

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*Mgr Marcin Jeleń*

**Charakterystyka oddziaływania  
mitochondrialnego systemu białek  
opiekuńczych Ssq1/Hsc20 z białkiem Isu1  
uczestniczącym w biogenezie centrów żelazo-  
siarkowych**

**Characteristics of the interaction of the mitochondrial  
chaperone system Ssq1/Hsc20 with the Isu1 protein  
involved in the biogenesis of iron-sulfur clusters**

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: Dr hab. Rafał Dutkiewicz, prof. UG  
Zakład Biochemii Ewolucyjnej  
GDAŃSK 2023

**Chciałbym serdecznie podziękować:**

**Dr hab. Rafałowi Dutkiewiczowi, prof. UG**

Za pomoc w prowadzeniu badań naukowych w ramach realizowanego projektu doktorskiego

**Prof. Jarosławowi Marszałkowi**

Za perfekcyjną organizację pracy całego zespołu Zakładu Biochemii Ewolucyjnej

**Wszystkim Osobom z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej**

Za owocną współpracę podczas realizacji badań naukowych

**Zespołowi Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN**

Za możliwość współpracy związaną z przeprowadzeniem analiz spektrometrii masowej

Pracę dedykuję **Osobom bliskim mojemu sercu** za wsparcie w najtrudniejszych chwilach i pomoc, która umożliwiła mi ukończenie pracy doktorskiej



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I

Badania wykonano w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki – OPUS 10

„Biochemiczna rekonstrukcja kluczowych etapów mitochondrialnej biogenezy centrów żelazo-siarkowych (FeS)”

nr 2015/19/B/NZ1/00237



*Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej*

oraz w ramach grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej – TEAM

„Hsp70/J-protein chaperones substrate binding cycle: molecular mechanisms and functional consequences”

nr POIR.04.04.00-00-4114/17-00

## SPIS TREŚCI

### STRESZCZENIE

### SUMMARY

#### 1. WSTĘP

- 1.1. Struktura i rola centrów żelazo-siarkowych
- 1.2. Bakteryjne systemy biogenezy centrów żelazo-siarkowych
- 1.3. Mitochondrialny system biogenezy centrów żelazo-siarkowych w *Saccharomyces cerevisiae*
- 1.4. Białka opiekuńcze systemu Hsp70 zaangażowane w biogenezę centrów FeS
- 1.5. Elementy systemu biogenezy FeS działające na późnych etapach procesu
- 1.6. Rola centrów żelazo-siarkowych w patogenezie

#### CEL PRACY

#### 2. MATERIAŁY

- 2.1. Szczepy bakteryjne
- 2.2. Plazmidy
- 2.3. Pożywki do hodowli bakterii
- 2.4. Inne

#### 3. METODY

- 3.1. Izolacja DNA plazmidowego
- 3.2. Wprowadzenie bakterii w stan kompetencji
- 3.3. Transformacja szczepów ekspresyjnych
- 3.4. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących z użyciem żelu poliakrylamidowego (SDS-PAGE)
- 3.5. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach natywnych (Blue Native PAGE)
- 3.6. Oczyszczanie białek
  - 3.6.1. Oczyszczanie białka Isu1-His
  - 3.6.2. Oczyszczanie białka Isu1-GST
  - 3.6.3. Oczyszczanie białka Hsc20-His
  - 3.6.4. Oczyszczanie białka Ssq1-His
  - 3.6.5. Oczyszczanie kompleksu podwójnego Hsc20:Isu1-His
  - 3.6.6. Oczyszczanie kompleksu potrójnego Ssq1-His:Hsc20:Isu1-His
- 3.7. Przygotowanie złoza do precypitacji kompleksów białkowych
- 3.8. Precypitacja kompleksów białkowych
- 3.9. Pomiar aktywności ATPazowej
- 3.10. Dichroizm kołowy
- 3.11. Wymiana deuterowa połączona ze spektrometrią mas (HDX-MS)
- 3.12. Analiza bioinformatyczna
- 3.13. Spektrometria masowa prążków uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE
- 3.14. Natywna spektrometria masowa

#### 4. WYNIKI

- 4.1. Oczyszczanie białek Isu1, Hsc20 oraz Ssq1
  - 4.1.1. Oczyszczanie białka Ssq1
  - 4.1.2. Oczyszczanie białka Hsc20

- 4.1.3. Oczyszczanie białka Isu1
- 4.2. Treonina T239 pełni kluczową rolę w aktywności ATPazowej białka Hsp70
- 4.3. Wydajna metoda oczyszczania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 wymaga równoczesnej nadprodukcji jego składników w bakteryjnym systemie ekspresyjnym
  - 4.3.1. Oczyszczanie kompleksu Hsc20:Isu1
  - 4.3.2. Oczyszczanie kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His z wykorzystaniem oczyszczonego białka Ssq1<sup>T239/A</sup>-His i kompleksu Hsc20:Isu1-His
  - 4.3.3. Oczyszczanie kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1-His w oparciu o bakteryjny system ekspresyjny, w którym była prowadzona jednoczesna nadprodukcja Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz Hsc20:Isu1-His
  - 4.3.4. Oczyszczanie kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His w oparciu o bakteryjny system ekspresyjny, w którym była prowadzona jednoczesna nadprodukcja Ssq1<sup>T239/A</sup>-His oraz Hsc20:Isu1-His
- 4.4. Strukturalny model kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1 z naniesioną mapą oddziaływań pomiędzy białkami
- 4.5. Motyw PVK w obrębie substratu Isu1 determinuje wiązanie przez białko Ssq1
- 4.6. Hydrofobowe reszty aminokwasowe L105, L109, Y163 w obrębie białka Hsc20 są zaangażowane w interakcję z substratem Isu1
- 4.7. Sieć oddziaływań kluczowych dla oddziaływania białka Hsc20 z białkiem Ssq1
  - 4.7.1. Reszty aminokwasowe motywu HPD białka Hsc20 pełnią kluczową rolę w oddziaływaniu z Ssq1
  - 4.7.2. Reszty R37, K38, R41 i K70 znajdujące się w obrębie helisy H2 i H3 domeny J białka Hsc20 są zaangażowane w oddziaływanie z Ssq1
  - 4.7.3. Reszty K132, K172 domeny C-terminalnej Hsc20 są zaangażowane w tworzenie kompleksu z Ssq1
- 4.8. Reszta aminokwasowa R450 w obrębie białka Ssq1 oddziałuje z resztą D362 białka Ssq1 i jest kluczowa dla formowania się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1
5. DYSKUSJA
  - 5.1. Funkcjonalne oddziaływanie systemu białek opiekuńczych Hsp70/J ze zwiniętym substratem białkowym
  - 5.2. Strukturalne czynniki determinujące funkcjonalne oddziaływanie białka zawierającego domenę J Hsc20 z białkiem Ssq1 należącym do rodziny białek Hsp70
  - 5.3. Ewolucja systemu białek opiekuńczych oraz ich rola w procesie biogenezy centrów FeS
6. BIBLIOGRAFIA

# STRESZCZENIE

Moja praca doktorska dotyczy analizy strukturalno-funkcjonalnej kompleksu mitochondrialnych białek opiekuńczych wyspecjalizowanego systemu Hsp70 (obejmującego białko Hsp70 – Ssq1 oraz białko typu J – Hsc20) z białkiem Isu1, które stanowi molekularne rusztowanie, w obrębie którego zachodzi biosynteza centrów żelazo-siarkowych (FeS). Białka opiekuńcze z rodziny Hsp70 pełnią wiele istotnych ról w komórce. Poza klasycznymi funkcjami białek opiekuńczych, takich jak zapewnianie białkom ochrony przed agregacją, lub pomoc w dezagregacji, są one również zaangażowane w fałdowanie prekursorów białek, transport polipeptydów przez błony oraz modulację oddziaływań między białkami. Większość białek Hsp70 jest wielofunkcyjna, a za ich specyficzność substratową odpowiadają białka z domeną J (JDP). System Hsp70 funkcjonuje w określonym cyklu, w którym hydroliza ATP przez Hsp70 powoduje silne związanie substratu. Kolejny etap, czyli uwolnienie substratu następuje, gdy czynnik wymiany nukleotydów (NEF) dokona wymiany ADP na ATP, powodując zmianę konformacji Hsp70 na sprzyjającą dysocjacji substratu. W moich badaniach skoncentrowałem się na specyficznym przypadku, jakim są białka opiekuńcze uczestniczące w biosyntezie centrów żelazo-siarkowych (FeS). Proces biogenezy FeS można podzielić na dwa etapy: (i) syntezę centrum FeS w obrębie wyspecjalizowanego białka rusztowania (Isu1) oraz (ii) transfer centrum FeS z molekularnego rusztowania Isu1 do białek docelowych przy udziale białek systemu Hsp70. U eukariontów system ten jest zlokalizowany w mitochondriach. W przypadku drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*, które stanowiły mój modelowy organizm badawczy, doszło do duplikacji genu kodującego mitochondrialne białko Hsp70. To doprowadziło do powstania kopii białka mtHsp70 o nazwie Ssq1, która to jest dedykowana wyłącznie do procesu biogenezy centrów FeS. Wysoki stopień specjalizacji systemu powoduje, że stanowi on doskonały model badawczy, ponieważ białko Ssq1 oddziałuje wyłącznie z jednym JDP (Hsc20) i jego jedynym substratem jest Isu1.

Pierwszym wyzwaniem podczas moich badań było opracowanie sposobu uzyskiwania preparatów białkowych kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1 o wysokim stężeniu. W tym celu wykorzystałem metodę, w ramach której w ekspresyjnym szczepie *E. coli* prowadziłem jednoczesną nadprodukcję trzech białek (odpowiednio Isu1, Hsc20 i Ssq1 z mutacją T239A uniemożliwiającą hydrolizę ATP). Takie podejście umożliwiło mi uzyskać kompleksy białkowe już w komórkach. Niemniej kluczowym etapem była preparatywna filtracja żelowa, która pozwoliła mi na rozdział kompleksów białkowych na podstawie ich masy. Przygotowany w ten sposób kompleks Ssq1-Hsc20-Isu1 był następnie wykorzystany w doświadczeniach wymiany deuterowej połączonej ze spektrometrią mas (HDX-MS). Uzyskane wyniki potwierdziły istotną rolę znanych z wcześniejszej literatury wybranych reszt aminokwasowych kluczowych w oddziaływaniu między białkami Ssq1, Hsc20 i Isu1. Jednocześnie otrzymane wyniki pozwoliły na wytypowanie kolejnych rejonów w obrębie białek, które wcześniej nie zostały zidentyfikowane jako istotne dla oddziaływania białko:białko w obrębie analizowanego kompleksu. Na tej podstawie zostały przygotowane konstrukty plazmidowe z substytucjami alaninowymi wytypowanych reszt aminokwasowych. Następnie zmutowane wersje białek oczyściłem i analizowałem w doświadczeniach typu precypitacja kompleksów białkowych. W swoich doświadczeniach wykorzystałem wersję białka Isu1 z znacznikiem GST (Glutation-S-Transferaza), które precypitowałem poprzez do dodanie do mieszaniny reakcyjnej złoża agarozowego opłaszczanego zredukowanym glutationem w celu związania znakowanego białka i białek z nim oddziaływujących. Wykorzystując białko fuzyjne Isu1-GST przeprowadziłem serię eksperymentów z różnymi wariantami białek Ssq1, Hsc20 i Isu1 z wprowadzonymi mutacjami w obrębie regionów zaangażowanych w formowanie kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1. Ta analiza obejmowała reszty aminokwasowe znane z literatury, jak również nowo zidentyfikowane podczas moich badań. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że regiony w obrębie białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1 zidentyfikowane jako istotne w doświadczeniach wymiany deuterowej połączonej ze spektrometrią mas (HDX-MS) są kluczowe dla formowania potrójnego kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1.

