” V71, V72 i P73 jest dodatkowo podkreślona przez wyniki otrzymane dla reszt E69 i C70, które są zlokalizowane w krótkim α -helikalnym regionie (helikalny skręt typu $3/_{10}$), na początku sekwencji kasety T. Chociaż ich mutacje znacząco wpływają na strukturę białka, to nie wywierają praktycznie żadnego defektu w powinowactwie homodimerów do *hsp27_{pal}*. Warto zaznaczyć, że helikalny skręt typu $3/_{10}$ zaobserwowano również w strukturach TRDBD i VDRDBD (3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.), gdzie wchodzi on w skład płaszczyzny dimeryzacyjnej podjednostki związanej z 3'-kończowym półmiejscem elementu regulatorowego. W przypadku EcRDBD fragment ten może odpowiadać za stabilizację konformacji łańcucha polipeptydowego w tej części CTE.

8.1.1.3. Potencjalny region kasety T niektórych receptorów jądrowych nicienia *C. elegans* wykazuje podobieństwo w sekwencji aminokwasowej do kasety T EcRDBD

Jak wspomniano we Wstępie (3.4.2.), dotychczas nie zidentyfikowano genu *EcR* poza stawonogami. Pomimo, że chociaż w literaturze opisano efekty jakie wywierają ekdysteroidy u niektórych pasożytniczych nicieni, w genomie nicienia *C. elegans* nie stwierdzono obecności homologu *EcR* (3.4.2.). Jednakże porównanie sekwencji aminokwasowych przykładowych receptorów jądrowych zidentyfikowanych w genomie *C. elegans* pokazało, że w obrębie potencjalnych kaset T w CTE tych receptorów, występuje duże podobieństwo ich struktury pierwszorzędowej w stosunku do CTE EcRDBD (Rys.8.1.). Na szczególną uwagę zasługuje zachowanie w toku ewolucji reszt prolinylowych w identycznych pozycjach: P68 i P73. Co więcej, zachowany jest także hydrofobowy rdzeń kasety T. Sugeruje to, że region ten w niektórych receptorach u *C. elegans* może pełnić zbliżoną rolę funkcjonalno-strukturalną do analogicznego obszaru CTE EcRDBD, łącznie z funkcją kluczowej reszty P73.



Rys.8.1. Porównanie sekwencji CTE EcRDBD z *D. melanogaster* z sekwencjami CTE receptorów jądrowych znalezionych w genomie *C. elegans*.

Analizę porównawczą wykonano wykorzystując program ClustalX (1.81) (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). Klamrą oznaczono regiony obejmujące kasetę T. Sekwencje pochodzą z bazy SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/sprot/>). Skrót NHR pochodzi od ang., *nuclear hormone receptor*. Kody dostępu są następujące (w nawiasach): NHR-3 (Q9XTJ4), NHR-4 (O45436), NHR-6 (P41829), NHR-7 (Q20765), NHR-8 (Q9XYB7), NHR-13 (Q21701), NHR-14 (O02151), NHR-15 (O61854), NHR-16 (Q27521), NHR-18 (O16360), NHR-21A (Q86NH8), EcR_Dm (P34021). Pozostałe szczegóły jak w podpisie pod Rys.7.8. (7.1.1.5.).

8.1.2. Minimalne fragmenty kasety A EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* wystarczające do wiązania *hsp27_{pal}* i kooperatywnego tworzenia kompleksów na tym elemencie

Otrzymane struktury heterodimerów RXRDBD/EcRDBD i UspDBD/EcRDBD nie rozstrzygnęły roli CTE w rozpoznawaniu syntetycznego palindromu IP1 (Devarakonda i wsp., 2003). Interesujące jest, iż CTE EcRDBD w tych dwóch kompleksach posiada różną konformację. W kompleksie z RXRDBD widocznych jest tylko siedem z 25 reszt aminokwasowych kasety A, tworzących krótką α -helisę (do reszty E83). Kasetę A jest skierowana w kierunku 5'-końcowego półmiejscu IR1 (Devarakonda i wsp., 2003), podobnie jak w przypadku CTE TRDBD w kompleksie z RXRDBD na DR4 (3.3.3.3.). Natomiast w strukturze heterodimeru UspDBD/EcRDBD na IR1, fragment ten nie jest widoczny. Co więcej, region CTE EcRDBD w kompleksie z UspDBD jest nieuporządkowany (Devarakonda

i wsp., 2003). Wyniki otrzymane w niniejszej pracy, dla CTE EcRDBD z *B. mori*, potwierdziły w sposób wyraźny wcześniejsze obserwacje uzyskane dla CTE EcRDBD z *D. melanogaster* (Niedziela-Majka i wsp., 2000), tzn. że kaseta A jest niezbędna dla EcRDBD dla specyficznego wiązania naturalnego elementu *hsp27_{pal}* i tworzenia na nim w sposób synergiczny kompleksów.

Po raz pierwszy zidentyfikowano minimalne fragmenty kasety A, wystarczające dla tych oddziaływań. W przypadku CTE z EcRDBD *D. melanogaster* jest to fragment ograniczony resztami N75 i K92 (o dziewięć reszt więcej niż widocznych jest w strukturze krystalicznej), natomiast w przypadku EcRDBD z *B. mori* kaseta A obejmuje reszty P75 i G89. Co więcej, fragment niewidoczny w kryształach, pomiędzy resztami K85 a K92 w przypadku CTE EcRDBD z *D. melanogaster*, wydaje się być istotny dla tworzenia homodimerów na *hsp27_{pal}*. Zastanawiające jest, że zidentyfikowane minimalne sekwencje kasety A z dwóch EcRDBD posiadają różną długość. W przeciwieństwie do sekwencji rdzenia DBD receptorów jądrowych, region CTE wykazuje małą homologię w strukturze pierwszorzędowej w rodzinie receptorów jądrowych (3.3.3.3.). Analizy porównawcze dodatkowo pokazały (Rys.7.8. (7.1.1.5.) i 7.10. (7.1.2.)), że sekwencje obejmujące region kasety A wykazują duże zróżnicowanie pomiędzy *D. melanogaster* a *B. mori*. Sugeruje to, że CTE w tych dwóch przypadkach może mieć różną konformację.

8.1.3. Czy sekwencja odpowiedzialna za lokalizację jądrową EcR może znajdować się w jego CTE w DBD ?

Jak wspomniano we Wstępie (3.2.3.), sekwencje lokalizacji jądrowej (NLS) receptorów jądrowych znajdują się m.in. w regionie obejmującym CTE DBD. Nie wykazują one wysokiego zachowania w toku ewolucji. NLS stanowią krótkie sekwencje o dużej zawartości zasadowych reszt arginyłowych i lizyłowych. Uważa się, że mogą być one elementami „kotwiczącymi” białko na DNA po przetransportowaniu go do jądra (Krzyzaniak i wsp., 2000). Warto podkreślić, że sekwencje kaset A z *D. melanogaster* i *B. mori* wykazują zadziwiające podobieństwo do konsensusowych NLS zidentyfikowanych w innych białkach (3.2.3.). Tym samym można przypuszczać, że w CTE EcRDBD z *D. melanogaster* i *B. mori* zlokalizowane są NLS.

Interesująca byłaby weryfikacja uzyskanych w niniejszej pracy wyników z analizami struktury krystalicznej UspDBD/EcRDBD oraz homodimeru EcRDBD w kompleksie z *hsp27_{pal}*, gdyż jak się wydaje, tylko naturalny element może promować właściwe

uporządkowanie i konformację C-końcowej sekwencji EcRDBD. Wyniki wyraźnie pokazały, że CTE EcRDBD, w przeciwieństwie do receptorów kręgowców, jest odpowiedzialna przede wszystkim za stabilizację domeny oraz prawdopodobnie za specyficzne oddziaływanie z *hsp27_{pal}*.

8.2. ANALIZA MUTANTÓW α -HELISY ROZPOZNAJĄCEJ ELEMENT REGULATORY EcRDBD POTWIERDZIŁA DUŻĄ TOLERANCJĘ BIAŁKA NA WPROWADZONE MUTACJE, SZCZEGÓLNIE W OBECNOŚCI UspDBD

Wykonane analizy funkcjonalno-strukturalne reszt aminokwasowych wchodzących w skład α -helisy rozpoznającej element regulatorowy pokazały, że zaskakująca tolerancja EcRDBD na podstawienia reszt aminokwasowych alaniną, dotyczy nie tylko regionu CTE, ale jest to właściwość charakterystyczna dla całego EcRDBD (o plastyczności EcRDBD patrz niżej 8.3.).

W heterodimerze UspDBD/EcRDBD na IR1 resztami z α -helisy rozpoznającej DNA EcRDBD, odpowiedzialnymi za specyficzne kontakty z parami zasad 3'-końcowego półmiejscia syntetycznego IR1 okazały się być reszty: E19, G20, K22, R26 i R27 (Devarakonda i wsp., 2003). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pokazują, że poza jednym wyjątkiem (E19), wszystkie te reszty są również kluczowe w przypadku wiązania 5'-końcowego półmiejscia *hsp27_{pal}*. Dwie inne reszty (S28 i K31), które nie zostały zidentyfikowane w kryształach jako ważne dla oddziaływania z IR1, wydają się być istotne w tworzeniu specyficznych kontaktów z naturalnym *hsp27_{pal}*. Co ciekawe, identyczne reszty odpowiedzialne są za tworzenie homodimerów EcRDBD. Przeprowadzone wcześniej badania biochemiczne (Niedziela-Majka i wsp., 2000) pokazały, że 5'-końcowe półmiejsce *hsp27_{pal}* wykazuje większe powinowactwo wobec EcRDBD niż półmiejsce 3'-końcowe (3.4.3.). Tym samym możliwe jest, że uzyskane wyniki dla homodimeru EcRDBD odzwierciedlają bezpośredni wpływ określonych mutacji na oddziaływanie EcRDBD z 5'-końcowym półmiejscem. Ponadto, jak się wydaje, reszty G20 i S28 są zaangażowane w oddziaływanie podjednostki homodimeru związanej z półmiejscem 3'-końcowym.

Otrzymane wyniki po raz pierwszy pokazały zróżnicowanie funkcji reszt aminokwasowych z α -helisy rozpoznającej DNA EcRDBD w oddziaływaniu z *hsp27_{pal}*. Największy defekt w wiązaniu DNA zaobserwowano dla trzech reszt (K22, R26 i R27), które

są bardzo często zaangażowane w tworzenie specyficznych kontaktów różnych DBD receptorów jądrowych z sekwencjami HRE (3.3.3., 3.3.3.1., 3.3.3.2., 3.3.3.3. i 3.3.3.3.1.). Jednakże wzorce tworzonych przez te reszty sieci wiązań wodorowych z parami zasad są zmienne i specyficzne wobec HRE. Sugeruje się, że reszty w pozycjach 26 i 31 są, poza kasetą P, kluczowymi resztami dla selektywnego rozpoznawania DNA (Hsieh i wsp., 2003). Analizy eksperymentów EMSA i widm CD pokazały, że tylko reszty K22, R26 i S28 w EcRDBD są odpowiedzialne za oddziaływanie z *hsp27_{pal}*, nie uczestniczą natomiast w stabilizacji α -helisy i, jak się wydaje, całej cząsteczki EcRDBD. Natomiast pozostałe reszty, istotne dla efektywnego wiązania *hsp27_{pal}*, włączając R27, są w pewnej mierze zaangażowane w stabilizację EcRDBD. W RXRDBD w pozycjach 26 i 27 znajdują się odpowiednio reszty K i R (3.3.3.3.). Pokazano, że w RXRDBD niezwiązanym z DNA reszty te oddziałują elektrostatycznie z regionem kasety T, co może stabilizować białko (3.3.3.3.). Analogicznie może to również mieć miejsce w przypadku EcRDBD. W związku z tym, zaobserwowane w powinowactwie do DNA zmiany nie mogą być wprost przyporządkowane utracie specyficznych kontaktów w wyniku wprowadzonych mutacji. Interesujący jest wynik uzyskany dla G23, gdzie mutacja w tej pozycji wyidukowała znaczące perturbacje strukturalne w EcRDBD, białko jednak z łatwością zaakceptowało tą zmianę.

8.3. PLASTYCZNOŚĆ EcRDBD

Białko EcRDBD wykazuje zadziwiającą tolerancję na wprowadzone mutacje, szczególnie w obecności partnera, białka UspDBD, w kompleksie na *hsp27_{pal}*. Otrzymane wyniki są całkowicie oryginalne. Przynajmniej w przypadku α -helisy rozpoznającej element regulatorowy, właściwość ta odróżnia EcRDBD od UspDBD. Ostatnio pokazano, że wywołane zmiany w powinowactwie UspDBD do *hsp27_{pal}* w wyniku podstawienia reszt aminokwasowych α -helisy rozpoznającej DNA białka UspDBD alaniną, są bezpośrednio odzwierciedlone w oddziaływaniach heterodimerów UspDBD/EcRDBD z *hsp27_{pal}* (Grad i wsp., 2002). Ta uderzająca różnica w strukturalnej plastyczności, nieobserwowana jak dotąd u żadnych DBD receptorów kręgowców tworzących heterodimeryczne kompleksy, może być wytłumaczona różnymi właściwościami obu DBD. W przeciwieństwie do UspDBD, EcRDBD wydaje się być białkiem mniej stabilnym, co ujawniły analizy krzywych denaturacyjnych, gdzie zaobserwowano brak kooperatywnego przejścia charakterystycznego dla białek globularnych, posiadających zdefiniowaną strukturę trzeciorzędową. Cecha ta,

łącznie z obserwacją, że pozorna masa cząsteczkowa EcRDBD (17,4 kDa), wyznaczona podczas filtracji żelowej, jest większa niż przewidziana (13,4 kDa) (Niedziela-Majka i wsp., 1998) sugeruje, że EcRDBD, lub przynajmniej niektóre fragmenty DBD, przejawia charakterystyczne właściwości białek natywnie nieustrukturyzowanych (IUP; ang., *intrinsically unstructured proteins*) (Tomba, 2002). Białka te charakteryzują się prawie kompletnym brakiem zdefiniowanej struktury trzeciorzędowej oraz wysokim stopniem plastyczności. Ponadto, uzyskują one właściwą konformację dopiero w odpowiednim środowisku lub w kontakcie z partnerem, co sprawia, że mogą tworzyć różnorodne oddziaływania z właściwymi partnerami (Tomba, 2002). Cecha ta, jak się wydaje, może być również przypisana EcRDBD. W przypadku receptorów jądrowych, regionem o zbliżonych właściwościach do białek IUP może być region A/B, który, jak pokazały analizy spektroskopii NMR i widm CD, wykazuje brak zdefiniowanej struktury drugorzędowej w nieobecności odpowiedniego partnera (lub właściwego środowiska) (3.2.2.). Nieopublikowane jeszcze wyniki uzyskane przez mgr inż. Annę Zoglowek (Zoglowek, 2004) wskazują, że EcRDBD jest zdolny nie tylko do tworzenia homodimerów i heterodimerów z UspDBD na *hsp27_{pal}*, ale również może oddziaływać na tym elemencie z domeną wiążącą DNA receptora HR38 (DHR38DBD) z *D. melanogaster* (wyników nie pokazano). Biologiczne znaczenie tej obserwacji pozostaje niejasne, gdyż doniesiono, że pełnej długości EcR i DHR38 nie są zdolne do wiązania sekwencji *hsp27_{pal}* (3.4.3.). Biorąc pod uwagę fakt, że izolowane domeny obu receptorów mogą wydajnie oddziaływać ze sobą na *hsp27_{pal}*, nie jest wykluczone, że w odpowiednich warunkach fizjologicznych, tworzenie kompleksu EcR-DHR38 na tym elemencie jest możliwe. Kolejną unikalną cechą białek IUP jest to, że posiadają one rozległą płaszczyznę oddziaływań, która umożliwia tworzenie specyficznych kontaktów z docelowymi partnerami (Tomba, 2002; Dunker i wsp., 2002). Obecność dużej płaszczyzny oddziaływania z DNA białka EcRDBD zasugerowano po raz pierwszy wykonując eksperymenty mutacyjne (Grad, 2001). Uzyskana ostatnio struktura krystaliczna UspDBD/EcRDBD/IR1 w pełni potwierdziła tę hipotezę i pokazała, że EcRDBD rozpoznaje sekwencje również poza półmiejscem 5'-AGGTCA-3' w kierunku 3'-końca oraz duży fragment sekwencji 5'-końcowego półmiejscza wiążanego przez UspDBD. Wydłużona powierzchnia kontaktów obejmuje blisko 13 par zasad (Devarakonda i wsp., 2003). Wydaje się, że związanie HRE indukuje znaczące zmiany konformacyjne w strukturze receptora w sposób HRE-specyficzny (3.3.3.1.) (Thompson i Kumar, 2003; Lefstin i Yamamoto, 1998). Z uwagi na to, że modulacja transkrypcji genów zależy od szeregu oddziaływań z pomocniczymi białkami, które mogą również indukować zmiany strukturalne, specyficzna