# SUMMARY

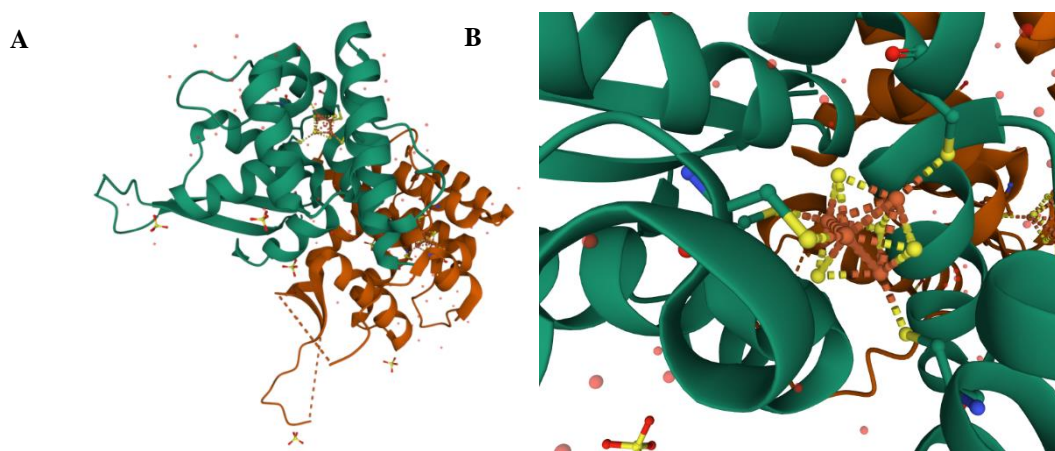
My doctoral thesis concerns the structural and functional analysis of the complex of mitochondrial specialized chaperone proteins (including the Hsp70 - Ssq1 protein and the J-type protein - Hsc20) with the Isu1 protein, which is the molecular scaffold within which the biosynthesis of iron-sulfur clusters (FeS) takes place. The chaperones of the Hsp70 family play many important roles in the cell. In addition to the classical functions of chaperones, such as protecting proteins from aggregation or helping them disaggregate, they are also involved in the folding of protein precursors, the transport of polypeptides across membranes, and the modulation of protein interactions. Most Hsp70 proteins are multifunctional and their substrate specificity is determined by cooperation with J-domain proteins (JDP). The Hsp70 system operates in a specific cycle where the hydrolysis of ATP by Hsp70 results in a strong binding of the substrate. The next step, i.e. the release of the substrate, takes place when the nucleotide exchange factor (NEF) exchanges ADP for ATP, causing the Hsp70 conformation to change to favor dissociation of the substrate. In my research, I focused on a specific case, which is the chaperone proteins involved in the biosynthesis of iron-sulfur centers (FeS). The process of FeS biogenesis can be divided into two stages: (i) synthesis of the FeS cluster within the specialized scaffold protein (Isu1) and (ii) transfer of the FeS cluster from the Isu1 molecular scaffold to target proteins with the participation of Hsp70 system proteins. In eukaryotes, this system is located in the mitochondria. In the case of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which was my model research organism, the gene coding for the mitochondrial Hsp70 protein was duplicated. This led to the creation of a copy of the mtHsp70 protein called Ssq1, which is dedicated exclusively to the biogenesis process of FeS clusters. The high degree of specialization of this system makes it an excellent research model, because Ssq1 protein interacts with only one JDP (Hsc20) and its only substrate is Isu1.

The first challenge during my research was to develop a method for obtaining highly concentrated preparations of the Ssq1-Hsc20-Isu1 complex. For this purpose, I used a method in which I overproduced three proteins in *Escherichia coli* expression system (Isu1, Hsc20 and Ssq1, respectively, with the T239A mutation preventing ATP hydrolysis). This approach allowed me to obtain protein complexes already in cells. Nevertheless, the key step was preparative gel filtration, which allowed me to separate protein complexes based on their mass. The Ssq1-Hsc20-Isu1 complex prepared in this way was then used in deuterium exchange experiments combined with mass spectrometry (HDX-MS). The obtained results confirmed the important role of selected key amino acid residues known from the previous literature in the interaction between the Ssq1, Hsc20 and Isu1 proteins. At the same time, the obtained results allowed for the selection of further regions within the proteins that had not previously been identified as significant for the protein:protein interaction within the analyzed complex. On this basis, plasmid constructs with alanine substitutions of selected amino acid residues were prepared. Then, the mutated versions of the proteins were purified and analyzed in protein complex precipitation experiments. In my experiments, I used a version of the Isu1 protein with a GST (Glutathione-S-Transferase) tag, which I precipitated by adding reduced glutathione-coated agarose to the reaction mixture in order to bind the labeled protein and proteins interacting with it. Using the Isu1-GST fusion protein, I conducted a series of experiments with different variants of the Ssq1, Hsc20 and Isu1 proteins with introduced mutations within the regions involved in the formation of the Ssq1-Hsc20-Isu1 complex. This analysis included amino acid residues known from the literature as well as those newly identified during my research. The obtained results unequivocally confirmed that the regions within the Ssq1, Hsc20 and Isu1 proteins identified as significant in deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments are crucial for the formation of the Ssq1-Hsc20-Isu1 ternary complex.

# 1. WSTĘP

## 1.1 Struktura i rola centrów żelazo-siarkowych

Centra żelazo siarkowe (FeS) to nieorganiczne grupy prostetyczne składające się z atomów żelaza i siarki, a w wybranych przypadkach także z innych metali, jak choćby molibden (Seefeldt i wsp., 2009), nikiel lub miedź (Rees 2002). Siarka znajduje się na –II stopniu utlenienia, a żelazo zależnie od warunków na +II lub +III stopniu utlenienia. Zmiana stopnia utlenienia żelaza wpływa na reaktywność centrów z innymi związkami (Beinert i wsp., 1997). Najprostsze centra żelazo-siarkowe składają się z dwóch atomów siarki i dwóch atomów żelaza (2Fe-2S) i przyjmują postać rombu. Bardziej skomplikowane pod względem struktury są sześciennie centra 4Fe-4S składające się z czterech atomów siarki i czterech atomów żelaza (Ryc.1).



### Ryc.1 Centra żelazo-siarkowe są istotnymi grupami prostetycznymi białek

*Struktura przestrzenna przykładowego białka zawierającego centrum żelazo-siarkowe (A) oraz zbliżenie na centrum 4Fe-4S (B). Centrum 4Fe-4S jest koordynowane przez cztery cysteiny. Kolorem żółtym oznaczono atomy siarki, a kolorem czerwonym atomy żelaza.*

Wykorzystana została struktura domeny żelazo siarkowej białka prymazy *H. sapiens*; PDB ID: 6DHW.

Centra żelazo siarkowe pełnią szczególną rolę ze względu na zdolność do przyjmowania i oddawania elektronów. Potencjał elektrochemiczny zależnie od rodzaju centrum mieści się w granicach między +300mV, a -500mV. Prócz składu samego centrum na reaktywność ma też wpływ charakter chemiczny reszt koordynujących centrum oraz znajdujących się w jego bezpośrednim otoczeniu (Meyer 2008). Właśnie koordynacja jest kluczowym mechanizmem utrzymującym centra w strukturze białka. Atomy żelaza w centrum są koordynowane przez nukleofilowe ligandy w cząsteczce białka, zazwyczaj donorem elektronów jest atom siarki z grupy tiolowej łańcucha bocznego cysteiny. Alternatywnie rolę ligandów mogą też pełnić takie aminokwasy jak histydyna, arginina, kwas asparaginowy oraz seryna (Lill i Mühlenhoff 2008). Istotną cechą jest to, że centra żelazo-siarkowe zmieniają stopień utlenienia bez znaczącej zmiany swojej geometrii (Rouault 2014). W przypadku akonitazy dodatkowo jeszcze dochodzi do konwersji aktywnej formy zawierającej centrum 4Fe-4A do formy nieaktywnej zawierającej centrum 3Fe-4S. Centrum



3Fe-4S mimo utraty jednego atomu żelaza nadal zachowuje geometrię bardzo zbliżoną do sześcienną typową dla centrum 4Fe-4S (Beinert i wsp., 1983).

Centra żelazo-siarkowe pełnią wiele kluczowych funkcji w komórce. Jedną z bardziej istotnych funkcji jest przekazywanie elektronów w łańcuchu oddechowym. Przykładowo tę funkcję pełnią centra żelazo-siarkowe obecne w kompleksie I (Hirst 2013). Kolejnym procesem w jaki zaangażowane są centra żelazo-siarkowe jest biokataliza. Dobrym przykładem białka, które pełni taką rolę jest wcześniej wspomniana akonitaza, czyli enzym konwertujący cytrynian w izocytrynian w cyklu Krebsa. Inną funkcją centrów jest funkcja regulatorowa. Przykładowo bakteryjne białko FNR jest czynnikiem transkrypcyjnym ulegającym aktywacji, gdy utlenienie atomów żelaza w centrum żelazo-siarkowym powoduje jego rozpad. Dzięki temu FNR pełni rolę detektora podwyższonego stężenia tlenu, co z kolei może prowadzić do powstania wolnych rodników. W tym przypadku białko FNR może aktywować ekspresję genów których produkty są odpowiedzialne za neutralizację rodników (Metter i wsp., 2008, Imlay 2008). Dodatkowo warto wspomnieć o takich funkcjach pełnionych przez białka FeS jak synteza aminokwasów (Lill i Mühlhoff 2006), naprawa DNA, wydłużanie telomerów. Ponadto centra FeS zostały zidentyfikowane w obrębie helikazy DNA zależnej od ATP (Rudolf i wsp., 2006), prymazy DNA (O'Brien i wsp., 2017), jak również odgrywają kluczową rolę podczas biogenezy rybosomów (Kispal i wsp., 2005), metabolizmu żelaza (Rouault 2006), czy asymilacja azotu cząsteczkowego (Jacobson i wsp., 1989).

Lokalizacja przykładowych białek w komórce eukariotycznej	
Prymaza (Pri2)	Jądro komórkowe
Homolog endonukleazy III (Ntg2)	Jądro komórkowe
Czynnik inicjacji translacji (Rli1)	Jądro komórkowe
Białko regulatorowe żelaza (IRP1)	Cytozol
Dehydrogenaza 3-izopropylglicylo-3-aminowa (Leu1)	Cytozol
Octanotransferaza glicerolo-3-fosforanu (GPAT)	Cytozol
Białko 3 kompleksu elongatora (Elp3)	Cytozol
Akonitaza (Aco1)	Mitochondrium
Homoakonitaza (Lys4)	Mitochondrium
Syntaza lipoilowa (Lip5)	Mitochondrium
Kompleks I	Mitochondrium
Białko Rieske	Mitochondrium
Ferrodoksyna (Yah1)	Mitochondrium

## 1.2 Bakteryjne systemy biogenezy centrów żelazo-siarkowych

Analiza systemów biogenezy centrów żelazo-siarkowych jest trudna ze względu na to, że w większości przypadków prawidłowe funkcjonowanie tych systemów jest niezbędne dla przetrwania komórki. Mutacje genów kodujących białka związane z biogenezą i transportem FeS często powodują letalny fenotyp. Z tego też względu niezwykle trudno było powiązać funkcje wielu komponentów, które stanowią element maszyneryi białkowych zaangażowanych w biosyntezę centrów FeS, właśnie z tym szlakiem biochemicznym. Obecnie wiemy, że

proces biogenezy centrów żelazo-siarkowych jest procesem istotnym, który nie zachodzi w sposób spontaniczny, ale wymaga udziału skomplikowanych maszynarii białkowych. Pierwszym zidentyfikowanym systemem biogenezy FeS jest system NIF (*ang. Nitrogen Fixation*). Do jego odkrycia doprowadziły badania funkcjonowania nitrogenazy, głównego katalitycznego komponentu zaangażowanego w proces redukcji azotu cząsteczkowego N<sub>2</sub> do amoniaku NH<sub>3</sub> (Brill 1980, Rees i Howard 2003).

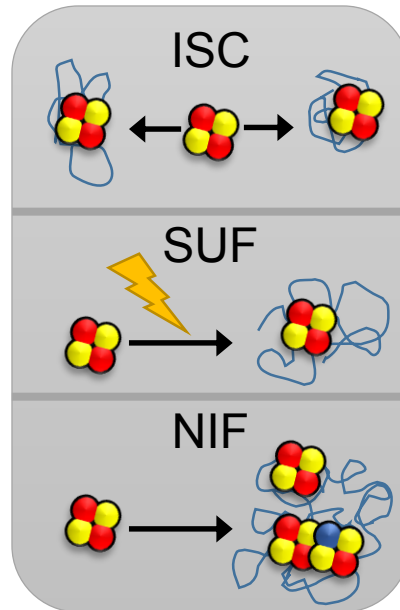
Nitrogenaza jest heterooktamerem, na który składają się dwie pary białek Fe oraz białko MoFe, które dzieli się na mniejsze podjednostki, parę podjednostek  $\alpha$  i parę podjednostek  $\beta$ . Każda para białek Fe współdzieli centrum 4Fe-4S, które stanowi element strukturalny łączący obie cząsteczki białka razem ze sobą oraz uczestniczy w transferze elektronów. Każda podjednostka w białku MoFe zawiera centrum 8Fe-7S (centrum P) również uczestniczące w transferze elektronów. 7Fe-9S-Mo-C-homocytrynian (kofaktor FeMo lub FeMoco) jest zaś obecny w obu podjednostkach  $\alpha$  jako główny element katalityczny odpowiedzialny za aktywację i redukcję azotu cząsteczkowego (Seefeldt i wsp., 2009). Sekwencje genów strukturalnych kodujących podjednostki białka MoFe znaleziono w genomie *Azotobacter vinelandii* i nazwano nifD i nifK. Wraz z tymi genami zsekwencjonowano też pozostałe geny w operonie NIF, których funkcje poznano dopiero później. Bakteria *A. vinelandii* stanowiła dobry organizm do badań ze względu na łatwość manipulacji genetycznych, wiązanie azotu w warunkach tlenowych i fakt, że redukcja azotu nie jest niezbędna do przeżycia o ile w podłożu hodowlanym zostanie zapewnione źródło zredukowanego azotu, przykładowo amoniak. Spełniając ostatni warunek, hodowane w taki sposób mutanty defektywne w redukcji azotu były nie do odróżnienia od szczepów typu dzikiego (Bishop i Brill 1977).

Początkowo nie wiedziano o istotnej roli centrów żelazo-siarkowych w biochemicznym mechanizmie funkcjonowania nitrogenazy. Pierwszą wskazówką była obserwacja obniżenia aktywności białka MoFe w przypadku wprowadzenia mutacji do genów nifE, nifN i nifB, które nie miały wtedy przypisanej funkcji, lecz było wiadomo, że nie są to geny strukturalne żadnego z komponentów nitrogenazy (Brill 1980). Gdy oczyszczone białko MoFe potraktowano N-metyloformamidem wówczas do roztworu był uwalniany czynnik zawierający żelazo i molibden, który ze względu na skład został nazwany FeMoco. Gdy ten czynnik został dodany do lizatów szczepów z mutacjami w genach nifE, nifN i nifB, to zaobserwowano wzrost aktywności nitrogenazy *in vitro* (Shah i Brill 1981). Rozważano mechanizm, w którym białka NifE, NifN i NifB osobno dostarczają poszczególne składniki do syntezy FeMoco w obrębie nitrogenazy, więc delecja genów strukturalnych nifD i nifK mimo zachowania pozostałych genów byłaby jednoznaczna z brakiem FeMoco w lizatach. Okazało się jednak, że szczep z delecją genów strukturalnych nadal jest w stanie produkować FeMoco i lizaty tego szczepu po zmieszaniu z lizatami z defektywnymi białkami NifE, NifN i NifB tworzyły mieszaninę wykazującą aktywność nitrogenazy *in vivo* (Ugalde i wsp., 1984). Rozwiązaniem była koncepcja białka molekularnego rusztowania, na którym centra żelazo-siarkowe i pochodne są syntezowane przed przekazaniem w kompletnej postaci do białek docelowych.

Pierwszym odkrytym rusztowaniem był kompleks NifEN składający się z białek NifE i NifN. Oba te białka ulegały ekspresji na zbliżonym poziomie, jak geny strukturalne nifD i nifK oraz wykazywały duże podobieństwa strukturalne, w szczególności w rejonie wiążącym FeMoco (Brigle i wsp., 1985). W doświadczeniach *in vitro* wykazano udział białka Fe (NifH)

w dojrzewaniu FeMoco na molekularnym rusztowaniu NifEN. W szczepie z delecją białka NifH i kompleksu NifDK będącego docelowym akceptorem FeMoco zaobserwowano akumulację na molekularnym rusztowaniu NifEN prekursora FeMoco niezawierającego molibdenu i homocytrynianu. W warunkach *in vitro* można przekształcić prekursor w kompletny kofaktor FeMo przez inkubację związanego z prekursorem kompleksu NifEN z białkiem Fe, homocytrynianem, źródłem molibdenianu ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ),  $\text{MgCl}_2$  i ATP. ATP jest niezbędne do aktywności enzymatycznej białka Fe które jest reduktazą zależną od ATP. Po inkubacji tej mieszaniny uzyskiwany jest funkcjonalny kofaktor FeMo (Hu i Ribbe 2011).

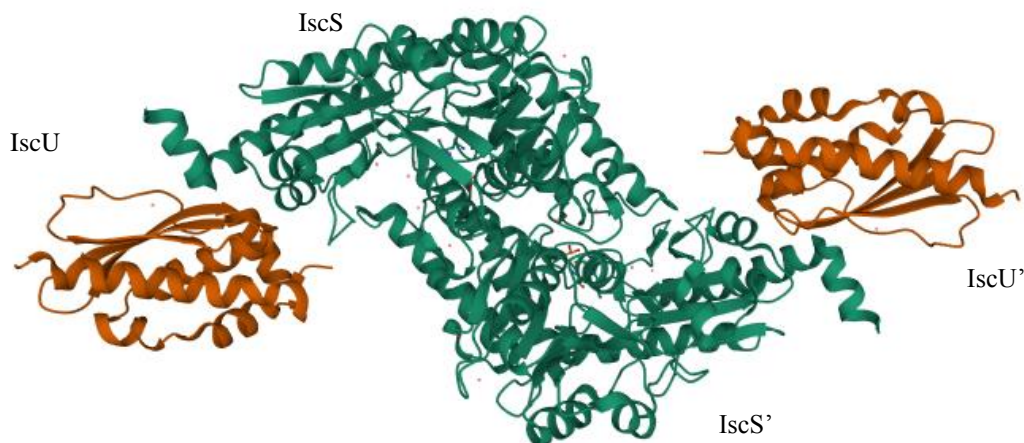
Prekursor kofaktora FeMo zawiera komplet atomów żelaza i siarki obecnych w docelowym kofaktorze, nie zawiera jedynie molibdenu i homocytrynianu. Uzasadnione było podejrzenie, że istnieje poprzedzający etap, w którym są syntezowane centra o bardziej podstawowej strukturze służące jako substraty do syntezy prekursora. W przypadku wielu delecji poszczególnych genów zlokalizowanych w operonie NIF defekt można było skompensować przez dodanie brakującego białka lub czynnika ze szczepu prawidłowo produkującego wybrany komponent. Do tego funkcje nitrogenazy zależnej od molibdenu i żelaza może zastąpić nitrogenaza zależna od wanadu i żelaza oraz nitrogenaza zależna tylko od żelaza. W przypadku delecji genów kodujących białka NifS i NifU komórki wykazują mocno spowolniony wzrost w warunkach wymagających redukcji azotu, nawet gdy zapewnione są składniki do funkcjonowania wszystkich trzech systemów nitrogenazy. Do tego w warunkach *in vitro* znacznie obniżona jest jednocześnie aktywność białka MoFe i białka Fe oraz lizaty szczepu z delecją nifS i nifU są pozbawione charakterystycznego brązowego koloru (Kennedy i Dean 1992). Z tych obserwacji wynikają dwa wnioski, wprowadzenie tych delecji zaburza syntezę wszystkich centrów żelazo-siarkowych związanych z nitrogenazą, a nie tylko wybranych. Jednocześnie choć aktywność poszczególnych składników nitrogenazy jest mocno obniżona, to jej aktywność nie jest zupełnie zahamowana, co sugeruje istnienie innego systemu dedykowanego do odrębnych funkcji, lecz mogącego pośrednio dostarczać centra żelazo-siarkowe do nitrogenazy. Jak się później okazało te dwa białka stanowią podstawę systemu będącego dedykowanym dla nitrogenazy źródłem centrów 4Fe-4S. Białko NifS jest homodimeryczną desulfurazą cysteinową zależną od fosforanu pirydoksalu (Zheng i wsp., 1993), NifU zaś molekularnym rusztowaniem, na którym syntezowane jest centrum (Yuvaniyama i wsp., 2000). Ponadto ze szczepu z delecją nifS oczyszczono inne białko posiadające aktywność desulfurazy cysteinowej nazwane IscS, posiadające dużą homologię do NifS. Przez odwrotną analizę genetyczną znaleziono lokalizację tego genu w genomie. Znajdował się on w jednostce transkrypcyjnej zawierającej kilka genów, nazwanych po kolei iscR, iscS, iscU, iscA, hscB, hscA, fdx i iscX (Zheng i wsp., 1998).