naturalna sekwencja regulatorowa może być kluczowym czynnikiem regulacyjnym (3.2.4.). Heterodimer UspDBD/EcRDBD w kompleksie z właściwymi EcRE wydaje się być odpowiednim kandydatem dla zależnej od DNA selekcji modulatorów transkrypcji. Integralnym składnikiem heterodimeru jest EcRDBD, który zgodnie z właściwościami charakterystycznymi dla białek IUP, może z łatwością akceptować zmiany w strukturze drugo- i trzeciorzędowej indukowane przez DNA. Porównanie zawartości struktur drugorzędowych białka EcRDBD w formie wolnej od DNA (Tabela 7.1. (7.1.1.4.) i Tabela 7.3. (7.2.1.4.)) oraz w uzyskanych kompleksach z RXRDBD i UspDBD na syntetycznym IR1 (Devarakonda i wsp., 2003) pokazuje, że rzeczywiście zachodzi zmiana ich zawartości pod wpływem oddziaływania z DNA. Przykładowo, zawartość struktur α -helikalnych wzrasta z 20,5 % (EcRDBD niezwiązany z DNA; patrz np. Tabela 7.1.) do 24,5 % lub 28,6 % w EcRDBD (dane z bazy PDB) tworzącym odpowiednio kompleks z UspDBD lub RXRDBD na IR1. Godne uwagi jest, że analizując dane opublikowane (Devarakonda i wsp., 2003) uzyskuje się znacząco wyższe wartości: 29,4 % i 34,5 %, odpowiednio. Co ciekawe, tylko niewielkie zmiany w zawartości struktur α -helikalnych zaobserwowano w przypadku UspDBD (nie pokazano). Badania mutacyjne dostarczyły dowodów, że tylko 8 par zasad spośród 15 par zasad konieczne jest w *hsp27_{pal}* dla efektywnego wiązania heterodimeru złożonego z białek Usp i EcR pełnej długości (Ożyhar i Pongs, 1993). Inne pozycje nie są obligatoryjne dla heterodimeryzacji, i jak ostatnio zasugerowano, pozycje te mogą być wykorzystywane przez heterodimer UspDBD/EcRDBD do modulowania struktur DBD i w konsekwencji do odpowiedzi biologicznej (Ożyhar i Pongs, 1993; Grad i wsp., 2002).

Ponieważ nawet subtelne zmiany w strukturze DBD mogą mieć daleko idące funkcjonalne konsekwencje, możliwe jest, że wiązanie DNA przez pełnej długości EcR może wpłynąć na strukturę innych domen EcR w wyniku zmian allosterycznych. Jak się wydaje, doskonałym kandydatem takiego wewnątrzcząsteczkowego porozumiewania się może być domena ligandowa EcR (EcRLBD). Nawiązując do badań mutacyjnych (Grebe i wsp., 2003) i analiz struktur krystalicznych EcRLBD (3.4.3.), pokazano, że EcRLBD wykazuje bardzo dużą plastyczność, która pozwala jej na dostosowanie kształtu kieszeni wiążącej ligand do struktury dwóch odmiennych związków, hormonu steroidowego i niesteroidowego agonisty (Billas i wsp., 2003). Tym samym, plastyczność wydaje się być cechą całego białka EcR. Jednym z powodów, dla którego EcR, jedyny znany receptor jądrowy zależny od liganda u owadów, osiągnął w ewolucji taką niespotykaną wśród innych receptorów jądrowych cechę, może być jego kluczowa pozycja w pośredniczeniu

przekazywania sygnału pochodzącego od 20E. Hemolimfa owada zawiera dużo endogennych ekdysteroidów, lecz tylko niektóre z nich są obecne w określonych stadiach rozwojowych owada (3.4.1.) (Gilbert i wsp., 2002). Co więcej, zmiany szlaków transkrypcji są kontrolowane przez ekdysteroidy inne niż 20E. Koordynacja zmian w ekspresji genów zależnych od ekdysteroidów ma miejsce w kilku stadiach cyklu życia *D. melanogaster* w czasie, kiedy stężenie 20E jest niskie (Andres i wsp., 1993). Pojedyncza cząsteczka EcR może tym samym pośredniczyć w różnych szlakach przekazywania sygnałów pochodzących od ekdysteroidów. Więcej, EcR może adoptować różne, zależne od liganda i DNA, konformacje, stając się w obecności innych koregulatorów i/lub czynników transkrypcji uniwersalnym receptorem modulującym ekspresję genów w tkankowo- i ligandowo- zależny sposób.

9

PODSUMOWANIE

- 1) Zdefiniowano udział poszczególnych reszt aminokwasowych kasety T białka EcRDBD w formowaniu homodimerów EcRDBD i heterodimerów z UspDBD na naturalnym elemencie regulatorowym *hsp27_{pal}*.
- 2) Wydaje się, że reszty C70, V71, V72 i P73 tworzące hydrofobowy rdzeń kasety T EcRDBD z *D. melanogaster* pełnią ważną rolę strukturalną w utrzymywaniu właściwej konformacji regionu CTE EcRDBD na *hsp27_{pal}*. Kluczową okazała się być reszta P73.
- 3) Pokazano, że EcRDBD wykazuje plastyczność w obecności partnera UspDBD na elemencie regulatorowym.
- 4) Określono minimalne fragmenty kaset A z *D. melanogaster* i *B. mori* wystarczające dla tworzenia homo- i heterodimerów z UspDBD na *hsp27_{pal}*.
- 5) Pokazano, że kaseta A EcRDBD z *B. mori* jest niezbędna dla tego białka w specyficznym wiązaniu *hsp27_{pal}* i tworzeniu na nim kompleksów homo- i heterodimerycznych.
- 6) Uzyskane wyniki sugerują, że CTE EcRDBD, w przeciwieństwie do CTE DBD receptorów kręgowców, jest odpowiedzialna przede wszystkim za stabilizację domeny oraz prawdopodobnie za specyficzne oddziaływanie z *hsp27_{pal}*.
- 7) Zdefiniowano rolę strukturalno-funkcjonalną poszczególnych reszt aminokwasowych α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD w tworzeniu specyficznych kompleksów na *hsp27_{pal}*.
- 8) Pokazano, w oparciu o wyniki eksperymentów denaturacji chemicznej, że EcRDBD, w przeciwieństwie do UspDBD, jest białkiem niestabilnym. Wydaje się, że niestabilność jest inherentną cechą rdzenia domeny.

- 9) Po cyklu denaturacja/renaturacja EcRDBD jest w stanie odzyskać swoją aktywną strukturę, co przejawia się zdolnością do tworzenia kompleksów homo- i heterodimerycznych w obecności *hsp27_{pat}*. Wyniki te podkreślają plastyczność EcRDBD.
- 10) Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są całkowicie oryginalne. Określiły one rolę CTE EcRDBD w specyficznej interakcji z naturalnym elementem regulatorowym *hsp27_{pat}* na poziomie molekularnym. Po raz pierwszy pokazano, że plastyczność nie jest tylko właściwością domeny wiążącej ligand EcR, ale również cechą DBD. EcR może tym samym pośredniczyć w różnych szlakach przekazywania sygnałów pochodzących od ekdysteroidów. Ponadto może on przyjmować różne, zależne od liganda i DNA, konformacje, stając się w obecności innych koregulatorów lub czynników transkrypcji uniwersalnym receptorem modulującym ekspresję genów w tkankowo- i zależny od liganda sposób. Wiedza ta może być wykorzystana w projektowaniu minimalnych czynników transkrypcji, co znaleźć może zastosowanie w medycynie (terapię genowe, zwalczanie chorobotwórczych nicieni) i agrochemii pestycydów do kontroli populacji owadów.

LITERATURA

10

1. Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F.

- N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. i Venter, J. C. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* **287**(5461): 2185-95.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. i Watson, J. D. (1994). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Pub.
3. Almlöf, T., Wallberg, A. E., Gustafsson, J. A. i Wright, A. P. (1998). "Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors." *Biochemistry* **37**(26): 9586-94.
4. Almlöf, T., Wright, A. P. i Gustafsson, J. A. (1995). "Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **270**(29): 17535-40.
5. Amero, S. A., Kretsinger, R. H., Moncrief, N. D., Yamamoto, K. R. i Pearson, W. R. (1992). "The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors." *Mol Endocrinol* **6**(1): 3-7.
6. Andres, A. J., Fletcher, J. C., Karim, F. D. i Thummel, C. S. (1993). "Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription." *Dev Biol* **160**(2): 388-404.
7. Andres, A. J. i Thummel, C. S. (1992). "Hormones, puffs and flies: the molecular control of metamorphosis by ecdysone." *Trends Genet* **8**(4): 132-8.
8. Antoniewski, C., Laval, M. i Lepesant, J. A. (1993). "Structural features critical to the activity of an ecdysone receptor binding site." *Insect Biochem Mol Biol* **23**(1): 105-14.
9. Antoniewski, C., Mugat, B., Delbac, F. i Lepesant, J. A. (1996). "Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*." *Mol Cell Biol* **16**(6): 2977-86.
10. Antoniewski, C., O'Grady, M. S., Edmondson, R. G., Lassieur, S. M. i Benes, H. (1995). "Characterization of an EcR/USP heterodimer target site that mediates ecdysone responsiveness of the *Drosophila* Lsp-2 gene." *Mol Gen Genet* **249**(5): 545-56.
11. Arbeitman, M. N. i Hogness, D. S. (2000). "Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer." *Cell* **101**(1): 67-77.
12. Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E. i Evans, R. M. (1987). "Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor." *Science* **237**(4812): 268-75.
13. Arzt, E., Kovalovsky, D., Igaz, L. M., Costas, M., Plazas, P., Refojo, D., Paez-Pereda, M., Reul, J. M., Stalla, G. i Holsboer, F. (2000). "Functional cross-talk among cytokines, T-cell receptor, and glucocorticoid receptor transcriptional activity and action." *Ann N Y Acad Sci* **917**: 672-7.
14. Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. i Richards, G. (1974). "Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**: 655-62.
15. Baehrecke, E. H. (1996). "Ecdysone signaling cascade and regulation of *Drosophila* metamorphosis." *Arch Insect Biochem Physiol* **33**(3-4): 231-44.
16. Baehrecke, E. H. i Thummel, C. S. (1995). "The *Drosophila* E93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone." *Dev Biol* **171**(1): 85-97.
17. Bain, D. L., Franden, M. A., McManaman, J. L., Takimoto, G. S. i Horwitz, K. B. (2000). "The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural

- analysis and the influence of the DNA binding domain." *J Biol Chem* **275**(10): 7313-20.
18. Bain, D. L., Franden, M. A., McManaman, J. L., Takimoto, G. S. i Horwitz, K. B. (2001). "The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors." *J Biol Chem* **276**(26): 23825-31.
 19. Baker, A. R., McDonnell, D. P., Hughes, M., Crisp, T. M., Mangelsdorf, D. J., Haussler, M. R., Pike, J. W., Shine, J. i O'Malley, B. W. (1988). "Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(10): 3294-8.
 20. Barik, S. (1995). "Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction." *Mol Biotechnol* **3**(1): 1-7.
 21. Barker, G. C., Mercer, J. G., Delves, C. J., O'Hanlon, G. M., Howells, R. E. i Rees, H. H. (1990). "Occurrence and possible significance of developmental hormones in nematodes." *Prog Clin Biol Res* **342**: 710-5.
 22. Barker, G. C., Mercer, J. G., Rees, H. H. i Howells, R. E. (1991). "The effect of ecdysteroids on the microfilarial production of *Brugia pahangi* and the control of meiotic reinitiation in the oocytes of *Dirofilaria immitis*." *Parasitol Res* **77**(1): 65-71.
 23. Baumann, C. T., Lim, C. S. i Hager, G. L. (1999). "Intracellular localization and trafficking of steroid receptors." *Cell Biochem Biophys* **31**(2): 119-27.
 24. Baumann, H., Paulsen, K., Kovacs, H., Berglund, H., Wright, A. P., Gustafsson, J. A. i Hard, T. (1993). "Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain." *Biochemistry* **32**(49): 13463-71.
 25. Bayliss, W. M. i Starling, E. H. (1902). "The mechanism of pancreatic secretion." *J. Physiol* **28**: 325-353.
 26. Beato, M., Herrlich, P. i Schutz, G. (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." *Cell* **83**(6): 851-7.
 27. Bender, M., Imam, F. B., Talbot, W. S., Ganetzky, B. i Hogness, D. S. (1997). "*Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms." *Cell* **91**(6): 777-88.
 28. Bendik, I. i Pfahl, M. (1995). "Similar ligand-induced conformational changes of thyroid hormone receptors regulate homo- and heterodimeric functions." *J Biol Chem* **270**(7): 3107-14.
 29. Berg, J. M. (1990). "Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules." *J Biol Chem* **265**(12): 6513-6.
 30. Berg, J. M. i Shi, Y. (1996). "The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc." *Science* **271**(5252): 1081-5.
 31. Bergot, B. J., Baker, F. C., Cerf, D. C., Jamieson, G. i Schooley, D. A. (1981). Qualitative and quantitative aspects of juvenile hormone titers in developing embryos of several insect species: discovery of a new JH-like substance extracted from eggs of *Manduca sexta*. Elsevier/North-Holland. G. E. B. Pratt, G. T., red., Juvenile Hormone Biochemistry: 33-45.
 32. Billas, I. M., Iwema, T., Garnier, J. M., Mitschler, A., Rochel, N. i Moras, D. (2003). "Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor." *Nature* **426**(6962): 91-6.
 33. Billas, I. M., Moulinier, L., Rochel, N. i Moras, D. (2001). "Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects." *J Biol Chem* **276**(10): 7465-74.

34. Birnbaumer, M., Schrader, W. T. i O'Malley, B. W. (1983). "Assessment of structural similarities in chick oviduct progesterone receptor subunits by partial proteolysis of photoaffinity-labeled proteins." *J Biol Chem* **258**(12): 7331-7.
35. Bocquel, M. T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P. i Gronemeyer, H. (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): 2581-95.
36. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. i Moras, D. (1995). "Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α ." *Nature* **375**(6530): 377-82.
37. Broadus, J., McCabe, J. R., Endrizzi, B., Thummel, C. S. i Woodard, C. T. (1999). "The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone." *Mol Cell* **3**(2): 143-9.
38. Brodu, V., Mugat, B., Roignant, J. Y., Lepesant, J. A. i Antoniewski, C. (1999). "Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5732-42.
39. Brown, R. S., Sander, C. i Argos, P. (1985). "The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats." *FEBS Lett* **186**(2): 271-4.
40. Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. i Carlquist, M. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Nature* **389**(6652): 753-8.
41. Burcin, M., Kohne, A. C., Runge, D., Steiner, C. i Renkawitz, R. (1994). "Factors influencing nuclear receptors in transcriptional repression." *Semin Cancer Biol* **5**(5): 337-46.
42. Buszczak, M. i Segraves, W. A. (2000). "Insect metamorphosis: out with the old, in with the new." *Curr Biol* **10**(22): R830-3.
43. *C. elegans* Sequencing Consortium, (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium." *Science* **282**(5396): 2012-8.
44. Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." *Faseb J* **10**(9): 940-54.
45. Chang, C. S., Kokontis, J. i Liao, S. T. (1988). "Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors." *Science* **240**(4850): 324-6.
46. Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D. i Evans, R. M. (1999). "Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase." *Cell* **98**(5): 675-86.
47. Chen, S., Wang, J., Yu, G., Liu, W. i Pearce, D. (1997). "Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity." *J Biol Chem* **272**(22): 14087-92.
48. Chen, Z. P., Iyer, J., Bourguet, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Noy, N., Chambon, P. i Gronemeyer, H. (1998). "Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers." *J Mol Biol* **275**(1): 55-65.
49. Cheng, K. W., Cheng, C. K. i Leung, P. C. (2001). "Differential role of PR-A and -B isoforms in transcription regulation of human GnRH receptor gene." *Mol Endocrinol* **15**(12): 2078-92.
50. Cherbas, L., Lee, K. i Cherbas, P. (1991). "Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene." *Genes Dev* **5**(1): 120-31.
51. Claessens, F., Alen, P., Devos, A., Peeters, B., Verhoeven, G. i Rombauts, W. (1996). "The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors." *J Biol Chem* **271**(32): 19013-6.

52. Clayton, G. M., Peak-Chew, S. Y., Evans, R. M. i Schwabe, J. W. (2001). "The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1549-54.
53. Colledge, W. H., Richardson, W. D., Edge, M. D. i Smith, A. E. (1986). "Extensive mutagenesis of the nuclear location signal of simian virus 40 large-T antigen." *Mol Cell Biol* **6**(11): 4136-9.
54. Conneely, O. M., Sullivan, W. P., Toft, D. O., Birnbaumer, M., Cook, R. G., Maxwell, B. L., Zarucki-Schulz, T., Greene, G. L., Schrader, W. T. i O'Malley, B. W. (1986). "Molecular cloning of the chicken progesterone receptor." *Science* **233**(4765): 767-70.
55. Crispi, S., Giordano, E., D'Avino, P. P. i Furia, M. (1998). "Cross-talking among *Drosophila* nuclear receptors at the promiscuous response element of the ng-1 and ng-2 intermolt genes." *J Mol Biol* **275**(4): 561-74.
56. Crossgrove, K., Bayer, C. A., Fristrom, J. W. i Guild, G. M. (1996). "The *Drosophila* Broad-Complex early gene directly regulates late gene transcription during the ecdysone-induced puffing cascade." *Dev Biol* **180**(2): 745-58.
57. Cymborowski, B. a. (1984). Endokrynologia owadów. Warszawa, Państwowe Wydawn. Nauk.
58. Dahlman-Wright, K., Baumann, H., McEwan, I. J., Almlöf, T., Wright, A. P., Gustafsson, J. A. i Hard, T. (1995). "Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1699-703.
59. Danielsen, M., Hinck, L. i Ringold, G. M. (1989). "Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor." *Cell* **57**(7): 1131-8.
60. D'Avino, P. P., Crispi, S., Cherbas, L., Cherbas, P. i Furia, M. (1995). "The moulting hormone ecdysone is able to recognize target elements composed of direct repeats." *Mol Cell Endocrinol* **113**(1): 1-9.
61. de Urquiza, A. M., Liu, S., Sjöberg, M., Zetterstrom, R. H., Griffiths, W., Sjövall, J. i Perlmann, T. (2000). "Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain." *Science* **290**(5499): 2140-4.
62. Defranco, D. B., Madan, A. P., Tang, Y., Chandran, U. R., Xiao, N. i Yang, J. (1995). "Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors." *Vitam Horm* **51**: 315-38.
63. Dela Cruz, F. i Mak, P. (1997). "*Drosophila* ecdysone receptor functions as a constitutive activator in yeast." *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**(4): 353-9.
64. Denner, L. A., Schrader, W. T., O'Malley, B. W. i Weigel, N. L. (1990). "Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites." *J Biol Chem* **265**(27): 16548-55.
65. Dennis, R. D. (1976). "Insect morphogenetic hormones and developmental mechanisms in the nematode, *Nematospiroides dubius*." *Comp Biochem Physiol A* **53**(1): 53-6.
66. Detera-Wadleigh, S. D. i Fanning, T. G. (1994). "Phylogeny of the steroid receptor superfamily." *Mol Phylogenet Evol* **3**(3): 192-205.
67. Devarakonda, S., Harp, J. M., Kim, Y., Ozyhar, A. i Rastinejad, F. (2003). "Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex." *Embo J* **22**(21): 5827-40.
68. Dilworth, F. J. i Chambon, P. (2001). "Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription." *Oncogene* **20**(24): 3047-54.

69. Dinan, L., Whiting, P., Girault, J. P., Lafont, R., Dhadialla, T. S., Cress, D. E., Mugat, B., Antoniewski, C. i Lepesant, J. A. (1997). "Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor." *Biochem J* **327** (Pt 3): 643-50.
70. Ding, X. F., Anderson, C. M., Ma, H., Hong, H., Uht, R. M., Kushner, P. J. i Stallcup, M. R. (1998). "Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities." *Mol Endocrinol* **12**(2): 302-13.
71. Dobens, L., Rudolph, K. i Berger, E. M. (1991). "Ecdysterone regulatory elements function as both transcriptional activators and repressors." *Mol Cell Biol* **11**(4): 1846-53.
72. Doppler, W., Geymayer, S. i Weirich, H. G. (2000). "Synergistic and antagonistic interactions of transcription factors in the regulation of milk protein gene expression. Mechanisms of cross-talk between signalling pathways." *Adv Exp Med Biol* **480**: 139-46.
73. Dressel, U., Thormeyer, D., Altincicek, B., Paululat, A., Eggert, M., Schneider, S., Tenbaum, S. P., Renkawitz, R. i Bani Ahmad, A. (1999). "Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3383-94.
74. Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M. i Obradovic, Z. (2002). "Intrinsic disorder and protein function." *Biochemistry* **41**(21): 6573-82.
75. Egea, P. F., Klaholz, B. P. i Moras, D. (2000). "Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones." *FEBS Lett* **476**(1-2): 62-7.
76. Enmark, E. i Gustafsson, J. A. (1996). "Orphan nuclear receptors--the first eight years." *Mol Endocrinol* **10**(11): 1293-307.
77. Enmark, E. i Gustafsson, J. A. (2001). "Comparing nuclear receptors in worms, flies and humans." *Trends Pharmacol Sci* **22**(12): 611-5.
78. Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. i Laudet, V. (1997). "Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6803-8.
79. Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." *Science* **240**(4854): 889-95.
80. Fairbanks, G., Steck, T. L. i Wallach, D. F. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." *Biochemistry* **10**(13): 2606-17.
81. Favre-Young, H., Dif, F., Roussille, F., Demeneix, B. A., Kelly, P. A., Edery, M. i de Luze, A. (2000). "Cross-talk between signal transducer and activator of transcription (Stat5) and thyroid hormone receptor-beta 1 (TRbeta1) signaling pathways." *Mol Endocrinol* **14**(9): 1411-24.
82. Fiebeler, A., Schmidt, F., Muller, D. N., Park, J. K., Dechend, R., Bieringer, M., Shagdarsuren, E., Breu, V., Haller, H. i Luft, F. C. (2001). "Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury." *Hypertension* **37**(2 Part 2): 787-93.
83. Fleming, M. W. (1985). "Steroidal enhancement of growth in parasitic larvae of *Ascaris suum*: validation of a bioassay." *J Exp Zool* **233**(2): 229-33.
84. Fondell, J. D., Ge, H. i Roeder, R. G. (1996). "Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8329-33.

85. Ford, J., McEwan, I. J., Wright, A. P. i Gustafsson, J. A. (1997). "Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor *in vitro*." *Mol Endocrinol* **11**(10): 1467-75.
86. Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J. i Evans, R. M. (1995). "Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors." *Cell* **81**(4): 541-50.
87. Freedman, L. P. (1992). "Anatomy of the steroid receptor zinc finger region." *Endocr Rev* **13**(2): 129-45.
88. Freedman, L. P., Arce, V. i Perez Fernandez, R. (1994). "DNA sequences that act as high affinity targets for the vitamin D3 receptor in the absence of the retinoid X receptor." *Mol Endocrinol* **8**(3): 265-73.
89. Freedman, L. P., Luisi, B. F., Korszun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B. i Yamamoto, K. R. (1988). "The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain." *Nature* **334**(6182): 543-6.
90. Fried, H. i Kutay, U. (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." *Cell Mol Life Sci* **60**(8): 1659-88.
91. Fried, M. i Crothers, D. M. (1981). "Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis." *Nucleic Acids Res* **9**(23): 6505-25.
92. Garcia-Vallve, S. i Palau, J. (1998). "Nuclear receptors, nuclear-receptor factors, and nuclear-receptor-like orphans form a large paralog cluster in *Homo sapiens*." *Mol Biol Evol* **15**(6): 665-82.
93. Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J. i Samarut, J. (1999). "Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development." *Embo J* **18**(3): 623-31.
94. Gehring, U. (1998). "Steroid hormone receptors and heat shock proteins." *Vitam Horm* **54**: 167-205.
95. Gewirth, D. T. i Sigler, P. B. (1995). "The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex." *Nat Struct Biol* **2**(5): 386-94.
96. Ghbeish, N., Tsai, C. C., Schubiger, M., Zhou, J. Y., Evans, R. M. i McKeown, M. (2001). "The dual role of ultraspiracle, the *Drosophila* retinoid X receptor, in the ecdysone response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3867-72.
97. Ghelis, C. i Yon, J. (1982). Protein folding. *New York*, Academic Press.
98. Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. i Evans, R. M. (1987). "Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid." *Nature* **330**(6149): 624-9.
99. Gilbert, L. I., Rybczynski, R. i Warren, J. T. (2002). "Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway." *Annu Rev Entomol* **47**: 883-916.
100. Gill, S. C. i von Hippel, P. H. (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Anal Biochem* **182**(2): 319-26.
101. Glass, C. K. (1994). "Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers." *Endocr Rev* **15**(3): 391-407.
102. Glass, C. K., Rose, D. W. i Rosenfeld, M. G. (1997). "Nuclear receptor coactivators." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 222-32.
103. Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. i Prehn, S. (1995). "Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear

- localization signals and bind them to the nuclear envelope." *Curr Biol* **5**(4): 383-92.
104. Gottlicher, M., Heck, S. i Herrlich, P. (1998). "Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action." *J Mol Med* **76**(7): 480-9.
105. Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. i Steller, H. (2000). "Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function." *Embo J* **19**(4): 589-97.
106. Grad, I. (1997). Mutageneza ukierunkowana aminokwasów P-box'u oraz aminokwasów z nim sąsiadujących domeny wiążącej DNA białka Ultraspiracle. *Praca magisterska*, Zakład Biochemii Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.
107. Grad, I. (2001). Analiza mutacyjna kompleksu domen wiążących DNA funkcjonalnego receptora ekdysteroidowego z elementem regulatorowym. *Praca doktorska*, Zakład Biochemii Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.
108. Grad, I., Kochman, M. i Ożyhar, A. (2002). "Functionality versus strength -- has functional selection taken place in the case of the ecdysteroid receptor response element?" *Acta Biochim Pol* **49**(3): 747-56.
109. Grad, I., Niedziela-Majka, A., Kochman, M. i Ożyhar, A. (2001). "Analysis of Usp DNA binding domain targeting reveals critical determinants of the ecdysone receptor complex interaction with the response element." *Eur J Biochem* **268**(13): 3751-8.
110. Grebe, M., Przibilla, S., Henrich, V. C. i Spindler-Barth, M. (2003). "Characterization of the ligand-binding domain of the ecdysteroid receptor from *Drosophila melanogaster*." *Biol Chem* **384**(1): 105-16.
111. Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W. i Chambon, P. (1988). "The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity." *Embo J* **7**(10): 3037-44.
112. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. i Chambon, P. (1986). "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A." *Nature* **320**(6058): 134-9.
113. Gronemeyer, H. i Laudet, V. (1995). "Transcription factors 3: nuclear receptors." *Protein Profile* **2**(11): 1173-308.
114. Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P. i Milgrom, E. (1996). "The Ernst Schering Poster Award. Intracellular traffic of steroid hormone receptors." *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**(1-6 Spec No): 3-9.
115. Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M. i Milgrom, E. (1989). "Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers." *Cell* **57**(7): 1147-54.
116. Hall, B. L. (1999). "Nuclear Receptors and the Hormonal Regulation of *Drosophila* Metamorphosis." *Amer. Zool* **39**: 714-721.
117. Hall, B. L. i Thummel, C. S. (1998). "The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor." *Development* **125**(23): 4709-17.
118. Hanahan, D. (1992). Techniques for transformation in *E. coli*. *DNA Cloning: A Practical Approach*. D. M. Glover, IRL Press, Oxford, England.
119. Harbers, M., Wahlstrom, G. M. i Vennstrom, B. (1996). "Transactivation by the thyroid hormone receptor is dependent on the spacer sequence in hormone response elements containing directly repeated half-sites." *Nucleic Acids Res* **24**(12): 2252-9.

120. Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J. A. i Kaptein, R. (1990). "Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain." *Science* **249**(4965): 157-60.
121. Harnish, D. C., Scicchitano, M. S., Adelman, S. J., Lyttle, C. R. i Karathanasis, S. K. (2000). "The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells." *Endocrinology* **141**(9): 3403-11.
122. Haussler, M. R., Haussler, C. A., Jurutka, P. W., Thompson, P. D., Hsieh, J. C., Remus, L. S., Selznick, S. H. i Whitfield, G. K. (1997). "The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states." *J Endocrinol* **154** Suppl: S57-73.
123. Hay, B. A., Wassarman, D. A. i Rubin, G. M. (1995). "*Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death." *Cell* **83**(7): 1253-62.
124. Hebbar, P. B. i Archer, T. K. (2003). "Chromatin remodeling by nuclear receptors." *Chromosoma* **111**(8): 495-504.
125. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. i Parker, M. G. (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." *Nature* **387**(6634): 733-6.
126. Henrich, V. C., Szekely, A. A., Kim, S. J., Brown, N. E., Antoniewski, C., Hayden, M. A., Lepesant, J. A. i Gilbert, L. I. (1994). "Expression and function of the ultraspiracle (*usp*) gene during development of *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **165**(1): 38-52.
127. Henriksson, A., Almlof, T., Ford, J., McEwan, I. J., Gustafsson, J. A. i Wright, A. P. (1997). "Role of the Ada adaptor complex in gene activation by the glucocorticoid receptor." *Mol Cell Biol* **17**(6): 3065-73.
128. Herrlich, P. (2001). "Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1." *Oncogene* **20**(19): 2465-75.
129. Hittelman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P. i Garabedian, M. J. (1999). "Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins." *Embo J* **18**(19): 5380-8.
130. Hollenberg, S. M. i Evans, R. M. (1988). "Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor." *Cell* **55**(5): 899-906.
131. Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. i Evans, R. M. (1985). "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA." *Nature* **318**(6047): 635-41.
132. Holmbeck, S. M., Foster, M. P., Casimiro, D. R., Sem, D. S., Dyson, H. J. i Wright, P. E. (1998). "High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain." *J Mol Biol* **281**(2): 271-84.
133. Holter, E., Kotaja, N., Makela, S., Strauss, L., Kietz, S., Janne, O. A., Gustafsson, J. A., Palvimo, J. J. i Treuter, E. (2002). "Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1." *Mol Endocrinol* **16**(3): 515-28.
134. Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. i et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." *Nature* **377**(6548): 397-404.

135. Horner, M. A., Chen, T. i Thummel, C. S. (1995). "Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members." *Dev Biol* **168**(2): 490-502.
136. Hsieh, J. C., Shimizu, Y., Minoshima, S., Shimizu, N., Haussler, C. A., Jurutka, P. W. i Haussler, M. R. (1998). "Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin D receptor." *J Cell Biochem* **70**(1): 94-109.
137. Hsieh, J. C., Whitfield, G. K., Jurutka, P. W., Haussler, C. A., Thatcher, M. L., Thompson, P. D., Dang, H. T., Galligan, M. A., Oza, A. K. i Haussler, M. R. (2003). "Two basic amino acids C-terminal of the proximal box specify functional binding of the vitamin D receptor to its rat osteocalcin deoxyribonucleic acid-responsive element." *Endocrinology* **144**(11): 5065-80.
138. Hu, X. i Lazar, M. A. (1999). "The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors." *Nature* **402**(6757): 93-6.
139. Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. i Desvergne, B. (1997). "Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element." *J Biol Chem* **272**(32): 20108-17.
140. Ikeda, M., Rhee, M. i Chin, W. W. (1994). "Thyroid hormone receptor monomer, homodimer, and heterodimer (with retinoid-X receptor) contact different nucleotide sequences in thyroid hormone response elements." *Endocrinology* **135**(4): 1628-38.
141. Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J. i Roeder, R. G. (1999). "Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators." *Mol Cell* **3**(3): 361-70.
142. Jiang, C., Baehrecke, E. H. i Thummel, C. S. (1997). "Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis." *Development* **124**(22): 4673-83.
143. Jiang, C., Lamblin, A. F., Steller, H. i Thummel, C. S. (2000). "A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis." *Mol Cell* **5**(3): 445-55.
144. Jiang, G. i Sladek, F. M. (1997). "The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha." *J Biol Chem* **272**(2): 1218-25.
145. Johnson, W. C., Jr. (1990). "Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide." *Proteins* **7**(3): 205-14.
146. Jones, G. i Jones, D. (2000). "Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homolog of vertebrate RXR." *Insect Biochem Mol Biol* **30**(8-9): 671-9.
147. Jones, G. i Sharp, P. A. (1997). "Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13499-503.
148. Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. i Smith, A. E. (1984). "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen." *Nature* **311**(5981): 33-8.
149. Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. i Rosenfeld, M. G. (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." *Cell* **85**(3): 403-14.