## Ryc.2 Prokariotyczne systemy biogenezy centrów żelazo-siarkowych

*Porównanie trzech systemów biogenezy FeS w różnych organizmach prokariotycznych. Systemy ISC i SUF są podstawowym źródłem centrów żelazo-siarkowych. Zależnie od gatunku różne organizmy mogą mieć jeden z tych systemów, lecz istnieją też przykłady organizmów, które posiadają oba systemy naraz. Takim przykładem jest bakteria *E.coli*. Wówczas udział poszczególnych systemów w biosyntezie centrów jest taki, że system ISC odpowiada głównie za biogenezę FeS w warunkach optymalnych dla wzrostu komórek, natomiast system SUF w warunkach stresu oksydacyjnego i przy niedoborze żelaza. Trzeci system NIF jest systemem dedykowanym do biosyntezy centrów żelazo-siarkowych na potrzeby kompleksu nitrogenazy w gatunkach asymilujących azot.*

Produkty tych genów tworzą system ISC (ang. *Iron-Sulfur Cluster*), który jest odpowiedzialny za syntezę centrów FeS *de novo* z pojedynczych atomów. Bakterie posiadają trzy systemy biogenezy FeS (Ryc.2). Niemniej w związku z istotną rolą systemu ISC w syntezie *de novo*, stanowi on najlepszy przykład w oparciu o który można scharakteryzować podstawowe procesy zachodzące podczas syntezy FeS, a które generalnie mają podobny przebieg w przypadku innych maszynarii białkowych zaangażowanych w biogenezę centrów FeS. Maszyna ISC znajduje się nie tylko w *A. vinelandii*, lecz także u innych przedstawicieli prokaryota, w tym u *E.coli* (Zheng i wsp., 1998). Jak wyżej wspomniałem, pierwszym oczyszczonym białkiem tego systemu była desulfuraza cysteinowa IscS. Kolejnym białkiem systemu ISC, które zostało zidentyfikowane było białko IscU, które pełni rolę molekularnego rusztowania podczas biogenezy centrów FeS (Smith i wsp., 2001). Funkcja katalityczna IscS jest zależna od obecności w centrum aktywnym fosforanu pirydoksalu (PLP), substratem tego enzymu jest L-cysteina. IscS funkcjonuje jako homodimer. Enzym ten uwalnia siarkę z cysteiny przez białkową grupę tiolową wrażliwą na czynniki alkilujące tiole obecną w centrum aktywnym enzymu. Reszta Cys328 w białku IscS *E.coli* jest silnie konserwowana (Cupp-Vickery i wsp., 2003) i znajduje się na elastycznej pętli (reszty 323-335).



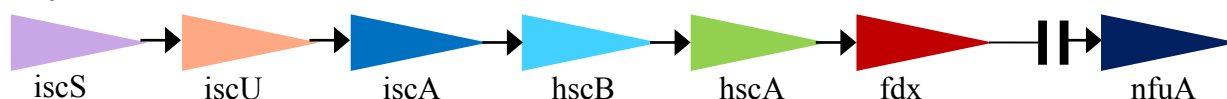
### Ryc.3 Struktura kompleksu IscS-IscU *E. coli*

*Heterotetramer obejmuje dimer desulfurazy cysteinowej IscS oraz związane z nią cząsteczki molekularnego rusztowania IscU. PDB ID: 3LVL*

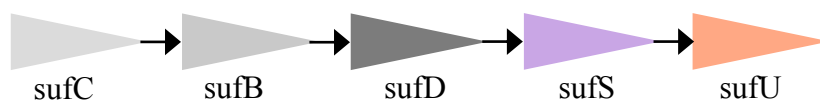
W modelu opracowanym na podstawie krystalografii rentgenowskiej (Ryc.3) kluczowa pętla znajduje się w odległości 17Å od kofaktora PLP i ulega znacznej zmianie konformacyjnej, tak aby w momencie katalizy reszta Cys328 mogła uczestniczyć w nukleofilowym ataku na substrat cysteinowy związany z PLP (Cupp-Vickery i wsp., 2003). Uzyskanym produktem pośrednim jest nadsiarczek związany bezpośrednio z Cys328. Taka forma siarki może następnie zostać dostarczona do białka, które pełni rolę rusztowania gdzie będzie stanowić budulec do utworzenia centrum FeS. Po przekazaniu siarka ma stopień utlenienia  $S^0$ , żeby mogła zostać wbudowana do powstającego centrum FeS musi wprawdzie zostać zredukowana do stopnia  $S^{2-}$ . Do tego procesu niezbędne są elektrony, które są dostarczone przez ferrodoksynę (Fdx) z utleniania cząsteczek NADH (Kakuta i wsp., 2001). Końcowym produktem aktywności systemu ISC są centra żelazo-siarkowe typu 2Fe-2S które następnie przez inne układy mogą zostać przekształcone do bardziej skomplikowanych form.

Trzecim systemem biogenezy centrów żelazo-siarkowych jest system SUF (*ang. Mobilization of SUFur*). Jest obecny w wielu gatunkach bakterii, lecz także występuje w Archaea. Zależnie od gatunku bakterii, system SUF może występować jako główny system biogenezy FeS lub drugorzędny aktywowany w warunkach stresowych (Takahashi i Tokumoto 2002). Białka systemu ISC są mało odporne na stres wywołany niedoborem żelaza i obecnością wolnych rodników. Pod wpływem skomplikowanego układu białek regulatorowych, w warunkach niedoboru żelaza (Outten i wsp., 2004, Yeo i wsp., 2006) i dużego stężenia wolnych rodników (Lee i wsp., 2004) następuje aktywacja ekspresji operonu SUF.

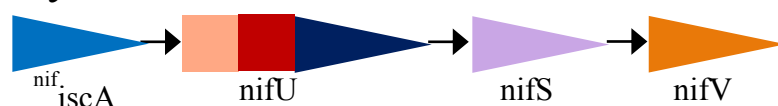
### System ISC *Escherichia coli*



### System SUF *Thermotoga maritima*



### System NIF *Azotobacter vinelandii*



#### Ryc.4 Porównanie trzech systemów biogenezy FeS występujących w Prokaryota

Za biogenezę centrów żelazo-siarkowych *de novo* odpowiadają systemy ISC oraz SUF. System ISC zidentyfikowano między innymi w *Azotobacter vinelandii* i *Escherichia coli*. Z kolei system SUF został zidentyfikowany między innymi w *Escherichia coli* i w termofilnej bakterii *Thermotoga maritima*. Geny *iscS* i *iscU* kodują odpowiednio desulfurazę cysteinową IscS i białko pełniące rolę molekularnego rusztowania IscU. Pozostałe komponenty systemu to gen *fdx* kodujący ferrodoksynę, białko dostarczające elektrony niezbędne w procesie biogenezy. Istotne są też geny kodujące białka opiekuńcze, gen *hscA* kodujący białko z rodziny Hsp70 o nazwie HscA, a także gen *hscB* kodujący białko zawierające domenę J o nazwie HscB. Oba białka opiekuńcze współpracują z IscU w transferze gotowego centrum do białek docelowych. Rola produktu genu *iscA* nie jest poznana. Potencjalnie może pełnić rolę molekularnego rusztowania, na którym w oparciu o nowo utworzone centra 2Fe-2S są składane centra żelazo-siarkowe 4Fe-4S. Białko kodowane przez gen *nfuA* prawdopodobnie jest odpowiedzialne za specyficzne przekazanie gotowego centrum do określonych białek docelowych.

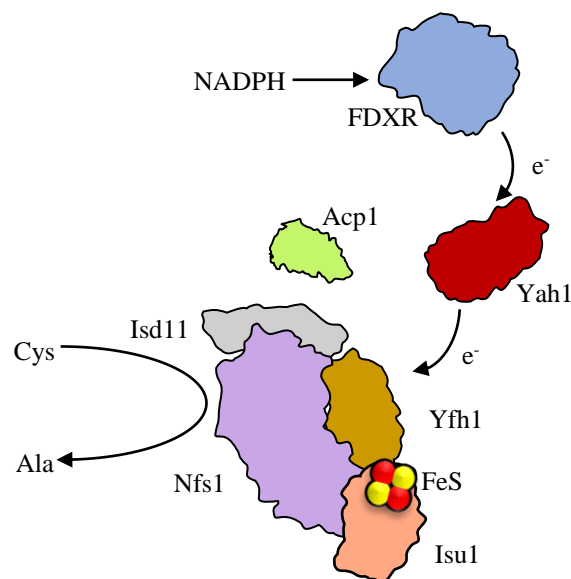
W operonie systemu SUF geny *sufB*, *sufC* i *sufD* kodują białka stanowiące podjednostki molekularnego rusztowania, na którym syntezowane są centra żelazo-siarkowe. Gen *sufS* koduje desulfurazę cysteinową dostarczającą siarkę do procesu biogenezy. Gen *sufU* koduje białko SufU wykazujące pewne podobieństwo do molekularnego rusztowania IscU, ale zamiast być rusztowaniem na którym składane są centra FeS, prawdopodobnie uczestniczy ono w pośrednim przekazywaniu siarki z SufS do kompleksu SufBC<sub>2</sub>D. Zidentyfikowany w *Azotobacter vinelandii* system NIF stanowi maszynę biogenezy, która jest dedykowana produkcji centrów żelazo-siarkowych niezbędnych do funkcjonowania nitrogenazy, enzymu odpowiedzialnego za asymilację azotu cząsteczkowego. Analogicznie do systemu ISC, w przypadku systemu NIF geny *nifS* i *nifU* kodują desulfurazę cysteinową NifS i molekularne rusztowanie NifU. Produkt genu *nifV* pełni rolę w syntezie kofaktora FeMo zawierającego atom molibdenu w swojej strukturze. Podobnie jak w przypadku odpowiednika z systemu ISC, rola produktu genu *iscA* nie jest do końca poznana.