150. Karim, F. D., Guild, G. M. i Thummel, C. S. (1993). "The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis." *Development* **118**(3): 977-88.
151. Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J. M. i Chambon, P. (1997). "Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development." *Development* **124**(2): 313-26.
152. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K. I., Endoh, H. i Yanagisawa, J. (2000). "Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways." *Genes Cells* **5**(8): 593-601.
153. Kato, S., Sasaki, H., Suzawa, M., Masushige, S., Tora, L., Chambon, P. i Gronemeyer, H. (1995). "Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors." *Mol Cell Biol* **15**(11): 5858-67.
154. Kato, S., Tora, L., Yamauchi, J., Masushige, S., Bellard, M. i Chambon, P. (1992). "A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically." *Cell* **68**(4): 731-42.
155. Katz, R. W. i Koenig, R. J. (1993). "Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity." *J Biol Chem* **268**(26): 19392-7.
156. Keightley, M. C. (1998). "Steroid receptor isoforms: exception or rule?" *Mol Cell Endocrinol* **137**(1): 1-5.
157. Kersten, S., Dong, D., Lee, W., Reczek, P. R. i Noy, N. (1998). "Auto-silencing by the retinoid X receptor." *J Mol Biol* **284**(1): 21-32.
158. Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H. i Noy, N. (1995). "Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8645-9.
159. Khorasanizadeh, S. i Rastinejad, F. (2001). "Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements." *Trends Biochem Sci* **26**(6): 384-90.
160. Khoury Christianson, A. M. i Kafatos, F. C. (1993). "Binding affinity of the *Drosophila melanogaster* CF1/USP protein to the chorion *s15* promoter." *Biochem Biophys Res Commun* **193**(3): 1318-23.
161. Khoury Christianson, A. M., King, D. L., Hatzivassiliou, E., Casas, J. E., Hallenbeck, P. L., Nikodem, V. M., Mitsialis, S. A. i Kafatos, F. C. (1992). "DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11503-7.
162. Kingston, R. E. i Narlikar, G. J. (1999). "ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity." *Genes Dev* **13**(18): 2339-52.
163. Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. i Evans, R. M. (1992). "Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors." *Nature* **358**(6389): 771-4.
164. Klinge, C. M., Jernigan, S. C., Smith, S. L., Tyulmenkov, V. V. i Kulakosky, P. C. (2001). "Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha." *Mol Cell Endocrinol* **174**(1-2): 151-66.
165. Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segreaves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P. i Hogness, D. S. (1991). "The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily." *Cell* **67**(1): 59-77.
166. Koolman, J. (1990). "Ecdysteroids." *Zoological Science* **7**: 563-580.

167. Kostrouch, Z., Kostrouchova, M. i Rall, J. E. (1995). "Steroid/thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1): 156-9.
168. Kowalska, A., Rymarczyk, G., Grad, I., Orłowski, M., Krowarsch, D. i Ożyhar, A. (2003). Residues of the C-terminal region (T-box) of the Ultraspiracle nuclear receptor DNA-binding domain crucial to specific interaction with the *hsp27* response element. XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, sekcja: Przekazywanie sygnałów komórkowych, AMG, Gdańsk, Polska, *Acta Biochim Pol.*
169. Kozlova, T. i Thummel, C. S. (2000). "Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*." *Trends Endocrinol Metab* **11**(7): 276-80.
170. Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. M. i Chambon, P. (1986). "The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors." *Embo J* **5**(5): 891-7.
171. Krzyżaniak, A., Siatecka, M., Szyk, A., Mucha, P., Rekowski, P., Kupryszewski, G. i Barciszewski, J. (2000). "Specific induction of Z-DNA conformation by a nuclear localization signal peptide of lupin glutaminy tRNA synthetase." *Mol Biol Rep* **27**(1): 51-4.
172. Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. i Gustafsson, J. A. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-30.
173. Kumar, M. B., Fujimoto, T., Potter, D. W., Deng, Q. i Palli, S. R. (2002). "A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14710-5.
174. Kumar, R., Baskakov, I. V., Srinivasan, G., Bolen, D. W., Lee, J. C. i Thompson, E. B. (1999). "Interdomain signaling in a two-domain fragment of the human glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **274**(35): 24737-41.
175. Kumar, R., Betney, R., Li, J., Thompson, E. B. i McEwan, I. J. (2004). "Induced alpha-helix structure in AF1 of the androgen receptor upon binding transcription factor TFIIF." *Biochemistry* **43**(11): 3008-13.
176. Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. R. i Chambon, P. (1987). "Functional domains of the human estrogen receptor." *Cell* **51**(6): 941-51.
177. Kumaran, A., Ed. (1990). Modes of action of juvenile hormones at cellular and molecular levels. *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, Rutgers University Press, New Brunswick and London.
178. Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M. G., Heyman, R. A. i Glass, C. K. (1994). "Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding." *Nature* **371**(6497): 528-31.
179. Kurokawa, R., Yu, V. C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G. i Glass, C. K. (1993). "Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers." *Genes Dev* **7**(7B): 1423-35.
180. Kwiatkowska, D. i Kwiatkowska-Korczak, J. (2000). "Heterodimeric nuclear receptors. I. Vitamin and hormone receptors." *Postepy Biochem* **46**(2): 115-24.
181. Kwiatkowska-Korczak, J. i Kwiatkowska, D. (2000). "Heterodimeric nuclear receptors. II. Fatty acid and steroid metabolism regulation." *Postepy Biochem* **46**(2): 125-9.

182. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
183. Lafont, R. i Dinan, L. (2003). "Practical usues of ecdysteroids in mammals including humans: an update." *J Insect Science* **3**(7): 1-30.
184. Lalli, E. i Sassone-Corsi, P. (2003). "DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation." *Mol Endocrinol* **17**(8): 1445-53.
185. Lan, Q., Hiruma, K., Hu, X., Jindra, M. i Riddiford, L. M. (1999). "Activation of a delayed-early gene encoding MHR3 by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1-USP-1 but not by EcR-B1-USP-2." *Mol Cell Biol* **19**(7): 4897-906.
186. Laudet, V. i Gronemeyer, H. (2002). The nuclear receptor : factsbook. *San Diego*, Academic Press.
187. Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. i Stehelin, D. (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily." *Embo J* **11**(3): 1003-13.
188. Lavorgna, G., Karim, F. D., Thummel, C. S. i Wu, C. (1993). "Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7): 3004-8.
189. Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J. M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R. i Chambon, P. (1996). "A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors." *Embo J* **15**(23): 6701-15.
190. Lee, C. Y., Wendel, D. P., Reid, P., Lam, G., Thummel, C. S. i Baehrecke, E. H. (2000). "E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*." *Mol Cell* **6**(2): 433-43.
191. Lee, K. C. i Lee Kraus, W. (2001). "Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights." *Trends Endocrinol Metab* **12**(5): 191-7.
192. Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E. i Evans, R. M. (1993). "Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: α helix required for homodimeric DNA binding." *Science* **260**(5111): 1117-21.
193. Lefstin, J. A. i Yamamoto, K. R. (1998). "Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators." *Nature* **392**(6679): 885-8.
194. Lehmann, M. i Korge, G. (1995). "Ecdysone regulation of the *Drosophila* Sgs-4 gene is mediated by the synergistic action of ecdysone receptor and SEBP 3." *Embo J* **14**(4): 716-26.
195. Lehmann, M., Wattler, F. i Korge, G. (1997). "Two new regulatory elements controlling the *Drosophila* Sgs-3 gene are potential ecdysone receptor and fork head binding sites." *Mech Dev* **62**(1): 15-27.
196. Lezzi, M., T., B., J.F., M. i V.C., H. (1999). "The ecdysone receptor puzzle." *Arch. Ins. Bioch. Phys* **41**: 99-106.
197. Lisi, S., Mazzon, I. i White, K. (2000). "Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*." *Genetics* **154**(2): 669-78.
198. Liu, W., Wang, J., Sauter, N. K. i Pearce, D. (1995). "Steroid receptor heterodimerization demonstrated *in vitro* and *in vivo*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12480-4.
199. Lockhart, D. J. i Winzeler, E. A. (2000). "Genomics, gene expression and DNA arrays." *Nature* **405**(6788): 827-36.
200. Low, L. Y., Hernandez, H., Robinson, C. V., O'Brien, R., Grossmann, J. G., Ladbury, J. E. i Luisi, B. (2002). "Metal-dependent folding and stability of nuclear hormone receptor DNA-binding domains." *J Mol Biol* **319**(1): 87-106.

201. Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. i Sigler, P. B. (1991). "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA." *Nature* **352**(6335): 497-505.
202. Lundback, T., Cairns, C., Gustafsson, J. A., Carlstedt-Duke, J. i Hard, T. (1993). "Thermodynamics of the glucocorticoid receptor-DNA interaction: binding of wild-type GR DBD to different response elements." *Biochemistry* **32**(19): 5074-82.
203. Luo, J., Sucov, H. M., Bader, J. A., Evans, R. M. i Giguere, V. (1996). "Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) beta and RAR alpha 1 reveal developmental functions for multiple RAR beta isoforms." *Mech Dev* **55**(1): 33-44.
204. Mader, S., Chambon, P. i White, J. H. (1993). "Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain." *Nucleic Acids Res* **21**(5): 1125-32.
205. Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H. i Chambon, P. (1989). "Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element." *Nature* **338**(6212): 271-4.
206. Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A. i Evans, R. M. (1992). "Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid." *Genes Dev* **6**(3): 329-44.
207. Mangelsdorf, D. J. i Evans, R. M. (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." *Cell* **83**(6): 841-50.
208. Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A. i Evans, R. M. (1990). "Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway." *Nature* **345**(6272): 224-9.
209. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. i et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." *Cell* **83**(6): 835-9.
210. Mansen, A., Yu, F., Forrest, D., Larsson, L. i Vennstrom, B. (2001). "TRs have common and isoform-specific functions in regulation of the cardiac myosin heavy chain genes." *Mol Endocrinol* **15**(12): 2106-14.
211. Maroy, P., Dennis, R., Beckers, C., Sage, B. A. i O'Connor, J. D. (1978). "Demonstration of an ecdysteroid receptor in a cultured cell line of *Drosophila melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(12): 6035-8.
212. Martinez, E., Givel, F. i Wahli, W. (1991). "A common ancestor DNA motif for invertebrate and vertebrate hormone response elements." *Embo J* **10**(2): 263-8.
213. McKenna, N. J., Lanz, R. B. i O'Malley, B. W. (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." *Endocr Rev* **20**(3): 321-44.
214. Meinke, G. i Sigler, P. B. (1999). "DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B." *Nat Struct Biol* **6**(5): 471-7.
215. Melchior, F. i Gerace, L. (1995). "Mechanisms of nuclear protein import." *Curr Opin Cell Biol* **7**(3): 310-8.
216. Michigami, T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S. i Ozono, K. (1999). "Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus." *J Biol Chem* **274**(47): 33531-8.
217. Miller, J., McLachlan, A. D. i Klug, A. (1985). "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes." *Embo J* **4**(6): 1609-14.
218. Moras, D. i Gronemeyer, H. (1998). "The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function." *Curr Opin Cell Biol* **10**(3): 384-91.

219. Morrison, K. L. i Weiss, G. A. (2001). "Combinatorial alanine-scanning." *Curr Opin Chem Biol* **5**(3): 302-7.
220. Mosselman, S., Polman, J. i Dijkema, R. (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." *FEBS Lett* **392**(1): 49-53.
221. Mouillet, J. F., Henrich, V. C., Lezzi, M. i Vogtli, M. (2001). "Differential control of gene activity by isoforms A, B1 and B2 of the *Drosophila* ecdysone receptor." *Eur J Biochem* **268**(6): 1811-9.
222. Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H. i Chambon, P. (1992). "Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors." *Cell* **70**(6): 1007-19.
223. Nagy, L., Kao, H. Y., Love, J. D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J. T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R. M. i Schwabe, J. W. (1999). "Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors." *Genes Dev* **13**(24): 3209-16.
224. Nagy, L., Thomazy, V. A., Saydak, M. M., Stein, J. P. i Davies, P. J. (1997). "The promoter of the mouse tissue transglutaminase gene directs tissue-specific, retinoid-regulated and apoptosis-linked expression." *Cell Death Differ* **4**(7): 534-47.
225. Nelson, C. C., Faris, J. S., Hendy, S. C. i Romaniuk, P. J. (1993). "Functional analysis of the amino acids in the DNA recognition alpha-helix of the human thyroid hormone receptor." *Mol Endocrinol* **7**(9): 1185-95.
226. Nelson, C. C., Hendy, S. C., Faris, J. S. i Romaniuk, P. J. (1994). "The effects of P-box substitutions in thyroid hormone receptor on DNA binding specificity." *Mol Endocrinol* **8**(7): 829-40.
227. Nelson, C. C., Hendy, S. C., Shukin, R. J., Cheng, H., Bruchovsky, N., Koop, B. F. i Rennie, P. S. (1999). "Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements." *Mol Endocrinol* **13**(12): 2090-107.
228. Nichols, M., Rientjes, J. M. i Stewart, A. F. (1998). "Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists." *Embo J* **17**(3): 765-73.
229. Niedziela-Majka, A. (1999). Rekombinowane domeny wiążące DNA funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego - oczyszczanie i charakterystyka oddziaływania z sekwencjami regulatorowymi DNA. *Praca doktorska*, Zakład Biochemii Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.
230. Niedziela-Majka, A., Kochman, M. i Ożyhar, A. (2000). "Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the *hsp27* gene promoter." *Eur J Biochem* **267**(2): 507-19.
231. Niedziela-Majka, A., Rymarczyk, G., Kochman, M. i Ożyhar, A. (1998). "Pure, bacterially expressed DNA-binding domains of the functional ekdyteroid receptor capable of interacting synergistically with the *hsp27* 20-hydroxyekdytone response element. GST-Induced dimerization of DNA-binding domains alters characteristics of their interaction with DNA." *Protein Expr Purif* **14**(2): 208-20.
232. Novagen (1992). pET System Manual, Madison, USA.
233. Nowak, J. Z. i Zawilska, J. B. (2004). Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. *Warszawa*, Wydawnictwo Naukowe PWN.
234. Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). "A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily." *Cell* **97**(2): 161-3.

235. Ożyhar, A. i Pongs, O. (1993). "Mutational analysis of the interaction between ecdysteroid receptor and its response element." *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**(2): 135-45.
236. Ożyhar, A., Strangmann-Diekmann, M., Kiltz, H. H. i Pongs, O. (1991). "Characterization of a specific ecdysteroid receptor-DNA complex reveals common properties for invertebrate and vertebrate hormone-receptor/DNA interactions." *Eur J Biochem* **200**(2): 329-35.
237. Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. i Muramatsu, M. (1998). "The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha *in vivo* and *in vitro*." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1): 122-6.
238. Orłowski, M. (2000). Mutageneza ukierunkowana kasety T białka EcR. *Praca magisterska*, Zakład Biochemii Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.
239. Oro, A. E., McKeown, M. i Evans, R. M. (1990). "Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor." *Nature* **347**(6290): 298-301.
240. Pandey, A. i Mann, M. (2000). "Proteomics to study genes and genomes." *Nature* **405**(6788): 837-46.
241. Patel, P. D., Sherman, T. G., Goldman, D. J. i Watson, S. J. (1989). "Molecular cloning of a mineralocorticoid (type I) receptor complementary DNA from rat hippocampus." *Mol Endocrinol* **3**(11): 1877-85.
242. Pavletich, N. P. i Pabo, C. O. (1991). "Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å." *Science* **252**(5007): 809-17.
243. Pemrick, S. M., Lucas, D. A. i Grippo, J. F. (1994). "The retinoid receptors." *Leukemia* **8**(11): 1797-806.
244. Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K. i Rosenfeld, M. G. (1999). "Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction." *Genes Dev* **13**(24): 3198-208.
245. Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. i Evans, R. M. (1993). "Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs." *Genes Dev* **7**(7B): 1411-22.
246. Peters, G. A. i Khan, S. A. (1999). "Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140." *Mol Endocrinol* **13**(2): 286-96.
247. Picard, D. i Yamamoto, K. R. (1987). "Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor." *Embo J* **6**(11): 3333-40.
248. Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F. i Dreyfuss, G. (1996). "A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway." *Cell* **86**(6): 985-94.
249. Quack, M., Szafranski, K., Rouvinen, J. i Carlberg, C. (1998). "The role of the T-box for the function of the vitamin D receptor on different types of response elements." *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5372-8.
250. Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. i Freedman, L. P. (1999). "Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex." *Nature* **398**(6730): 824-8.
251. Rastinejad, F. (2001). "Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family." *Curr Opin Struct Biol* **11**(1): 33-8.

252. Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M. i Sigler, P. B. (1995). "Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats." *Nature* **375**(6528): 203-11.
253. Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q. i Khorasanizadeh, S. (2000). "Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1." *Embo J* **19**(5): 1045-54.
254. Rauch, P., Grebe, M., Elke, C., Spindler, K. D. i Spindler-Barth, M. (1998). "Ecdysteroid receptor and ultraspiracle from *Chironomus tentans* (Insecta) are phosphoproteins and are regulated differently by molting hormone." *Insect Biochem Mol Biol* **28**(4): 265-75.
255. Renaud, J. P. i Moras, D. (2000). "Structural studies on nuclear receptors." *Cell Mol Life Sci* **57**(12): 1748-69.
256. Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. i Moras, D. (1995). "Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid." *Nature* **378**(6558): 681-9.
257. Repa, J. J. i Mangelsdorf, D. J. (1999). "Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism." *Curr Opin Biotechnol* **10**(6): 557-63.
258. Retnakaran, A., Krell, P., Feng, Q. i Arif, B. (2003). "Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry." *Arch Insect Biochem Physiol* **54**(4): 187-99.
259. Rhodes, D. i Klug, A. (1993). "Zinc fingers." *Sci Am* **268**(2): 56-9, 62-5.
260. Ribeiro, R. C., Kushner, P. J., Apriletti, J. W., West, B. L. i Baxter, J. D. (1992). "Thyroid hormone alters *in vitro* DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors." *Mol Endocrinol* **6**(7): 1142-52.
261. Richard, D. S., Applebaum, S. W., Sliter, T. J., Baker, F. C., Schooley, D. A., Reuter, C. C., Henrich, V. C. i Gilbert, L. I. (1989). "Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis *in vitro* by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher *Diptera*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(4): 1421-5.
262. Richard, S. i Zingg, H. H. (1991). "Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter." *J Biol Chem* **266**(32): 21428-33.
263. Riddiford, L. M. (1993). "Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis." *Receptor* **3**(3): 203-9.
264. Riddiford, L. M. i Ashburner, M. (1991). "Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*." *Gen Comp Endocrinol* **82**(2): 172-83.
265. Riddihough, G. i Pelham, H. R. B. (1987). "An ecdysone response element in the *Drosophila hsp27* promoter." *EMBO J* **6**: 3729-3734.
266. Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. i Dingwall, C. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* **64**(3): 615-23.
267. Robertson, N. M., Schulman, G., Karnik, S., Alnemri, E. i Litwack, G. (1993). "Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy." *Mol Endocrinol* **7**(9): 1226-39.
268. Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M. i Laudet, V. (2001). "How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?" *Trends Genet* **17**(10): 554-6.
269. Roeder, R. G. (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." *Trends Biochem Sci* **21**(9): 327-35.

270. Rosen, J., Day, A., Jones, T. K., Jones, E. T., Nadzan, A. M. i Stein, R. B. (1995). "Intracellular receptors and signal transducers and activators of transcription superfamilies: novel targets for small-molecule drug discovery." *J Med Chem* **38**(25): 4855-74.
271. Rubin, G. M. i Lewis, E. B. (2000). "A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research." *Science* **287**(5461): 2216-8.
272. Rymarczyk, G., Grad, I., Rusek, A., Oświęcimska-Rusin, K., Niedziela-Majka, A., Kochman, M. i Ożyhar, A. (2003). "Purification of *Drosophila melanogaster* ultraspiracle protein and analysis of its A/B region-dependent dimerization behavior *in vitro*." *Biol Chem* **384**(1): 59-69.
273. Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J. C., Mortimore, B. J., Willey, D. L., Hunt, S. E., Cole, C. G., Coggill, P. C., Rice, C. M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D. R., Kwok, P. Y., Mardis, E. R., Yeh, R. T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R. H., McPherson, J. D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W. J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M. J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M. C., Linton, L., Lander, E. S. i Altshuler, D. (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." *Nature* **409**(6822): 928-33.
274. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. i Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
275. Sambrook, J., Fritsch, E. F. i Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
276. Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
277. Sartorius, C. A., Melville, M. Y., Hovland, A. R., Tung, L., Takimoto, G. S. i Horwitz, K. B. (1994). "A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform." *Mol Endocrinol* **8**(10): 1347-60.
278. Savkur, R. S. i Burris, T. P. (2004). "The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif." *J. Peptide Res* **63**: 207-212.
279. Schoenmakers, E., Alen, P., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. i Claessens, F. (1999). "Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains." *Biochem J* **341** (Pt 3): 515-21.
280. Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. i Claessens, F. (2000). "Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses." *J Biol Chem* **275**(16): 12290-7.
281. Schrader, M., Bendik, I., Becker-Andre, M. i Carlberg, C. (1993). "Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways." *J Biol Chem* **268**(24): 17830-6.
282. Schrader, M., Muller, K. M. i Carlberg, C. (1994a). "Specificity and flexibility of vitamin D signaling. Modulation of the activation of natural vitamin D response elements by thyroid hormone." *J Biol Chem* **269**(8): 5501-4.
283. Schrader, M., Muller, K. M., Nayeri, S., Kahlen, J. P. i Carlberg, C. (1994b). "Vitamin D3-thyroid hormone receptor heterodimer polarity directs ligand sensitivity of transactivation." *Nature* **370**(6488): 382-6.

284. Schubiger, M. i Truman, J. W. (2000). "The RXR ortholog USP suppresses early metamorphic processes in *Drosophila* in the absence of ecdysteroids." *Development* **127**(6): 1151-9.
285. Schubiger, M., Wade, A. A., Carney, G. E., Truman, J. W. i Bender, M. (1998). "*Drosophila* EcR-B ecdysone receptor isoforms are required for larval molting and for neuron remodeling during metamorphosis." *Development* **125**(11): 2053-62.
286. Schwabe, J. W. (1996). "Transcriptional control: how nuclear receptors get turned on." *Curr Biol* **6**(4): 372-4.
287. Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T. i Rhodes, D. (1993). "The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements." *Cell* **75**(3): 567-78.
288. Schwabe, J. W., Neuhaus, D. i Rhodes, D. (1990). "Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor." *Nature* **348**(6300): 458-61.
289. Segraves, W. A. (1994). "Steroid receptors and other transcription factors in ecdysone response." *Recent Prog Horm Res* **49**: 167-95.
290. Seol, W., Choi, H. S. i Moore, D. D. (1995). "Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors." *Mol Endocrinol* **9**(1): 72-85.
291. Shaffer, P. L. i Gewirth, D. T. (2002). "Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements." *Embo J* **21**(9): 2242-52.
292. Shaffer, P. L., Jivan, A., Dollins, D. E., Claessens, F. i Gewirth, D. T. (2004). "Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4758-63.
293. Shao, D. i Lazar, M. A. (1999). "Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you." *J Clin Invest* **103**(12): 1617-8.
294. Shea, C., Hough, D., Xiao, J., Tzertzinis, G. i Maina, C. V. (2004). "An rxr/usp homolog from the parasitic nematode, *Dirofilaria immitis*." *Gene* **324**: 171-82.
295. Sher, T., Yi, H. F., McBride, O. W. i Gonzalez, F. J. (1993). "cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor." *Biochemistry* **32**(21): 5598-604.
296. Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A. i Greene, G. L. (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." *Cell* **95**(7): 927-37.
297. Sladek, F. M., Ruse, M. D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S. M. i Stallcup, M. R. (1999). "Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6509-22.
298. Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E. i Darnell, J. E., Jr. (1990). "Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily." *Genes Dev* **4**(12B): 2353-65.
299. Sluder, A. E. i Maina, C. V. (2001). "Nuclear receptors in nematodes: themes and variations." *Trends Genet* **17**(4): 206-13.
300. Sluder, A. E., Mathews, S. W., Hough, D., Yin, V. P. i Maina, C. V. (1999). "The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes." *Genome Res* **9**(2): 103-20.
301. Smith, D. B. i Johnson, K. S. (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." *Gene* **67**(1): 31-40.

302. Song, K. H., Park, Y. Y., Park, K. C., Hong, C. Y., Park, J. H., Shong, M., Lee, K. i Choi, H. S. (2004). "The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation." *Mol Endocrinol.*
303. Song, Q., Alnemri, E. S., Litwack, G. i Gilbert, L. I. (1997). "An immunophilin is a component of the insect ecdysone receptor (EcR) complex." *Insect Biochem Mol Biol* **27**(11): 973-82.
304. Song, Q., Sun, X. i Jin, X. Y. (2003). "20E-regulated USP expression and phosphorylation in *Drosophila melanogaster*." *Insect Biochem Mol Biol* **33**(12): 1211-8.
305. Speirs, V., Kerin, M. J., Walton, D. S., Newton, C. J., Desai, S. B. i Atkin, S. L. (2000). "Direct activation of oestrogen receptor-alpha by interleukin-6 in primary cultures of breast cancer epithelial cells." *Br J Cancer* **82**(7): 1312-6.
306. Spindler, K. D., Spindler-Barth, M., Turberg, A. i Adam, G. (1992). "Action of brassinosteroids on the epithelial cell line from *Chironomus tentans*." *Z Naturforsch [C]* **47**(3-4): 280-4.
307. Sreerama, N. i Woody, R. W. (2000). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." *Anal Biochem* **287**(2): 252-60.
308. Stallcup, M. R. (2001). "Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation." *Oncogene* **20**(24): 3014-20.
309. Stryer, L. (1997). *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
310. Studier, F. W. i Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**(1): 113-30.
311. Sutherland, J. D., Kozlova, T., Tzertzinis, G. i Kafatos, F. C. (1995). "*Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7966-70.
312. Swevers, L., Drevet, J. R., Lunke, M. D. i Iatrou, K. (1995). "The silkworm homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation." *Insect Biochem Mol Biol* **25**(7): 857-66.
313. Szyszka, M. (2002). Praca magisterska, Zakład Biochemii Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.
314. Takeshita, A., Ozawa, Y. i Chin, W. W. (2000). "Nuclear receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements." *Endocrinology* **141**(3): 1281-4.
315. Talbot, W. S., Swyryd, E. A. i Hogness, D. S. (1993). "*Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms." *Cell* **73**(7): 1323-37.
316. Tata, J. R. (2002). "Signalling through nuclear receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 702-10.
317. Thomas, H. E., Stunnenberg, H. G. i Stewart, A. F. (1993). "Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle." *Nature* **362**(6419): 471-5.
318. Thompson, E. B. i Kumar, R. (2003). "DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(1): 1-4.
319. Thummel, C. S. (1995). "From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members." *Cell* **83**(6): 871-7.

320. Thummel, C. S. (1996). "Files on steroids-*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action." *Trends Genet* **12**(8): 306-10.
321. Tobe, S. S. i Feyereisen, R. (1983). Juvenile hormone biosynthesis: regulation and assay. *Endocrinology of Insects*. R. G. H. L. Downer, H., red., Alan R. Liss, Inc., New York: 161-168.
322. Toell, A., Polly, P. i Carlberg, C. (2000). "All natural DR3-type vitamin D response elements show a similar functionality *in vitro*." *Biochem J* **352 Pt 2**: 301-9.
323. Tompa, P. (2002). "Intrinsically unstructured proteins." *Trends Biochem Sci* **27**(10): 527-33.
324. Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M. P. i Chambon, P. (1988). "The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation." *Nature* **333**(6169): 185-8.
325. Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. i Chambon, P. (1989). "The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions." *Cell* **59**(3): 477-87.
326. Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. i Rosenfeld, M. G. (1997). "The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function." *Nature* **387**(6634): 677-84.
327. Towers, T. L., Luisi, B. F., Asianov, A. i Freedman, L. P. (1993). "DNA target selectivity by the vitamin D3 receptor: mechanism of dimer binding to an asymmetric repeat element." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6310-4.
328. Trapp, T. i Holsboer, F. (1996). "Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action." *Trends Pharmacol Sci* **17**(4): 145-9.
329. Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F. i Giguere, V. (1999). "Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1." *Mol Cell* **3**(4): 513-9.
330. Tsai, C. C., Kao, H. Y., Yao, T. P., McKeown, M. i Evans, R. M. (1999). "SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development." *Mol Cell* **4**(2): 175-86.
331. Tsai, M. J. i O'Malley, B. W. (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." *Annu Rev Biochem* **63**: 451-86.
332. Tzertzinis, G., Malecki, A. i Kafatos, F. C. (1994). "BmCF1, a *Bombyx mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila* ultraspiracle." *J Mol Biol* **238**(3): 479-86.
333. Umesono, K. i Evans, R. M. (1989). "Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors." *Cell* **57**(7): 1139-46.
334. Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. i Evans, R. M. (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." *Cell* **65**(7): 1255-66.
335. van Tilborg, M. A., Lefstin, J. A., Kruiskamp, M., Teuben, J., Boelens, R., Yamamoto, K. R. i Kaptein, R. (2000). "Mutations in the glucocorticoid receptor DNA-binding domain mimic an allosteric effect of DNA." *J Mol Biol* **301**(4): 947-58.
336. Vanacker, J. M., Pettersson, K., Gustafsson, J. A. i Laudet, V. (1999). "Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta." *Embo J* **18**(15): 4270-9.
337. Vasios, G., Mader, S., Gold, J. D., Leid, M., Lutz, Y., Gaub, M. P., Chambon, P. i Gudas, L. (1991). "The late retinoic acid induction of laminin B1 gene transcription involves RAR binding to the responsive element." *Embo J* **10**(5): 1149-58.

338. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratt, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. i Zhu, X. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-51.
339. Vernooy, S. Y., Copeland, J., Ghaboosi, N., Griffin, E. E., Yoo, S. J. i Hay, B. A. (2000). "Cell death regulation in *Drosophila*: conservation of mechanism and unique insights." *J Cell Biol* **150**(2): F69-76.
340. Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Alen, P., Haelens, A., Peeters, B., Rombauts, W. i Claessens, F. (1999). "Androgen specificity of a response unit upstream of the

- human secretory component gene is mediated by differential receptor binding to an essential androgen response element." *Mol Endocrinol* **13**(9): 1558-70.
341. Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. i Claessens, F. (2000). "Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor." *J Biol Chem* **275**(16): 12298-305.
342. Vogtli, M., Elke, C., Imhof, M. O. i Lezzi, M. (1998). "High level transactivation by the ecdysone receptor complex at the core recognition motif." *Nucleic Acids Res* **26**(10): 2407-14.
343. Wade, P. A., Pruss, D. i Wolffe, A. P. (1997). "Histone acetylation: chromatin in action." *Trends Biochem Sci* **22**(4): 128-32.
344. Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. i Fletterick, R. J. (1995). "A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor." *Nature* **378**(6558): 690-7.
345. Wahl, G. M., Berger, S. L. i Kimmel, A. R. (1987). Guide to molecular cloning techniques. *Methods in Enzymology*. S. L. K. Berger, A. R., Academic Press.
346. Wang, S. F., Ayer, S., Segreaves, W. A., Williams, D. R. i Raikhel, A. S. (2000). "Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptors." *Mol Cell Biol* **20**(11): 3870-9.
347. Warbrick, E. V., Barker, G. C., Rees, H. H. i Howells, R. E. (1993). "The effect of invertebrate hormones and potential hormone inhibitors on the third larval moult of the filarial nematode, *Dirofilaria immitis*, *in vitro*." *Parasitology* **107** (Pt 4): 459-63.
348. Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. i Gustafsson, J. A. (2003). "Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation." *Mol Endocrinol* **17**(10): 1901-9.
349. Warnmark, A., Wikstrom, A., Wright, A. P., Gustafsson, J. A. i Hard, T. (2001). "The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured *in vitro* and show different TBP binding properties." *J Biol Chem* **276**(49): 45939-44.
350. Weigel, N. L. (1996). "Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation." *Biochem J* **319** (Pt 3): 657-67.
351. Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. i Evans, R. M. (1986). "The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor." *Nature* **324**(6098): 641-6.
352. Welshons, W. V., Lieberman, M. E. i Gorski, J. (1984). "Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors." *Nature* **307**(5953): 747-9.
353. Wente, S. R. (2000). "Gatekeepers of the nucleus." *Science* **288**(5470): 1374-7.
354. Widen, C., Zilliacus, J., Gustafsson, J. A. i Wikstrom, A. C. (2000). "Glucocorticoid receptor interaction with 14-3-3 and Raf-1, a proposed mechanism for cross-talk of two signal transduction pathways." *J Biol Chem* **275**(50): 39296-301.
355. Wikstrom, A. C., Bakke, O., Okret, S., Bronnegard, M. i Gustafsson, J. A. (1987). "Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization." *Endocrinology* **120**(4): 1232-42.
356. Willson, T. M. i Moore, J. T. (2002). "Genomics versus orphan nuclear receptors--a half-time report." *Mol Endocrinol* **16**(6): 1135-44.
357. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M. i Milbrandt, J. (1991). "Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast." *Science* **252**(5010): 1296-300.