Desulfuraza cysteinowa SufS jest homodimerem homologicznym do IscS (w Ryc.4 tym samym kolorem są oznaczone białka homologiczne) i posiada zbliżony mechanizm działania. Charakteryzuje się mniejszą wydajnością, lecz za to konserwowana cysteina Cys364 znajduje się wewnątrz kieszeni chronionej przez wieczko zmniejszające stopień ekspozycji do rozpuszczalnika. W IscS konserwowana cysteina Cys328 jest na ruchomej pętli ekspozowanej do roztworu. Tak więc prawdopodobnie obecność wieczka chroni przed dostępem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do konserwowanej cysteiny i tym samym zabezpiecza tą resztę przed utlenieniem (Dai i Outten 2012). Dalsze etapy biogenezy FeS różnią się znacząco w przypadku systemu SUF. Zamiast bezpośredniego transferu siarki na typowe rusztowanie jest ona przenoszona na białko SufE i kompleks SufS-SufE dostarcza siarkę do kompleksu

złożonego z białek SufB, SufC i SufD zwanego kompleksem SufBC<sub>2</sub>D (Wollers i wsp., 2010). Do tego kompleksu żelazo jest dostarczane do komponentu SufB dzięki aktywności ATPazowej SufC w obecności SufD. Końcowym produktem, uzyskiwanym w ramach aktywności ścieżki SUF, jest centrum 4Fe-4S.

### 1.3 Mitochondrialny system biogenezy centrów żelazo-siarkowych w *Saccharomyces cerevisiae*

W mitochondriach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* znajduje się system biogenezy centrów żelazo-siarkowych homologiczny do bakteryjnego systemu ISC (Lill i wsp., 2006). Zasadniczy schemat funkcjonowania jest zbliżony do systemu bakteryjnego, niemniej jest wiele detali różniących te systemy i na tych aspektach skoncentruję się opisując model funkcjonowania mitochondrialnej maszyny ISC.



#### **Ryc.5 Biogeneza centrów żelazo-siarkowych w obrębie białka Isu1, pełniącego rolę molekularnego rusztowania.**

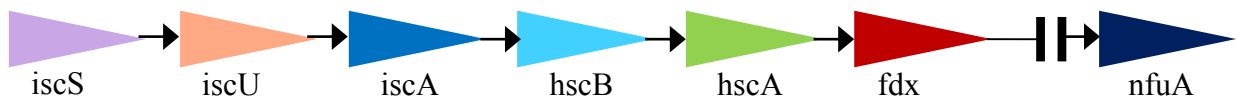
*Białko Nfs1, znajdujące się w kompleksie z Isd11 i ACP katalizuje odłączenie siarki od cysteiny, wiążąc uzyskany atom siarki w obrębie konserwowanej reszty cysteinowej w swojej strukturze. Drożdżowy homolog ludzkiej frataksyny, białko Yfh1, oddziałuje z kompleksem desulfurazy cysteinowej, stymulując jej aktywności w obecności molekularnego rusztowania, białka Isu1. Atom siarki na stopniu utlenienia S<sup>0</sup> jest następnie przekazywany do białka rusztowania - Isu1. Kolejny etap obejmuje redukcję siarki S<sup>0</sup> do S<sup>2-</sup>. W tym procesie uczestniczy układ przenoszenia elektronów składający się z ferrodoksy Yah1 oraz reduktazy ferrodoksy Arh1. Źródłem elektronów są cząsteczki NADPH. Z kolei pytaniem, na które do tej pory nie ma jasnej odpowiedzi, jest co stanowi w komórce rezerwar żelaza niezbędnego podczas biogenezy centrów FeS. Redukcja siarki następuje gdy w cząsteczce Isu1 wcześniej już został przyłączony atom żelaza. Dopiero po etapie redukcji następuje synteza centrum 2Fe-2S.*

Podobnie jak w systemie bakteryjnym, desulfuraza cysteinowa Nfs1 jest funkcjonalna jako dimer (Dutkiewicz i wsp., 2017). PLP-zależna desulfuraza cysteinową Nfs1 pozyskuje siarkę z wykorzystaniem L-cysteiny jako substratu. Zasadnicza różnica między enzymem eukariotycznym, a bakteryjnym jest taka, że drożdżowa desulfuraza wymaga obecności białek

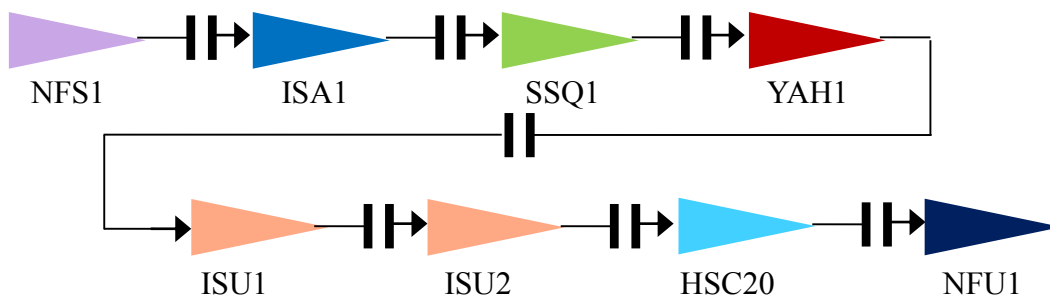


pomocniczych Isd11 i Acp1 (*ang. acyl carrier protein*). Rolą białka Isd11 jest stabilizacja Nfs1 i regulacja jego aktywności enzymatycznej (Dutkiewicz i wsp., 2017). Do tej pory nie zidentyfikowano u bakterii białka homologicznego do białka Isd11 (Lill i wsp., 2006). Białko Isd11, ze względu na obecność motywu leucyny, tyrozyny i argininy, należy do rodziny białek LYRM i jest daleko spokrewnione z innymi białkami LYRM, które między innymi uczestniczą w syntezie mitochondrialnych kwasów tłuszczowych w kompleksie z białkami z rodziny ACP (Boniecki i wsp., 2017). Białko Acp1 oddziałuje z Isd11 dzięki łańcuchowi kwasu tłuszczowego wchodzącego w interakcję z motywem LYRM. Z kolei Acp1 nie oddziałuje bezpośrednio z Nfs1. Jedną z hipotez badawczych zakłada, że gdy panują niekorzystne energetycznie warunki w komórce niedobór acetylo-koenzymu A skutkuje zbyt krótkimi łańcuchami kwasu tłuszczowego związanymi z Acp1 co zmniejsza powinowactwo do Isd11. Następnie powoduje to dysocjację Isd11 od Nfs1 prowadząc do destabilizacji desulfurazy cysteinowej, zatrzymując biogenezę centrów FeS.

### *Escherichia coli*



### *Saccharomyces cerevisiae*

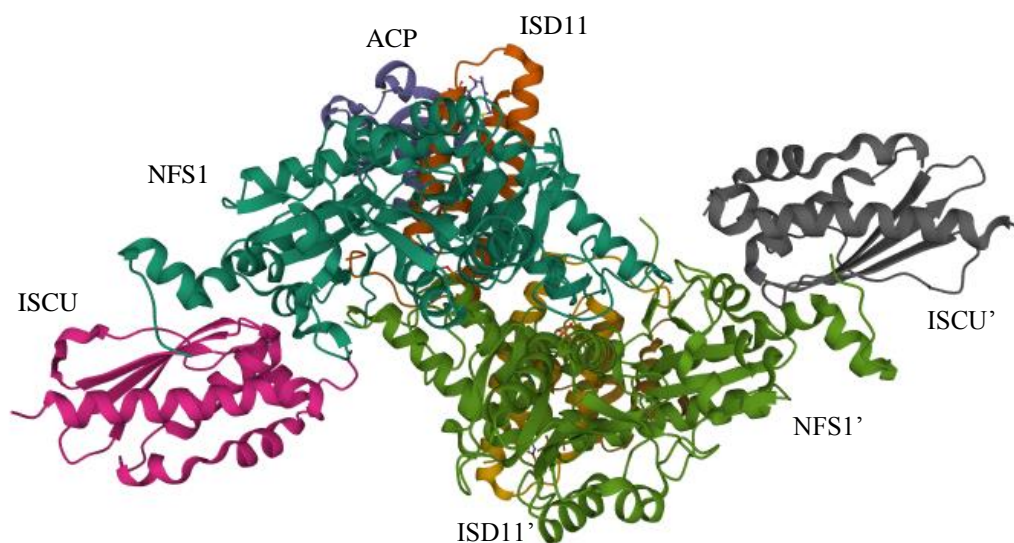


**Ryc.6 Porównanie homologicznych genów eukariotycznych do prokariotycznych obecnych w systemie ISC**

*Drożdżowe geny są bezpośrednio spokrewnione z bakteryjnymi. Tym samym kolorem zaznaczone są geny kodujące produkty pełniące analogiczne funkcje w komórce. Odpowiednikiem bakteryjnego genu iscS u Saccharomyces cerevisiae jest gen NFS1 (kolor jasno fioletowy). Natomiast bakteryjny gen kodujący molekularne rusztowanie IscU ma dwa odpowiedniki eukariotyczne - ISU1 i ISU2 (kolor lososiowy). Gen kodujący bakteryjne białko zawierające domenę J o nazwie HscB jest bezpośrednio spokrewniony z genem HSC20 (kolor jasno niebieski), zaś ferrodoksyna Fdx jest spokrewniona z Yah1 (kolor czerwony). Istotna różnica dotyczy jedynie genów kodujących białka Hsp70 (kolor zielony). Zarówno bakteryjny i drożdżowy system ISC wymagają białek Hsp70, to drożdżowy odpowiednik kodujący białko Ssq1 wywodzi się od genu kodującego białko DnaK, nie jest zaś ortologiem HscA.*



Analizy dotyczące mitochondrialnego systemu ISC wykazały, że ma miejsce ścisła współpraca desulfurazy cysteinowej Nfs1 z molekularnym rusztowaniem (Ryc.5). Ponadto trzeba podkreślić, że istnieje silna konserwacja molekularnego rusztowania między Prokaryota, a Eukaryota (Mühlenhoff i wsp., 2003). Warto jednak dodać, że drożdże *S. cerevisiae* posiadają dwie kopie molekularnego rusztowania (Garland i wsp., 1999). Zostały nazwane odpowiednio Isu1 i Isu2 (Ryc.6) Identyczność aminokwasowa między tymi dwoma białkami wynosi 83%. Funkcjonalnie obie kopie są redundantne, lecz endogenny poziom ekspresji Isu1 jest siedem razy wyższy niż Isu2. W związku z tym, że w szczepach typu dzikiego białko Isu1 dominuje, tak więc wszelkie kolejne opisy biogenezy centrów żelazo-siarkowych będą opisane w odniesieniu do tego białka.