358. Wilson, T. E., Fahrner, T. J. i Milbrandt, J. (1993). "The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction." *Mol Cell Biol* **13**(9): 5794-804.
359. Wilson, T. E., Paulsen, R. E., Padgett, K. A. i Milbrandt, J. (1992). "Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors." *Science* **256**(5053): 107-10.
360. Wong, C. I., Zhou, Z. X., Sar, M. i Wilson, E. M. (1993). "Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH2-terminal and steroid-binding domains." *J Biol Chem* **268**(25): 19004-12.
361. Wong, C. W., Komm, B. i Cheskis, B. J. (2001). "Structure-function evaluation of ER alpha and beta interplay with SRC family coactivators. ER selective ligands." *Biochemistry* **40**(23): 6756-65.
362. Wong, J., Shi, Y. B. i Wolffe, A. P. (1997). "Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone-regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation." *Embo J* **16**(11): 3158-71.
363. Wood, W. M., Ocran, K. W., Gordon, D. F. i Ridgway, E. C. (1991). "Isolation and characterization of mouse complementary DNAs encoding alpha and beta thyroid hormone receptors from thyrotrope cells: the mouse pituitary-specific beta 2 isoform differs at the amino terminus from the corresponding species from rat pituitary tumor cells." *Mol Endocrinol* **5**(8): 1049-61.
364. Woodard, C. T., Baehrecke, E. H. i Thummel, C. S. (1994). "A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone." *Cell* **79**(4): 607-15.
365. Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. i Gronemeyer, H. (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." *Nat Struct Biol* **3**(2): 206.
366. Xu, M., Chakraborti, P. K., Garabedian, M. J., Yamamoto, K. R. i Simons, S. S. (1996). "Modular structure of glucocorticoid receptor domains is not equivalent to functional independence. Stability and activity of the steroid binding domain are controlled by sequences in separate domains." *J Biol Chem* **271**(35): 21430-8.
367. Xu, W., Alroy, I., Freedman, L. F. i Sigler, P. B. (1993). "Stereochemistry of specific steroid receptor-DNA interactions." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 133-9.
368. Xu, X., Otsuki, M., Saito, H., Sumitani, S., Yamamoto, H., Asanuma, N., Kouhara, H. i Kasayama, S. (2001). "PPARalpha and GR differentially down-regulate the expression of nuclear factor-kappaB-responsive genes in vascular endothelial cells." *Endocrinology* **142**(8): 3332-9.
369. Yamada, S., Shimizu, M. i Yamamoto, K. (2003). "Vitamin D receptor." *Endocr Dev* **6**: 50-68.
370. Yamamoto, N., Li, Q. L., Mita, S., Morisawa, S. i Inoue, A. (2001). "Inhibition of thyroid hormone binding to the nuclear receptor by mobilization of free fatty acids." *Horm Metab Res* **33**(3): 131-7.
371. Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P. i Evans, R. M. (1993). "Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes." *Nature* **366**(6454): 476-9.
372. Yao, T. P., Segreaves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M. i Evans, R. M. (1992). "*Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation." *Cell* **71**(1): 63-72.

373. Yudit, M. R., Vorojeikina, D., Zhong, L., Skafar, D. F., Sasson, S., Gasiewicz, T. A. i Notides, A. C. (1999). "Function of estrogen receptor tyrosine 537 in hormone binding, DNA binding, and transactivation." *Biochemistry* **38**(43): 14146-56.
374. Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., McCabe, E. R. i et al. (1994). "An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita." *Nature* **372**(6507): 635-41.
375. Zazopoulos, E., Lalli, E., Stocco, D. M. i Sassone-Corsi, P. (1997). "DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis." *Nature* **390**(6657): 311-5.
376. Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. i Gronemeyer, H. (1994). "The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats." *Embo J* **13**(6): 1425-33.
377. Zelhof, A. C., Ghbeish, N., Tsai, C., Evans, R. M. i McKeown, M. (1997). "A role for ultraspiracle, the *Drosophila* RXR, in morphogenetic furrow movement and photoreceptor cluster formation." *Development* **124**(13): 2499-506.
378. Zhang, X. K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M. I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P. i Pfahl, M. (1992). "Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-*cis* retinoic acid." *Nature* **358**(6387): 587-91.
379. Zhang, Y., Beck, C. A., Poletti, A., Edwards, D. P. i Weigel, N. L. (1994). "Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. *In vitro* phosphorylation by casein kinase II." *J Biol Chem* **269**(49): 31034-40.
380. Zhao, Q., Chasse, S. A., Devarakonda, S., Sierk, M. L., Ahvazi, B. i Rastinejad, F. (2000). "Structural basis of RXR-DNA interactions." *J Mol Biol* **296**(2): 509-20.
381. Zhao, Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M. A. i Rastinejad, F. (1998). "Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex." *Mol Cell* **1**(6): 849-61.
382. Zoglowek, A. (2004). Rekombinowany DHR38 - oczyszczanie i właściwości; *Praca doktorska*, Zakład Biochemii Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.

11

SPIS TABEL

MATERIAŁY I METODY

NUMER	TYTUŁ	STRONA
Tabela 6.1.	Oligonukleotydy wykorzystywane do wprowadzenia mutacji w regionie kasety T.	89
Tabela 6.2.	Oligonukleotydy wykorzystywane do wprowadzenia mutacji w α -helisie rozpoznającej element regulatorowy białka EcRDBD.	89
Tabela 6.3.	Pozostałe oligonukleotydy wykorzystywane w niniejszej pracy.	89
Tabela 6.4.	Standardowe metody i procedury wykorzystywane w pracy.	91
Tabela 6.5.	Wybrane parametry fizyko-chemiczne otrzymanych rekombinowanych białek typu „dzikiego” i posiadających mutacje delecyjne w C-końcowych sekwencjach.	102

WYNIKI

Tabela 7.1.	Procentowa zawartość struktur drugorzędowych mutantów kasety T obliczona na podstawie widm CD.	116
Tabela 7.2.	Procentowa zawartość struktur drugorzędowych białka EcRDBD _{V72I/P73Q/N75P} .	118
Tabela 7.3.	Procentowa zawartość struktur drugorzędowych mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy obliczona na podstawie widm CD.	135

12

SPIS RYSUNKÓW

WSTĘP

NUMER	TYTUŁ	STRONA
Rys.3.1.	Schemat drzewa filogenetycznego nadrodziny receptorów jądrowych.	20
Rys.3.2.	Schemat strukturalnej i funkcjonalnej organizacji receptora jądrowego.	24
Rys.3.3.	Schemat zależnej od liganda aktywacji transkrypcji z udziałem receptorów jądrowych.	31
Rys.3.4.	Elementy regulatorowe receptorów jądrowych.	33
Rys.3.5.	Wybrane struktury krystaliczne kompleksów DBD-DNA.	35
Rys.3.6.	Receptory heterodimeryzujące z RXR wiążą się z sekwencjami DR o określonej długości odstępnika pomiędzy półmiejscami - „reguła 1-5”.	37
Rys.3.7.	Schemat struktury ERDBD w roztworze uzyskanej przy wykorzystaniu spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego.	40
Rys.3.8.	Schemat struktury drugorzędowej RXRDBD.	41
Rys.3.9.	Schemat struktury przestrzennej GRDBD w roztworze uzyskanej spektroskopią NMR.	44
Rys.3.10.	Schematyczne przedstawienie elementów strukturalnych GRDBD i ERDBD, ważnych dla homodimeryzacji na GRE i ERE.	46
Rys.3.11.	Elementy strukturalne ARDBD istotne dla tworzenia homodimeru na ADR3.	51
Rys.3.12.	Schemat elementów strukturalnych RXRDBD i TRDBD istotnych dla tworzenia heterodimeru na DR4.	55
Rys.3.13.	Powierzchnia dimeryzacyjna w homodimerze RXRDBD na DR1 i DR2.	58
Rys.3.14.	Zmiany konformacyjne kasety T RXRDBD wyindukowane wiązaniem DNA.	59
Rys.3.15.	Schemat oddziaływań pomiędzy RARDBD a RXRDBD na DR1.	60

Rys.3.16.	Różne funkcje CTE DBD umożliwiające tworzenie kompleksów receptorów na elementach regulatorowych.	61
Rys.3.17.	Schemat elementów strukturalnych VDRDBD ważnych dla homodimeryzacji na elementach VDRE.	64
Rys.3.18.	Ekdysteroidy pełniące hormonalne funkcje u stawonogów.	67
Rys.3.19.	Profil zmian stężenia ekdysteroidów podczas metamorfozy <i>D. melanogaster</i> .	68
Rys.3.20.	Przypuszczalne ligandy białka Usp - trzy formy JH.	71
Rys.3.21.	Sekwencje EcRE występujące w regionach promotorowych genów kontrolowanych przez 20E u <i>D. melanogaster</i> .	77

WYNIKI

Rys.7.1.	Sekwencja wykorzystywanego w pracy ds oligonukleotydu <i>hsp27_{pal}</i> .	105
Rys.7.2.	Schemat struktury pierwszorzędowej EcRDBD _{WT} .	106
Rys.7.3.	Schemat procedury oczyszczania białek EcRDBD _{XYZ} zawierających mutacje w regionie kasety T.	108
Rys.7.4.	Elektroforetyczna analiza czystości białek EcRDBD _{XYZ} zawierających mutacje w obszarze kasety T.	109
Rys.7.5.	Analiza oddziaływań mutantów kasety T białka EcRDBD z <i>hsp27_{pal}</i> .	111
Rys.7.6.	Analiza oddziaływań mutantów kasety T białka EcRDBD w obecności białka UspDBD z <i>hsp27_{pal}</i> .	113
Rys.7.7.	Widma CD mutantów kasety T białka EcRDBD	115
Rys.7.8.	Porównanie C-końcowych wydłużeń DBD białek EcR i innych przykładowych receptorów jądrowych.	117
Rys.7.9.	Charakterystyka białka EcRDBD _{V72I/P73Q/N75P} .	119
Rys.7.10.	Porównanie struktur pierwszorzędowych EcRDBD i UspDBD z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> .	121
Rys.7.11.	Schemat struktur pierwszorzędowych obejmujących sekwencje CTE EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> .	122
Rys.7.12.	Elektroforetyczna analiza czystości białek EcRDBD _{ΔX} i białka UspDBD.	123
Rys.7.13.	Analiza oddziaływań białek EcRDBD _{ΔX} posiadających w CTE mutacje delecyjne z <i>hsp27_{pal}</i> .	125
Rys.7.14.	Minimalne fragmenty kasety A z CTE EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> wystarczające do specyficznego tworzenia kompleksów na <i>hsp27_{pal}</i> .	126
Rys.7.15.	Struktura pierwszorzędowa EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> z zaznaczonymi pozycjami reszt α-helisy rozpoznającej element regulatorowy poddanych mutagenzie.	128

Rys.7.16. Elektroforetyczna analiza czystości białek EcRDBD _{XYZ} zawierających mutacje w regionie α -helisy rozpoznającej element regulatorowy.	129
Rys.7.17. Reszty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy kluczowe dla formowania homodimerów EcRDBD na <i>hsp27_{pal}</i> .	130
Rys.7.18. Analiza wiązania mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD do <i>hsp27_{ΔR}</i> .	131
Rys.7.19. Kluczowe reszty α -helisy rozpoznającej element regulatorowy dla formowania heterodimerów EcRDBD z UspDBD na <i>hsp27_{pal}</i> .	133
Rys.7.20. Widma CD mutantów α -helisy rozpoznającej element regulatorowy EcRDBD.	134
Rys.7.21. Lokalizacja reszt tyrozylowych w EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> i <i>B. mori</i> .	136
Rys.7.22. Profile denaturacyjne EcRDBD.	137
Rys.7.23. Charakterystyka renaturowanego białka EcRDBD.	139

DYSKUSJA

Rys.8.1. Porównanie sekwencji CTE EcRDBD z <i>D. melanogaster</i> z sekwencjami CTE receptorów jądrowych znalezionych w genomie <i>C. elegans</i> .	145
--	------------

DODATEK

Zamieszczone w Dodatku sekwencje pochodzą z bazy GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

I. Sekwencja genu *EcR* oraz białka EcR z *D. melanogaster* (numer dostępu w bazie GenBank: M74078).

Numerację nukleotydów podano od pierwszej zasady wchodzącej w skład pierwszego kodonu. Numeracja reszt aminokwasowych podana jest od pierwszej reszty, którą jest metionina (odpowiednio M₁) (Koelle i wsp., 1991). Kolorem niebieskim oznaczono cDNA i reszty aminokwasowe EcRDBD₃₆₅ (N-końcowa: A₂₅₆ i C-końcowa: G₃₆₅) (na podstawie Niedzieli-Majki (1999)). Z uwagi na to, że reszta G₃₆₅ pochodzi również z wektora pGEX-2T (6.1.3.1.), na niebiesko oznaczono tylko dwie pierwsze zasady kodonu G₃₆₅ wchodzące w skład genu *EcR*.

1	atgaagcggcgctgggtcgaacaacggcggttcattgcgcctaccggaggagtcgtcctcgc	60
1	M K R R W S N N G G F M R L P E E S S S	20
61	gaggtcacgtcctcctcgaacggggtcgtcctgcctcgggggtgaacatgtcgcctcgc	120
21	E V T S S S N G L V L P S G V N M S P S	40
121	tcgctggactcgcacgactattgcgatcaggacctttggctctgcggcaacgagtcgggt	180
41	S L D S H D Y C D Q D L W L C G N E S G	60
181	tcgtttggcggtccaacggccatggcctaagtcagcagcagcagagcgtcatcacgctg	240
61	S F G G S N G H G L S Q Q Q Q S V I T L	80
241	gccatgcacgggtgctccagcactctgcccgcgcagacaaccatcattccgatcaacggc	300
81	A M H G C S S T L P A Q T T I I P I N G	100
301	aacgcgaatgggaatggaggctccaccaatggccaatatgtgccgggtgccactaatctg	360
101	N A N G N G G S T N G Q Y V P G A T N L	120
361	ggagcgttggccaacgggatgctcaatgggggcttcaatggaatgcagcaacagattcag	420
121	G A L A N G M L N G G F N G M Q Q Q I Q	140
421	aatggccacggcctcatcaactccacaacgccttcaacgccgaccaccccgctccacctt	480
141	N G H G L I N S T T P S T P T T P L H L	160
481	cagcagaacctggggggcgcgggcgggcggtatcgggggaatgggtattcttcaccac	540
161	Q Q N L G G A G G G G I G G M G I L H H	180
541	gcgaatggcaccccaaattggccttatcgagttgtgggaggcgggcgggagtaggtctt	600
181	A N G T P N G L I G V V G G G G G V G L	200

601	ggagtaggcggaggcggagtgaggaggcctgggaatgcagcacacaccccgaagcgattcg	660
201	G V G G G G V G G L G M Q H T P R S D S	220
661	gtgaattctatatctttcaggtcgcgatgatctctcgccttcgagcagcttgaacggatac	720
221	V N S I S S G R D D L S P S S S L N G Y	240
721	tcggcgaacgaaagctgcgatgcgaagaagagcaagaaggacctg cgccacgggtgcaa	780
241	S A N E S C D A K K S K K G P A P R V Q	260
781	gaggagctgtgcctgggtttgcggcgacagggcctccggctaccactacaacgccctcacc	840
261	E E L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T	280
841	tgtgagggctgcaaggggttctttcgacgcagcgttacgaagagcgccgtctactgctgc	900
281	C E G C K G F F R R S V T K S A V Y C C	300
901	aagttcgggcgcgccctgcgaaatggacatgtacatgaggcgaaagtgtcaggagtgccgc	960
301	K F G R A C E M D M Y M R R K C Q E C R	320
961	ctgaaaaagtgcctggccgtgggtatgcggccggaatgcgtcgtcccggagaaccaatgt	1020
321	L K K C L A V G M R P E C V V P E N Q C	340
1021	gcgatgaagcggcgcgaaaagaaggcccagaaggagaaggacaaaatgaccacttcgccg	1080
341	A M K R R E K K A Q K E K D K M T T S P	360
1081	agctctcagcatggcggaatggcagcttggcctctggtggcgccaagactttgttaag	1140
361	S S Q H G G N G S L A S G G G Q D F V K	380
1141	aaggagattcttgaccttatgacatgcgagccgccccagcatgccactattccgctacta	1200
381	K E I L D L M T C E P P Q H A T I P L L	400
1201	cctgatgaaatattggccaagtgtcaagcgcgcaatataccttccttaacgtacaatcag	1260
401	P D E I L A K C Q A R N I P S L T Y N Q	420
1261	ttggccgttatatacaagttaatttgggtaccaggatggctatgagcagccatctgaagag	1320
421	L A V I Y K L I W Y Q D G Y E Q P S E E	440
1321	gatctcaggcgtataatgagtcaaccgatgagaacgagagccaaacggacgtcagcttt	1380
441	D L R R I M S Q P D E N E S Q T D V S F	460
1381	cggcatataaccgagataaccatactcacgggtccagttgattgttgagtttgctaaaggt	1440
461	R H I T E I T I L T V Q L I V E F A K G	480
1441	ctaccagcgtttacaaagataccccaggaggaccagatcacgttactaaaggcctgctcg	1500
481	L P A F T K I P Q E D Q I T L L K A C S	500
1501	tcggaggtgatgatgctgcgtatggcacgacgctatgaccacagctcggactcaatatcc	1560
501	S E V M M L R M A R R Y D H S S D S I F	520
1561	ttcggaataatagatcatatacgcgggattcttacaaaatggccggaatggctgataac	1620
521	F A N N R S Y T R D S Y K M A G M A D N	540
1621	attgaagacctgctgcatttctgccgcaaagtgttctcgatgaaggtggacaacgtcgaa	1680
541	I E D L L H F C R Q M F S M K V D N V E	560
1681	tacgcgcttctcactgccattgtgatcttctcggaccggccgggcctggagaaggcccaa	1740
561	Y A L L T A I V I F S D R P G L E K A Q	580
1741	ctagtcgaagcgatccagagctactacatcgacacgctacgcatttatatactcaaccgc	1800
581	L V E A I Q S Y Y I D T L R I Y I L N R	600

1801	cactgcgggcgactcaatgagcctcgtcttctacgcaaagctgctctcgatcctcaccgag	1860
601	H C G D S M S L V F Y A K L L S I L T E	620
1861	ctgcgtagctgggcaaccagaacgccgagatgtgtttctcactaaagctcaaaaaccgc	1920
621	L R T L G N Q N A E M C F S L K L K N R	640
1921	aaactgcccgaagttcctcgaggagatctgggacgttcatgccatcccgccatcggtccag	1980
641	K L P K F L E E I W D V H A I P P S V Q	660
1981	tgcgaccttcagattaccaggaggagaacgagcgtctcgagcgggctgagcgtatgcgg	2040
661	S H L Q I T Q E E N E R L E R A E R M R	680
2041	gcatcggttggggcgccattaccgcccgcattgattgcgactctgcctccacttcggcg	2100
681	A S V G G A I T A G I D C D S A S T S A	700
2101	gcggcagccgcgggcccagcatcagcctcagcctcagccccagccccaaccctcctccctg	2160
701	A A A A A Q H Q P Q P Q P Q P Q P S S L	720
2161	accagaacgattcccagcaccagacacagccgcagctacaacctcagctaccacctcag	2220
721	T Q N D S Q H Q T Q P Q L Q P Q L P P Q	740
2221	ctgcaaggtcaactgcaaccccagctccaaccacagcttcagacgcaactccagccacag	2280
741	L Q G Q L Q P Q L Q P Q L Q T Q L Q P Q	760
2281	attcaaccacagccacagctccttcccgtctccgctcccgtgcccgcctccgtaaccgca	2340
761	I Q P Q P Q L L P V S A P V P A S V T A	780
2341	cctggttccttgtccgcggtcagtagcagcgaatacatgggcggaagtgcggccata	2400
781	P G S L S A V S T S S E Y M G G S A A I	800
2401	ggacccatcacgccggcaaccaccagcagtagtcacggctgccgttaccgctagctccacc	2460
801	G P I T P A T T S S I T A A V T A S S T	820
2461	acatcagcggtagcgatgggcaacggagttggagtcggtgttgggtgggcggaacgtc	2520
821	T S A V P M G N G V G V G V G V G G N V	840
2521	agcatgtatgcgaacgccagacggcgatggccttgatgggtgtagccctgcattcgcac	2580
841	S M Y A N A Q T A M A L M G V A L H S H	860
2581	caagagcagcttatcgggggagtgggcggttaagtcgggagcactcgacgactgcatag	2637
861	Q E Q L I G G V A V K S E H S T T A *	878

II. Sekwencja genu *Usp* oraz białka Usp z *D. melanogaster* (numer dostępu w bazie GenBank: X53417).

Numerację nukleotydów podano od pierwszej zasady wchodzącej w skład pierwszego kodonu. Numeracja reszt aminokwasowych podana jest od pierwszej reszty, którą jest metionina (odpowiednio M₁) (Oro i wsp., 1990). Kolorem niebieskim oznaczono cDNA i reszty aminokwasowe UspDBD₁₉₃ (N-końcowa: N₉₄ i C-końcowa: G₁₉₃) (na podstawie Niedzieli-Majki (1999)).

1	atggacaactgcgaccaggacgccagcttttcggctgagccacatcaaggaggaggtcaag	60
1	M D N C D Q D A S F R L S H I K E E V K	20
61	cgggacatctcgcagctgaacgacagcaacaacagcagcttttcgcccaggccgagagt	120
21	P D I S Q L N D S N N S S F S P K A E S	40
121	cccgatgcccttcacgagccatgtccatgggtccacgtgctgcccgggtccaactccgcc	180
41	P V P F M Q A M S M V H V L P G S N S A	60
181	agctccaacaacaacagcgctggagatgccc aaatggcgagggcgccc aattcggctgga	240
61	S S N N N S A G D A Q M A Q A P N S A G	80
241	ggctctgcccggcgtgcagtcacagcagcagtatccgcctaaccatccgctgagcgggcagc	300
81	G S A A A A V Q Q Q Y P P N H P L S G S	100
301	aagcacctctgctctattttgcggggatcggggcagtggaagcactacggcgtgtacagc	360
101	K H L C S I C G D R A S G K H Y G V Y S	120
361	tgtgaggggctgcaagggtctctttaaacgcacagtgcgcaaggatctcacatacgttgc	420
121	C E G C K G F F K R T V R K D L T Y A C	140
421	agggagaaccgcaactgcatcatagacaagcggcagaggaaccgctgccagtactgccgc	480
141	R E N R N C I I D K R Q R N R C Q Y C R	160
481	taccagaagtgcctaacctgcggcatgaagcgcgaagcgggtccaggaggagcgtcaacgc	540
161	Y Q K C L T C G M K R E A V Q E E R Q R	180
541	ggcgcccgcaatgcggcggttaggctcagcgccagcggaggcgccagtagcgggtccaggt	600
181	G A R N A A G R L S A S G G G S S G P G	200
601	tcggtaggcggatccagctctcaaggcggaggaggaggaggcggtttctggcggaatg	660
201	S V G G S S S Q G G G G G G V S G G M	220
661	ggcagcggcaacggttctgatgacttcatgaccaatagcgtgtccagggtttctcgatc	720
221	G S G N G S D D F M T N S V S R D F S I	240
721	gagcgcacatcatagaggccgagcagcgagcggagacccaatgcggcgatcgtgcactgacg	780
241	E R I I E A E Q R A E T Q C G D R A L T	260
781	ttcctgcgcgttggtccctattccacagtccagccggactacaagggtgccgtgtcggcc	840
261	F L R V G P Y S T V Q P D Y K G A V S A	280
841	ctgtgccaaagtgggtcaacaaacagctcttccagatgggtcgaatacgcgcgcacatgatgccg	900
281	L C Q V V N K Q L F Q M V E Y A R M M P	300

901	cactttgcccaggtgccgctggacgaccaggtgattctgctgaaagccgcttggatcgag	960
301	H F A Q V P L D D Q V I L L K A A W I E	320
961	ctgctcattgCGAACgtggcctgggtgcagcatcgtttcgctggatgacggcggtgccggc	1020
321	L L I A N V A W C S I V S L D D G G A G	340
1021	ggcggggcggtggactaggccacgatggctcctttgagcgacgatcaccgggccttcag	1080
341	G G G G G L G H D G S F E R R S P G L Q	360
1081	ccccagcagctgttcctcaaccagagcttctcgtaccatcgcaacagtgcgatcaaagcc	1140
361	P Q Q L F L N Q S F S Y H R N S A I K A	380
1141	ggtgtgtcagccatcttcgaccgcataattgtcggagctgagtgtaaagatgaagcggctg	1200
381	G V S A I F D R I L S E L S V K M K R L	400
1201	aatctcgaccgacgcgagctgtcctgcttgaaggccatcatactgtacaacccggacata	1260
401	N L D R R E L S C L K A I I L Y N P D I	420
1261	cgcgggatcaagagccgggCGGagatcgagatgtgccgcgagaaggtgtacgcttgctg	1320
421	R G I K S R A E I E M C R E K V Y A C L	440
1321	gacgagcactgccgcctggaacatccgggCGGacgatggacgctttgcgcaactgctgctg	1380
441	D E H C R L E H P G D D G R F A Q L L L	460
1381	cgtctgcccgctttgCGatcgatcagcctgaagtGCCaggatcacctgttcctcttccgc	1440
461	R L P A L R S I S L K C Q D H L F L F R	480
1441	attaccagcgaccggccgctggaggagctctttctcgagcagctggaggcgccgcccca	1500
481	I T S D R P L E E L F L E Q L E A P P P	500
1501	cccggcctggcgatgaaactggagtag	1527
501	P G L A M K L E *	508

III. Sekwencja genu *EcR* oraz białka EcR z *B. mori* (numer dostępu w bazie GenBank: L35266).

Numerację nukleotydów podano od pierwszej zasady wchodzącej w skład pierwszego kodonu. Numeracja reszt aminokwasowych podana jest od pierwszej reszty, którą jest metionina (odpowiednio M₁) (Swevers i wsp., 1995). Kolorem niebieskim oznaczono cDNA i reszty aminokwasowe EcRDBD₃₀₇ (N-końcowa: A₁₉₉ i C-końcowa: D₃₀₇).

1	atgagagtcgagaacgtggataacgtatcgtttgctttgaacggacgcgctgacgagtgg	60
1	M R V E N V D N V S F A L N G R A D E W	20
61	tgtatgtctgtagagacgcgttttagatagtttagtgcgagaaaaaagtgaagtgaagcc	120
21	C M S V E T R L D S L V R E K S E V K A	40
121	tacgtcggaggatgtccctcggtaatcacggatgctggagcgtatgacgcgctcttcgac	180
41	Y V G G C P S V I T D A G A Y D A L F D	60
181	atgagacgccgctggtctaataacggtggcttcccgcgtgcgaatgcttgaagagagctct	240
61	M R R R W S N N G G F P L R M L E E S S	80
241	tcagaagtgacatcgtcttcggcactgggtttgccaccggccatggttatgtcgccgaa	300
81	S E V T S S S A L G L P P A M V M S P E	100
301	tccttggcgtcgcccagtatcgagccctcgagctatggagctacgatgacggaatcact	360
101	S L A S P E Y R A L E L W S Y D D G I T	120
361	tataatacagcccagtcctctgctgggtgcatgcaatatgcaacagcaacagctacaacct	420
121	Y N T A Q S L L G A C N M Q Q Q Q L Q P	140
421	cagcaaccacatccagcaccaccgacgctccccacgatgcctttaccaatgcctcccaca	480
141	Q Q P H P A P P T L P T M P L P M P P T	160
481	acaccgaaatcagaaaatgaatcgatgtcatcaggtcgagaggaactttcgccggcttca	540
161	T P K S E N E S M S S G R E E L S P A S	180
541	agcataaatggctgcagtgctgatgctgacgccagacggcagaaagaaaggctcctgcacct	600
181	S I N G C S A D A D A R R Q K K G P A P	200
601	cgacagcaagaggagctatgtcttgtctgcggcgacagagcctccggataccactacaac	660
201	R Q Q E E L C L V C G D R A S G Y H Y N	220
661	gcactgacgtgtgaaggatgcaaaggattcttcaggcggagtgtcaccaaaaaacgcagta	720
221	A L T C E G C K G F F R R S V T K N A V	240
721	tatatttgtaaaatttggacatgcctgtgaaatggatatgtacatgaggaggaaatgtcaa	780
241	Y I C K F G H A C E M D M Y M R R K C Q	260
781	gagtgtcgattaaagaaatgtctagcggtaggaatgaggcctgaatgtgtcatacaggag	840
261	E C R L K K C L A V G M R P E C V I Q E	280
841	cccagtaaaaaataaagacaggcaaaagacaaaagaaagacaaaggaatattattacctggt	900
281	P S K N K D R Q R Q K K D K G I L L P V	300

901	agtagcaccacagtcgaagacc acatgccccgatcatgcaatgtgatccacctccgccc	960
301	S T T T V E D H M P P I M Q C D P P P P	320
961	gagggcgccaggattcacgaagtcgtcccgaggtatctttcggagaagctgatggagcag	1020
321	E A A R I H E V V P R Y L S E K L M E Q	340
1021	aacaggcagaagaacataaccaccattgtcggcgcaatcagaagtcctctgatcgcgaggctc	1080
341	N R Q K N I P P L S A N Q K S L I A R L	360
1081	gtgtgggtaccaggagggatgatgagcagccctccgacgaggatctcaaaagagtaacgcag	1140
361	V W Y Q E G Y E Q P S D E D L K R V T Q	380
1141	acttggcagtcggatgaagaggacgaggaatccgatctacccttccgccagatcacggag	1200
381	T W Q S D E E D E E S D L P F R Q I T E	400
1201	atgacgatcttaacgggtccagttgatcgtcgagttcgccaagggtctaccgggcttttcg	1260
401	M T I L T V Q L I V E F A K G L P G F S	420
1261	aagatatcacagtctgatcaaatacaccttattaaaagcctcgtccagcgagggtgatgatg	1320
421	K I S Q S D Q I T L L K A S S S E V M M	440
1321	ctgcgggtggcgaggcgatacgcgcgcggtccgacagcgtgctgttcgccaacaacaag	1380
441	L R V A R R Y D A A S D S V L F A N N K	460
1381	gcgtacacgcgcgacaactaccgccaaggcgcatggcctacgtcatcgaagacctccta	1440
461	A Y T R D N Y R Q G G M A Y V I E D L L	480
1441	cacttctgccggtgcatgttcgcgatgggcatggacaatgtgcactttgcactgctcacg	1500
481	H F C R C M F A M G M D N V H F A L L T	500
1501	gccatcggttatattctcagatcgggccggggtcgagcagccgctcgctggtagaagagatc	1560
501	A I V I F S D R P G L E Q P S L V E E I	520
1561	cagagatactacctgaacacggttgcaatttacatcatcaaccagaacagcgcgctcgtcg	1620
521	Q R Y Y L N T L R I Y I I N Q N S A S S	540
1621	cgctgcgccgtgatctacggcaggatcctgagcgtgctgaccgagctacgcacgctcggc	1680
541	R C A V I Y G R I L S V L T E L R T L G	560
1681	acgcaaaactccaacatgtgcatctcgtgaagctgaagaacaggaagctgccgccgttc	1740
561	T Q N S N M C I S L K L K N R K L P P F	580
1741	ctcgaggagatctgggacgtggcgagggtggccacgacgcatcccacgggtgctgccgccc	1800
581	L E E I W D V A E V A T T H P T V L P P	600
1801	accaaccgggtggtgctatag	1821
601	T N P V V L *	606