### Ryc.7 Struktura ludzkiego kompleksu NFS1-ISC11-ACP-ISCU

*Kompleks biogenezy FeS obejmujący ludzkie białka systemu ISC. Lewy fragment kompleksu zawiera białko molekularne rusztowanie ISC11, homolog Isu1, które zostało narysowane kolorem różowym, natomiast desulfuraza cysteinowa NFS1 jest oznaczona kolorem seledynowym, granatowym ACP, a pomarańczowym ISC11. PDB ID: 5WLW*

Strukturalnie kieszeń wiążąca PLP jest uformowana ze struktur dwóch cząsteczek białka Nfs1, stąd wnioskuje się, że aktywność posiada jedynie dimer desulfurazy. Pozostałe białka również występują w ilości dwóch cząsteczek przypadających na jeden kompleks (Ryc.7), dotyczy to również molekularnego rusztowania, białka Isu1 (Boniecki i wsp., 2017). Warto tu zaznaczyć, że w odróżnieniu od Nfs1, dwie cząsteczki molekularnego rusztowania nie pozostają w bezpośrednim ciągłym kontakcie, następuje on przejściowo w ramach zmian konformacyjnych całego kompleksu. Mechanizm reakcji desulfuryzacji opiera się na roli kofaktora PLP. PLP, działa jako grupa wycofująca elektrony, co prowadzi do eliminacji siarki z cząsteczki cysteiny. Kofaktor PLP jest związany z enzymem przez wiązanie iminowe z łańcuchem bocznym lizyny. Grupa aminowa substratowej cysteiny wiąże się do PLP w wyniku wymiany z grupą aminową lizyny. Ten aldiminowy intermediet cysteiny i PLP następnie ulega konwersji do iminy, w której utworzone zostaje podwójne wiązanie między węglem  $\alpha$  cysteiny, a jej grupą aminową. Równocześnie grupa tiolowa katalitycznej cysteiny enzymu ulega deprotonacji w wyniku oddziaływania z zasadą. Powstały anion tiolanowy reaguje z grupą tiolową cysteiny substratowej w postaci iminy i w taki sposób katalityczna

cysteina przyjmuje dodatkowy atom siarki w postaci nadsiarczku (-SSH), zaś między węglem  $\alpha$  i  $\beta$  substratu tworzy się wiązanie podwójne. Związany z PLP produkt reakcji następnie ulega protonacji, co prowadzi do powstania intermediatu w postaci iminy, który szybko ulega przekształceniu w aldehydowy intermediat alaniny. Alanina ulega uwolnieniu, kiedy następuje ponowna wymiana na lizynę.

We wczesnych badaniach nad transferem nadsiarczku z desulfurazy cysteinowej do molekularnego rusztowania rozważane były dwa modele transferu. W pierwszym modelu transfer zachodził niezależnie od obecności jonu  $\text{Fe}^{2+}$  koordynowanego przez molekularne rusztowanie, a w drugim modelu transfer zachodził dopiero, gdy uprzednio taki jon został już związany. W najnowszych badaniach z wykorzystaniem spektrometrii masowej zaobserwowano, że w przypadku mysiego molekularnego rusztowania ISCU nadsiarczek jest przekazywany na cysteinę 104 w obecności koordynowanego jonu  $\text{Fe}^{2+}$ . W przypadku braku koordynowanego metalu transfer nie zachodzi (Srouf i wsp., 2020). W modelu drożdżowym homologiczną resztą będącą akceptorem siarki jest cysteina 139 (Ranatunga i wsp., 2016). Transfer nadsiarczku z desulfurazy cysteinowej do molekularnego rusztowania zaobserwowano także gdy koordynowany był jon  $\text{Zn}^{2+}$ .

Obserwacja, że transfer ma miejsce w sytuacji koordynowania jonu  $\text{Zn}^{2+}$  przez molekularne rusztowanie okazała się być kluczowa. Według ostatnich doniesień literaturowych przed rozpoczęciem syntezy centrum żelazo-siarkowego, molekularne rusztowanie - białko Isu1 w formie apo koordynuje jon  $\text{Zn}^{2+}$  w miejscu, w którym ma miejsce składanie centrum FeS. W pierwszej kolejności jon  $\text{Zn}^{2+}$  jest zastępowany jonem  $\text{Fe}^{2+}$  pozyskanym ze swobodnej puli żelaza obecnej w mitochondrium (Srouf i wsp., 2020). Izolowane z mitochondriów kompleksy żelaza o niskiej masie molekularnej w zakresie 500-1300kDa są najbardziej prawdopodobną formą występowania swobodnej puli żelaza. Nie jest do końca jasne jak żelazo jest transportowane z takich kompleksów do białka Isu1. Dodatkowo autorzy sugerują, że w wyniku oddziaływania Isu1 z desulfurazą cysteinową Nfs1 następuje zmiana konformacji ułatwiająca wymianę jonów koordynowanych przez Isu1. Eksperyment, który wprost wykazał istotną rolę desulfurazy cysteinowej podczas biosyntezy centrów FeS, przeprowadzono w oparciu o szczep drożdży, który zawierał gen kodujący białko Nfs1 wprowadzony pod kontrolę promotora galaktozowego, w związku z tym w trakcie hodowli na podłożu zawierającym galaktozę białko Nfs1 było efektywnie produkowane w komórce, natomiast kiedy hodowle prowadzono na podłożu z glukozą, miało miejsce zahamowanie ekspresji genu NFS1. Taki szczep został transformowany plazmidami zawierającymi geny kodujące białko Isu1 i białko Yah1 (wykorzystywane tutaj jako modelowe białko będące docelowym odbiorcą centrów FeS). Następnie uzyskany szczep drożdżowy hodowano w obecności radioaktywnego żelaza  $^{55}\text{Fe}$  w celu wyznaczenia nowo syntezowanych centrów FeS w obrębie białek Isu1 i Yah1. W hodowli, w której miała miejsce ekspresja genu NFS1 radioaktywne żelazo było specyficznie związane z białkami Isu1 i Yah1. W hodowli, w której ekspresja białka Nfs1 była zahamowana, żelazo nie było wcielane do białek Isu1 i Yah1 mimo, że polipeptydy Isu1 i Yah1 były obecne. Ten wynik jednoznacznie wskazywał na zależność wiązania żelaza w obrębie molekularnego rusztowania Isu1 oraz docelowego akceptora Yah1 od obecności funkcjonalnego białka Nfs1 (Mühlenhoff i wsp., 2003). Gdyby wymiana koordynowanych przez Isu1 jonów następowała niezależnie od obecności Nfs1, wówczas powinien być obserwowany radioaktywny sygnał  $^{55}\text{Fe}^+$  obecny w strukturze Isu1.

Kolejnym kluczowym elementem mitochondrialnego systemu ISC jest frataksyna Yfh1. Uważa się, że jest to białko, które pełni rolę regulatora aktywności desulfurazy cysteinowej (Gakh i wsp., 2010, Tsai i Barondeau 2010). Z drugiej strony badania dotyczące bakteryjnego odpowiednika frataksyny, białka CyaY, wykazały że jest ono zdolne wiązać żelazo i zależnie od stężenia żelaza w komórce może wpływać na przebieg syntezy centrów żelazo-siarkowych (Adinolfi i wsp., 2009). W związku z tym istniały hipotezy, które zakładały, że frataksyna może pełnić rolę donora żelaza do syntezy centrów żelazo-siarkowych (Yoon i Cowan 2003). Wniosek ten został postawiony na podstawie obserwacji, że komórki z deficytem frataksyny akumulowały żelazo w mitochondriach i zdolności frataksyny do oligomeryzacji po związaniu jonów  $Fe^{2+}$ . Jednakże szereg późniejszych badań sugeruje możliwość, że mógł to być fałszywy wniosek. Po pierwsze ludzka frataksyna FXN oligomeryzuje tylko w ekstremalnych warunkach i oligomeryzacja nie jest wymagana do pełnienia przez frataksynę funkcji. W badaniach nad systemem drożdżowym zaobserwowano wiązanie się żelaza do frataksyny Yfh1, aczkolwiek wprowadzenie mutacji uniemożliwiających wiązanie żelaza, nie wpłynęło negatywnie na funkcjonowanie takiego mutantu w warunkach *in vivo* (Aloria i wsp., 2004). Obserwowana akumulacja żelaza w mitochondriach przy deficycie frataksyny nie jest bezpośrednio spowodowana zbyt małymi jej ilościami, lecz w wyniku pośredniego mechanizmu niedoboru centrów żelazo-siarkowych. Niedobór FeS ma wpływ na czynniki transkrypcyjne Aft1-Aft2 kontrolujące regulon żelaza u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Te czynniki są regulowane obecnością centrów żelazo-siarkowych, brak centrów FeS powoduje, że te czynniki uruchamiają maszynię odpowiedzialną za import żelaza do mitochondriów (Braymer i wsp., 2021). Tych kilka obserwacji wyklucza rolę frataksyny jako donora żelaza (Srouf i wsp., 2020). Dotychczasowa literatura dyskutuje trzy różne modele oddziaływania frataksyny z pozostałymi komponentami maszyni ISC. Badania nad systemem bakteryjnym z wykorzystaniem interferometrii biowarstwy (*ang. Biolayer Interferometry*) sugerują, że frataksyna CyaY konkuruje z ferrodoksyną Fdx o miejsce oddziaływania znajdujące się w obrębie desulfurazy cysteinowej IscS i jest niezależne od miejsca wiązania molekularnego rusztowania IscU (Yan i wsp., 2013). Z kolei analiza NMR i cross-linking białek bakteryjnych wskazuje na sytuację, w której ferrodoksyna oddziałuje bezpośrednio z desulfurazą cysteinową IscS i konkuruje o miejsce wiązania w obrębie desulfurazy IscS jednocześnie z frataksyną CyaY i molekularnym rusztowaniem IscU. Dalszy przebieg zależy od tego, który z dwóch pozostałych konkurentów zastąpi ferrodoksynę. Gdy desulfuraza cysteinowa wiąże się z molekularnym rusztowaniem, to synteza centrów żelazo-siarkowych przebiega dalej. Gdy desulfuraza cysteinowa wiąże się z bakteryjną frataksyną to następuje inhibicja syntezy FeS (Kim i wsp., 2013). Niemniej ten wynik stoi w sprzeczności z powszechnie przyjętym modelem, który zakłada, że redukcja siarki z  $S^0$  do  $S^{2-}$  następuje, gdy jest już związana z molekularnym rusztowaniem. Tak więc model konkurencji z molekularnym rusztowaniem IscU o wiązanie do desulfurazy cysteinowej sugerowałby, że redukcja siarki następuje wcześniej, gdy jest jeszcze związana z desulfurazą IscS. Z kolei doświadczenia biochemiczne z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego dotyczące mechanizmu syntezy centrum w obrębie eukariotycznego białka Isu1 sugerują powstawanie kompleksu obejmującego Yah1:Isu1:Nfs1(Isd11):Yfh1, w którym ferrodoksyna i frataksyna wiąże się jednocześnie z kompleksem Nfs1(Isd11):Isu1 (Webert i wsp., 2014). Z drugiej strony najnowsze badania dotyczące drożdżowych białek, wykonane z użyciem interferometrii biowarstwy (BLI), sugerują, że dochodzi do konkurencji między białkami Yfh1 i Yah1 o wspólne miejsce wiązania do Nfs1(Isd11) znajdującego się w kompleksie z Isu1 (Uzarska i wsp., 2022).