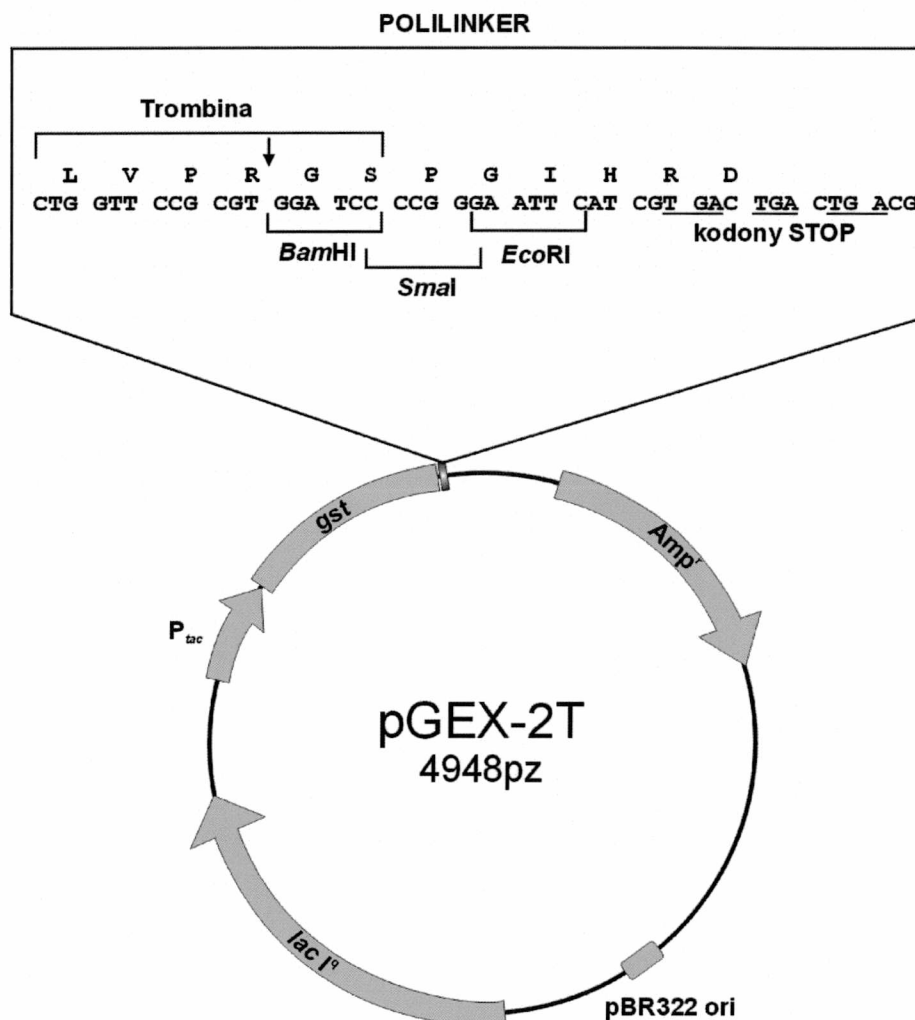
IV. Sekwencja genu *Usp* oraz białka Usp z *B. mori* (numer dostępu w bazie GenBank: U06073).

Numerację nukleotydów podano od pierwszej zasady wchodzącej w skład pierwszego kodonu. Numeracja reszt aminokwasowych podana jest od pierwszej reszty, którą jest metionina (odpowiednio M₁) (Tzertzinis i wsp., 1994). Kolorem niebieskim oznaczono cDNA i reszty aminokwasowe UspDBD₂₀₂ (N-końcowa: N₁₀₄ i C-końcowa: S₂₀₂).

1	atgtcgagcgtggcggaagaaagataaacgcacaatgtcggtaactgcgttgatcaatagg	60
1	M S S V A K K D K R T M S V T A L I N R	20
61	gcgtggccaatgacgcctagcccacagcagcagcagcagatgggtgccgtctacacagcat	120
21	A W P M T P S P Q Q Q Q Q M V P S T Q H	40
121	tccaatttcctgcacgcaatggctacaccttcaaccacacccaatgttgaactcgatata	180
41	S N F L H A M A T P S T T P N V E L D I	60
181	caatggctgaacatagagtcaggggtttatgtcgcctatgtcaccgcccgaatgaagcca	240
61	Q W L N I E S G F M S P M S P P E M K P	80
241	gatacggcgatgctcgacgggtttccgagacgactcgacgccgccccctcccttcaagaat	300
81	D T A M L D G F R D D S T P P P P F K N	100
301	tatccccctaaccatcccttgagcgggtcaaaacatctatgctccatattgtggtgacaga	360
101	Y P P N H P L S G S K H L C S I C G D R	120
361	gcctcgggcaaacattacggagtatacagttgtgaaggctgcaaagggttcttcaagagg	420
121	A S G K H Y G V Y S C E G C K G F F K R	140
421	acagtcaggaaggatctcacatacgcgtgccgggaggacaagaattgtataatagataaa	480
141	T V R K D L T Y A C R E D K N C I I D K	160
481	cgccagcggaatcgttgccagtactgccgatatcagaagtgtctcgcttgccgcatgaag	540
161	R Q R N R C Q Y C R Y Q K C L A C G M K	180
541	aggagggtgtgcaagaggagagacagcagccgagggcggtacagaagacgctcatccc	600
181	R E A V Q E E R Q R A A R R T E D A H P	200
601	agcagctctgtacaggagctatcgatcgagcgctgtggaattggaggcgtagttgcg	660
201	S S S V Q E L S I E R L L E L E A L V A	220
661	gattcagctgaggagttacagatcctacgtgtcgggtcccgaagcggcgtagccggccaag	720
221	D S A E E L Q I L R V G P E S G V P A K	240
721	taccgagccccgtctcgagtctttgtcaaataggcaacaaacagatagccgctctcatt	780
221	Y R A P V S S L C Q I G N K Q I A A L I	260
781	gtttgggcgcgtgacattccacacttcgggcagctagaaatcgacgatcagatccttcta	840
261	V W A R D I P H F G Q L E I D D Q I L L	280
841	atcaagggtcctggaacgaactgctgctgttcgctatcgcatggcggtctatggagttc	900
281	I K G S W N E L L L F A I A W R S M E F	300

901	ctgaatgatgaacgagagaacgtagactcgcggaatacggcgccgcctcaactcatttgt	960
301	L N D E R E N V D S R N T A P P Q L I C	320
961	ttaatgccaggcatgacgctgcaccgcaactccgcgctgcaggccggcggtggggcagatc	1020
321	L M P G M T L H R N S A L Q A G V G Q I	340
1021	ttcgaccgcgtgctctccgagctgtcgctcaagatgcgctccctccgcatggaccaggcc	1080
341	F D R V L S E L S L K M R S L R M D Q A	360
1081	gagtgcgtcgcgctcaaggccatcatactcctcaatcctgacgtaaaaggattgaagaat	1140
361	E C V A L K A I I L L N P D V K G L K N	380
1141	aaacaagaagtggacgttcttcgagaaaagatgttcttatgcctggacgagtactgccgg	1200
381	K Q E V D V L R E K M F L C L D E Y C R	400
1201	cgctcgcgcgggcggggaggagggcggttcgcgggcgctgctgctgcggtgccggcgctg	1260
401	R S R G G E E G R F A A L L L R L P A L	420
1261	cgctccatctcgctcaagagcttcgagcacctctacctgttcacctcgtaggcccaggggc	1320
421	R S I S L K S F E H L Y L F H L V A E G	440
1321	agcgtgagctcgctacatccgcgacgcgctctgcaaccacgcgcccgcacacccaac	1380
441	S V S S Y I R D A L C N H A P P I D T N	460
1381	atcatgtag	1389
461	I M *	462

V. Wektor ekspresyjny pGEX-2T (Amersham Biosciences); numer dostępu w bazie GenBank: U13850.



gst - gen kodujący glutationo-S-transferazę (ang. *glutathione S-transferase*); kodon startu translacji dla GST (ATG): 258 par zasad (pz); region kodujący peptyd rozpoznawany przez trombinę (strzałką zaznaczono miejsce trawienia): 918-935 pz;

Amp^r - gen β -laktamazy nadający bakteriom oporność na ampicylinę (ang. *ampicilin resistance*); promotor: -10: 1309-1314 pz, -35: 1286-1291 pz; kodon startu (ATG): 1356 pz; kodon stopu (TAA): 2214 pz;

lacI^q - gen *lac* represora; kodon startu (GTG): 3297 pz; kodon stopu (TGA): 4377 pz;

P_{tac} - hybrydowy promotor kierujący transkrypcją genów rekombinowanych białek; promotor: -10: 205-211 pz, -35: 183-188 pz; *lac* operator: 217-237 pz; miejsce wiązania rybosomów dla GST: 244 pz;

pBR322 ori - miejsce inicjacji replikacji plazmidu; region konieczny: 2281-2977 pz;

POLILINKER - 930-945 pz;

- Sekwencja nukleotydowa prokariotycznego wektora ekspresyjnego pGEX-2T. Sekwencję polilinkera (930-945 pz) pogrubiono. Kodon startu transkrybowanej sekwencji genu *gst* zaznaczono dużymi literami i strzałką (kodon metioniny: 258-260 pz); kodony STOP oznaczono kursywą i podkreślono dwiema kreskami. Sekwencję (869-891 pz) standardowego 5'-końcowego startera (6.1.5.2.) do sekwencjonowania fragmentów wklonowanych w wektor podkreślono linią ciągłą, natomiast sekwencję (1020-998 pz) do której wiąże się standardowy 3'-końcowy starter (6.1.5.2.) zaznaczono linią przerywaną (Amersham Biosciences).

```

1      acgttatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgctcaggcagccatcggaagctgtg      60
61      gtatggctgtgcaggctcgtaaatactgcataattcgtgtcgctcaaggcgactcccgt      120
121     tctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaataattctgaaatgagc      180
181     tgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttca      240
241     cacaggaaacagtattc→ATGccccctatactagggtatttgaaaattaagggccttgtgc      300
301     aaccctactcgacttcttttggaaatatcttgaagaaaaatatgaagagcatttgtatgagc      360
361     gcgatgaagggtgataaatggcgaaacaaaaagtttgaattgggtttggagtttcccaatc      420
421     ttctttatttatattgatggtgatgttaaattaacacagtctatggccatcatacgttata      480
481     tagctgacaagcacacaacatggttgggtggttgtccaaaagagcgtgcagagatttcaatgc      540
541     ttgaaggagcggtttttgatattagatacgggtgtttcgagaattgcatatagtaaagact      600
601     ttgaaactctcaaagttgattttcttagcaagctacctgaaatgctgaaaatgttcgaag      660
661     atcgtttatgtcataaaacatatttaaatggtgatcatgtaaccatcctgacttcatgt      720
721     tgtatgacgctcttgatgttgttttatacatggaccaatgtgcctggatgcgttcccaa      780
781     aattagtttgtttttaaaaaacgtattgaagctatcccacaaattgataagtacttgaaat      840
841     ccagcaagtatatagcatggcctttgcagggctggcaagccacgtttgggtggtggcgacc      900
901     atcctccaaaatcggatctggttccgcgtggatccccgggaattcatcgtgactgactga      960
961     cgatctgcctcgcgcggtttcgggtgatgacgggtgaaaaccctctgacacatgcagctcccg      1020
1021    agacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcggt      1080
1081    cagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgaccagtcacgtagcgatagcggag      1140
1141    tgtataattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttatagggttaatgtca      1200
1201    tgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttctggggaaatgtgcgcggaaccc      1260

```

1261	ctatttggtttatTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCT	1320
1321	gataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcg	1380
1381	cccttattccctTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGG	1440
1441	tgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatc	1500
1501	tcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagca	1560
1561	cttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaac	1620
1621	tcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaa	1680
1681	agcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtg	1740
1741	ataacactgcgggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctt	1800
1801	ttttgcacaacatgggggatcatgtaaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatg	1860
1861	aagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgc	1920
1921	gcaaactattaactggcgaaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactgga	1980
1981	tggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctggttta	2040
2041	ttgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggc	2100
2101	cagatggtaagccctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtccaggcaactatgg	2160
2161	atgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgt	2220
2221	cagaccaagtttactcatatatacttttagattgattttaaaacttcatttttaatttaaaa	2280
2281	ggatctaggtgaagatcctTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTT	2340
2341	cgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctTTTT	2400
2401	ttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtt	2460
2461	tgccggatcaagagctaccaactctTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGA	2520
2521	taccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtag	2580
2581	caccgcctacatacctcgctctgctaatacctgttaccagtggtgctgccagtggcgata	2640
2641	agtcgtgtcttaccgggttggtactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgg	2700
2701	gctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactga	2760
2761	gatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggaca	2820
2821	ggatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaa	2880
2881	acgcctggatatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatTTT	2940
2941	tgtgatgctcgtcagggggcgaggacctatggaaaaacgccagcaacgcggcctTTTTTAC	3000
3001	ggttcctggcctTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTCGGTTATCCCCTGATT	3060
3061	ctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacga	3120

3121 ccgagcgcagcgcagtcagtgagcgcaggaagcggaagagcgctgatgcggtatTTTTctcc 3180
3181 ttacgcacatctgtgcggtatTTTcacaccgcataaattccgacaccatcgaatgggtgcaaaa 3240
3241 cctttcgcggtatggcatgatagcgcgccggaagagagtcgaattcaggggtgggtgaatgtga 3300
3301 aaccagtaacggttatacgcgatgtgcgcagagtatgccgggtgtctcttatcagaccgtttccc 3360
3361 gcgtgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtgggaagcggcgga 3420
3421 tggcgggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcggggcaaacagtcgt 3480
3481 tgctgattggcggtgccacctccagtcctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcg 3540
3541 cgattaaatctcgcgcgcgatcaactgggtgccagcgtgggtgggtgcgatggtagaacgaa 3600
3601 gcggcgctcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcgaacgcgtcagtgggc 3660
3661 tgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcacta 3720
3721 atgttccggcggttattttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttct 3780
3781 cccatgaagacgggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaa 3840
3841 tcgcgctgttagcggggcccatTAAGTtctgtctcggcgcgctctgcgtctggctggctggc 3900
3901 ataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcgggaacgggaaggcgactggagtgc 3960
3961 ccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcga 4020
4021 tgctgggttccaacgatcagatggcgctgggcgcgaatgcgcgccattaccgagtcggggc 4080
4081 tgcgcgttgggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatggt 4140
4141 atatcccgccggttaaccaccatcaaacaggattttcgctgctggggcaaaccagcgtgg 4200
4201 accgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtct 4260
4261 cactgggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgt 4320
4321 tggccgattcattaatgcagctggcacgacagggtttcccgactggaaagcgggcagtgag 4380
4381 cgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggctttacactttatg 4440
4441 cttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagc 4500
4501 tatgaccatgattacggattcactggccgctcgttttacaacgctcgtgactgggaaaacc 4560
4561 tggcggttaccgaacttaatcgcccttgagcacatccccctttcgccagctggcgtaatag 4620
4621 cgaagagggcccgaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcg 4680
4681 ctttgccctgggtttccggcaccagaagcgggtgcgggaaagctgggtggagtgcgatcttcc 4740
4741 tgaggccgatactgtcgtcgtccctcaaactggcagatgcacgggttacgatgcgcccat 4800
4801 ctacaccaacgtaacctatcccattacgggtcaatccgccgtttgttcccacggagaatcc 4860
4861 gacgggttggttactcgctcacatttaatgttgatgaaagctgggtacaggaaggccagac 4920
4921 gcgaattatttttgatggcggttgaatt 4948