Aktualnie wiodąca hipoteza zakłada, że prawdopodobnie frataksyna pełni rolę regulatorową, lecz w systemach eukariotycznych i prokariotycznych sposób regulacji jest odmienny. Bakteryjna frataksyna CyaY obniża przetwarzanie cysteiny w alaninę, w szczególności w obecności żelaza, tym samym negatywnie wpływając na syntezę centrów żelazo-siarkowych (Adinolfi i wsp., 2009). Eukariotyczna frataksyna zaś stymuluje aktywność desulfurazy cysteinowej białka Nfs1. Stymulacja jest obserwowana tylko gdy jednocześnie jest też obecne molekularne rusztowanie. Efekt stymulacji przez frataksynę wynika prawdopodobnie z faktu, że przyłączając się do kompleksu, modyfikuje ułożenie przestrzenne struktury molekularnego rusztowania, ułatwiając transfer nadsiarczku z desulfurazy cysteinowej do rusztowania. Przyspieszając transfer, szybciej jest także uwalniana katalityczna cysteina desulfurazy cysteinowej, a zatem szybciej może rozpocząć kolejny cykl reakcji. W doświadczenia *in vitro* zaobserwowano także, że frataksyna przyspiesza redukcję nadsiarczku związanego z desulfurazą cysteinową. Te doświadczenia jednak były prowadzone w obecności нефizjologicznych tioli takich jak DTT, więc prawdopodobnie ten mechanizm stymulacji nie ma znaczenia fizjologicznego, zwłaszcza w kontekście dowodów pokazujących, że fizjologiczna redukcja nadsiarczku zachodzi po transferze do molekularnego rusztowania. Ścisłe oddziaływanie frataksyny z molekularnym rusztowaniem w organizmach eukariotycznych ma głębokie korzenie w przebiegu ewolucji tych organizmów. U *E. coli* delecja frataksyny nie wywołuje zauważalnych efektów fenotypowych, a wiele gatunków bakterii w ogóle nie posiada genu frataksyny. Tymczasem delecja genu frataksyny u zwierząt jest letalna, a u drożdży wywołuje poważne efekty fenotypowe w tym spowolniony wzrost, wrażliwość na utleniacze, deficyt hemu i centrów żelazo-siarkowych. Tak więc frataksyna w pewnym momencie nabrała kluczowej roli, aczkolwiek zwiększenie istotności frataksyny nie jest efektem różnic między frataksynami z różnych organizmów, lecz może być efektem pojedynczej mutacji w obrębie przodka molekularnego rusztowania, która to całkowicie uzależniła molekularne rusztowanie od frataksyny. Przodek ten prawdopodobnie posiadał molekularne rusztowanie z metioniną w kieszeni wiążącej centrum FeS i ta wersja molekularnego rusztowania została oddziedziczona przez wszystkie Eukarionty (z wyjątkiem tych które później zastąpiły je bakteryjnym uzyskanym w wyniku horyzontalnego transferu genów). W drożdżowym białku Isu1 ta metionina znajduje się w pozycji 141. Jest to pozycja blisko silnie konserwowanego motywu PVK zajmującego pozycje 134, 135 i 136. Motyw ten jest bardzo ważny w oddziaływaniu Isu1 z pozostałymi komponentami maszyny biogenezy. Konsekwentnie w analizie filogenetycznej metionina występuje prawie wyłącznie u Eukariontów i jedynymi prokariotycznymi wyjątkami są wewnątrzkomórkowe pasożyty z rodziny Rickettsia, blisko spokrewnione z przodkiem mitochondriów. Bez wyjątku organizmy zawierające molekularne rusztowanie z metioniną odziedziczyły też frataksynę. Pozostałe organizmy posiadające molekularne rusztowania funkcjonalnie niezależne od frataksyny mają w homologicznej pozycji izoleucynę, leucynę, walinę lub cysteinę. Prócz Prokariontów oraz Eukariontów u których nastąpił horyzontalny transfer genów z bakterii, są też przypadki organizmów eukariotycznych mających dwie kopie genu kodującego molekularne rusztowanie, które w jednej z tych kopii mają inny aminokwas niż metionina. Niezmiennie jednak w takich sytuacjach druga kopia metioninę zawiera. Aby potwierdzić kluczową rolę metioniny przeprowadzono eksperyment, w ramach którego w drożdżowym białku Isu1 wprowadzono substytucję M141/I i sprawdzono zachowanie drożdży *in vivo* z delecją genu kodującego frataksynę. Szczep z taką mutacją w obrębie Isu1 i brakiem frataksyny wykazywał prawidłowy wzrost porównywalny do szczepu typu dzikiego. Podobnie zachowywał się

szczep drożdży w którym endogenne molekularne rusztowania zastąpiono IscU z *E. coli*, białkiem mającym w wersji dzikiej izoleucynę w homologicznej pozycji. Oba te przykłady pokazują, że zamiana metioniny na inny aminokwas uniezależnia organizm od frataksyny. Silna konserwacja metioniny w eukariotycznych homologach molekularnego rusztowania sugeruje istnienie dodatkowych korzyści w utrzymaniu ścisłego związku z frataksyną (Yoon i wsp., 2015).

Badania nad białkami bakteryjnymi pokazały, że kolejnym krokiem po przekazaniu siarki do molekularnego rusztowania jest jej redukcja. W przypadku systemu drożdżowego w proces ten jest zaangażowany system przekazywania elektronów złożony z ferrodoksyny Yah1 i jej reduktazy Arh1. W obrębie drożdżowego białka Yah1 znajduje się centrum 2Fe-2S które jest bezpośrednio zaangażowane w transport elektronów niezbędnych do redukcji siarki podczas syntezy FeS. Żeby móc przekazać elektrony do białka Isu1 związanego z siarką, ferrodoksyna sama musi zostać wcześniej zredukowana. Za jej redukcję odpowiada białko Arh1 będące reduktazą ferrodoksyny, pozyskującą elektrony z NADPH (Webert i wsp., 2014). Zaobserwowano, że redukcja siarki przez ferrodoksynę zachodzi tylko w obecności żelaza związanego z białkiem Isu1. W tym przypadku cynk nie jest w stanie zastąpić żelaza. W celu redukcji siarki ze stopnia utlenienia  $S^0$  do  $S^{2-}$  konieczne jest pozyskanie dwóch elektronów. Nowa hipoteza zakłada, że ferrodoksyna dostarcza tylko jeden z wymaganych elektronów, a donorem drugiego jest atom żelaza koordynowany wewnątrz struktury Isu1. W wyniku miareczkowania zaobserwowano, że w pojedynczym cyklu reakcyjnym dochodzi do redukcji przez ferrodoksynę tylko pojedynczej siarki w monomerze Isu1, zatem prawdopodobnym intermedyatem biogenezy FeS jest mononuklearny siarczek żelaza 1Fe-1S (Srouf i wsp., 2020).

Struktura przestrzenna kompleksu białek zaangażowanych w syntezę centrów FeS sugeruje, że dwie cząsteczki Isu1 nie pozostają w stałym kontakcie. Niemniej prawdopodobnie taki kompleks powinien charakteryzować się dużą plastycznością konformacyjną, co z kolei powinno umożliwić przejściowe oddziaływanie dwóch cząsteczek Isu1 ze sobą. Wyniki natywnej spektroskopii masowej i spektroskopii Mössbauera wskazują, że monomer Isu1 wiąże centrum 2Fe-2S. Na podstawie tej obserwacji można przedstawić teoretyczny mechanizm składania centrum 2Fe-2S. W kompleksie z desulfurazą cysteinową obie cząsteczki Isu1 zawierają intermedyaty 1Fe-1S. W ramach swobody konformacyjnej dwie cząsteczki Isu1 nawiązują bezpośredni kontakt, wówczas intermedyaty 1Fe-1S z obu cząsteczek łączą się w jedno centrum 2Fe-2S i po przejściowym momencie koordynacji tego centrum przez obie cząsteczki Isu1, ostatecznie centrum wiąże się tylko z jedną z nich. W ten sposób synteza 2Fe-2S zostaje zakończona i może nastąpić etap transferu (Srouf i wsp., 2020).

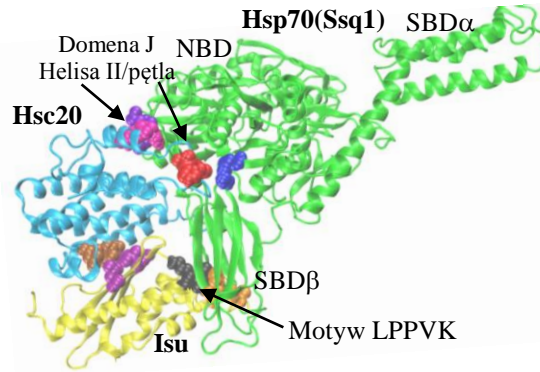
Funkcjonowanie systemu syntezy FeS jest zależne od warunków środowiskowych. W warunkach optymalnych synteza FeS jest promowana nie tylko dzięki mechanizmowi stabilizacji Nfs1 przez Isd11 i Acp1. Kolejnym mechanizmem regulacyjnym jest udział Nfs1(Isd11) w ochronie Isu1 przed degradacją przez proteazę Pim1 poprzez bezpośrednie oddziaływanie z molekularnym rusztowaniem. Drożdżowa proteaza Pim1 jest spokrewniona z bakteryjną proteazą Lon. Ilość cząsteczek białka Isu1 w mitochondriach jest różna zależnie od panujących warunków i w związku z tym podlega regulacji posttranslacyjnej. W fazie stacjonarnej nadekspresja genu *ISU1* ma korzystny wpływ na przeżywalność. Jednakże w warunkach dużego ograniczenia dostępności żelaza nadprodukcja Isu1 wywołuje

spowolniony wzrost i jednocześnie obserwowaną obniżoną aktywność reduktazy żelaza (III), enzymu zależnego od hemu. Degradacja Isu1 przez Pim1 miała na celu ograniczenie wykorzystania zasobów, które są bardziej potrzebne do innych funkcji komórkowych, choćby do biosyntezy hemu. Jednakże o ile w warunkach nadmiaru Isu1 wysoki poziom degradacji jest korzystny, to zachowanie tego wysokiego poziomu degradacji w warunkach normalnej ekspresji Isu1 może zaburzyć prawidłowe funkcjonowanie systemu biogenezy FeS. Z punktu widzenia komórki w optymalnych warunkach wzrostu kluczowa jest odpowiednia regulacja procesu degradacji Isu1 przez proteazę Pim1, tak aby ilość Isu1 pozwalała na prawidłowe funkcjonowanie szlaku biogenezy centrów FeS. Jednym z czynników kontrolujących poziom Isu1 jest kompleks desulfurazy cysteinowej. Kiedy Nfs1(Isd11) oddziałuje bezpośrednio z Isu1, proteaza Pim1 nie jest w stanie degradować Isu1. Jednocześnie w optymalnych warunkach wzrostu ilość kopii kompleksu Nfs1(Isd11) jest wystarczająco duża do skutecznej ochrony większości puli Isu1. Co ciekawe wystarczy sam fakt oddziaływania pomiędzy desulfurazą cysteinową i Isu1, aby miała miejsce ochrona. Mutant Nfs1 z obniżoną aktywnością desulfurazy cysteinowej, który nie wykazuje zaburzonego oddziaływania z molekularnym rusztowaniem, tak samo chronił Isu1 przed degradacją, jak białko typu dzikiego (Song i wsp., 2012).

## 1.4 Białka opiekuńcze systemu Hsp70 zaangażowane w biogenezę centrów FeS

Kolejnym etapem po syntezie FeS w obrębie molekularnego rusztowania Isu1, jest jego transfer do białek docelowych. W proces ten zaangażowane są białka Hsp70 należące do klasy powszechnych białek opiekuńczych (*ang. molecular chaperones*). W warunkach *in vivo* obecność tych białek jest niezbędna, żeby transfer FeS miał miejsce (Vickery i Cupp-Vickery 2007). Białka należące do systemu białek Hsp70 są zaangażowane nie tylko w proces biogenezy centrów FeS, ale możemy tu wyróżnić białka, które uczestniczą w wielu kluczowych procesach niezbędnych dla funkcjonowania komórki. Wśród tych procesów można wymienić fałdowanie białek, regulacja oddziaływania między różnymi białkami przez zmianę ich konformacji, transport przez błony organelli, w tym mitochondriów. W przypadku fałdowania należy podkreślić, że prócz udziału w zwijaniu nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych opuszczających rybosomy, białka systemu Hsp70 są także zaangażowane w ochronę białek, które uległy rozfałdowaniu pod wpływem stresu. W kooperacji z innymi systemami opiekuńczymi, takimi jak system dezagregazy Hsp104, mogą przywrócić białku właściwą konformację lub gdy jest to niemożliwe, to nadać agregatom formę łatwiejszą do degradacji. Mimo różnorodności funkcji podstawą działania jest cykliczne wiązanie się do wyeksponowanych fragmentów hydrofobowych przez zmianę konformacji napędzaną hydrolizą ATP. Zrozumienie mechanizmu działania wymaga spojrzenia na strukturę białka Hsp70, które stanowi główny komponent systemu Hsp70. Nazwa Hsp70 oznacza *Heat Shock Protein*, a liczba 70 oznacza przybliżoną masę w kDa. Białko Hsp70 składa się z N-terminalnej domeny ATPazowej (w skrócie NBD od *Nucleotide Binding Domain*) o masie ~44kDa mającej dwie bruzdy z głęboką kieszenią do której wiąże się ATP oraz C-terminalnej domeny o masie ~26kDa wiążącej substrat (w skrócie SBD od *Substrate Binding Domain*). Miejsce wiązania substratu znajduje się wewnątrz struktury  $\beta$ -kartki (fragment SBD- $\beta$ ), natomiast dostęp do kieszeni wiążącej substrat zamyka  $\alpha$ -helikalne wieczko (fragment SBD- $\alpha$ ), które zakrywa substrat w określonych stanach konformacyjnych (Kampinga i Craig 2010). Obie domeny N- i C-końcowa są połączone elastycznym łącznikiem. W stanie związanym z

ATP substrat może bardzo szybko się związać, lecz siła wiązania jest niska zatem równie szybko oddysocjowuje. Konformacyjnie obie domeny ściśle przylegają do siebie, a wieczko jest otwarte. Gdy w trakcie wiązania substratu nastąpi hydroliza ATP do ADP, domeny wcześniej zwarto połączone ulegają rozłączeniu, wieczko ulega zamknięciu, a powinowactwo Hsp70 do substratu znacznie wzrasta, drastycznie obniżając tempo wymiany (Mayer 2013).



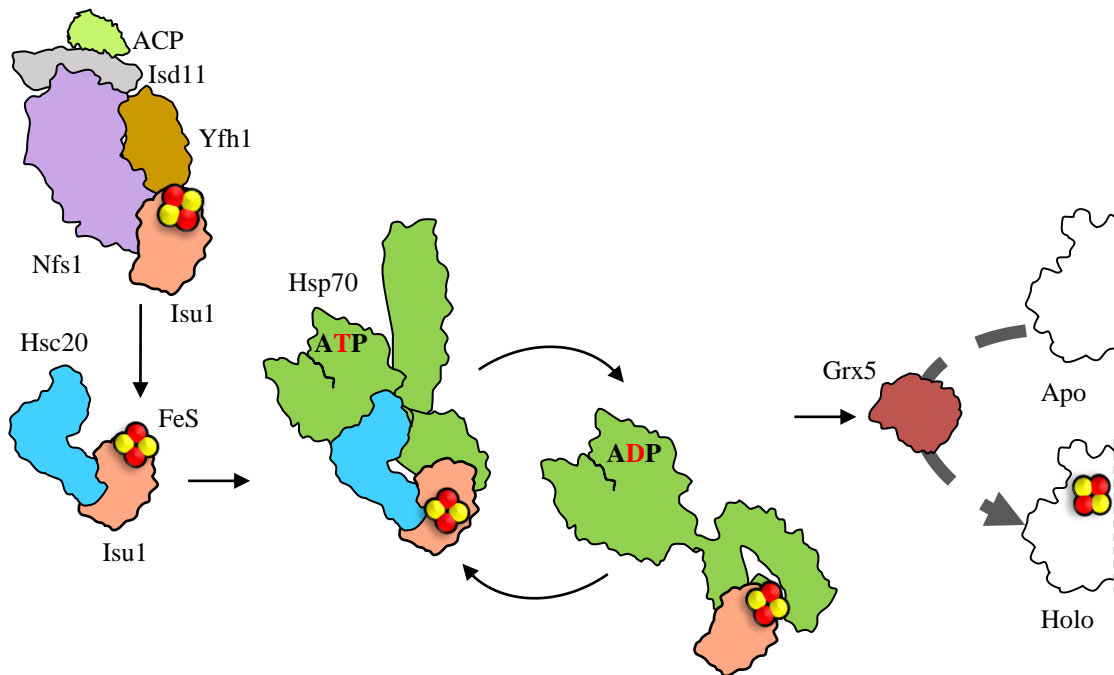
### Ryc.8 Komplex Ssq1:Hsc20:Isu1

Model kompleksu potrójnego z zaznaczonymi resztami aminokwasowymi istotnymi w oddziaływaniu między białkami. Reszty domeny J białka Hsc20 oddziałują z resztami aminokwasowymi w obrębie domeny N (NBD, ang. nucleotide binding domain) oraz domeny wiążącej substrat (SBDβ, ang. substrate binding domain) białka Ssq1. Motyw PVK białka Isu1 wchodzi w bruzdę SBDβ.

W tym cyklicznym procesie białka Hsp70 nie uczestniczą same. Prawie zawsze współpracują z białkami pomocniczymi, w tym czynnikami wymiany nukleotydów (ang. *Nucleotide Exchange Factor*, NEF) oraz białkami opiekuńczymi zawierającymi domenę J jak na przykład Hsc20 (Ryc.8). Białka Hsp70 wykazują wysokie powinowactwo do nukleotydów adeninowych. Z tego powodu potrzebny jest czynnik wymiany nukleotydów do przeprowadzenia dysocjacji ADP. Jako, że stężenie ATP zazwyczaj jest większe to taki nukleotyd wiąże się z białkiem Hsp70, ponownie zmieniając konformację i doprowadzając do uwolnienia substratu (Mayer 2013).

Z kolei białka zawierające domenę J odpowiadają za specyficzność wiązania do wybranych substratów. Istnieje wiele klas znacznie się różniących, lecz wspólną ich cechą jest obecność domeny J (Kampinga i Craig 2010). Jest to kompaktowa domena o dwuskrętnej strukturze złożonej z czterech antyrównoległych  $\alpha$ -helis. Dwie z nich, nazwane odpowiednio helisą drugą i trzecią są połączone elastyczną pętlą z zawsze konserwowanym motywem HPD, niezbędnym do interakcji z Hsp70. Domena J bezpośrednio oddziałuje z domeną ATPazową Hsp70 i w ten sposób stymuluje aktywność ATPazową białka Hsp70, którego aktywność podstawowa jest bardzo niska. W ten sposób białka zawierające domenę J regulują aktywność ATPazową tylko wtedy, kiedy jest to wymagane. Warto dodać, że stymulacja aktywności ATPazowej jest bardzo często kooperacją białka zawierającego domenę J oraz substratu. Białko zawierające domenę J wiąże się do NBD białka Hsp70 w stanie otwartej konformacji, gdy NBD i SBD są sprzężone i wpływa na strukturę NBD. Jednocześnie substrat także wpływa na strukturę NBD i sumaryczny efekt obu wpływów zmienia konformację NBD na najbardziej optymalną do hydrolizy ATP (Ryc.9).



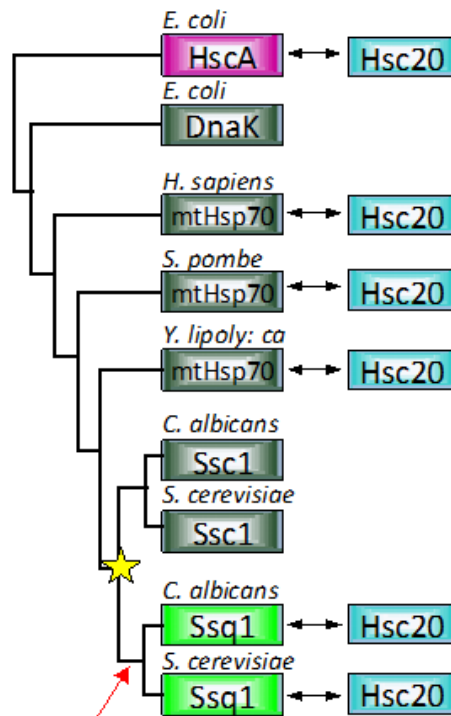


**Ryc.9 Białka opiekuńcze systemu Hsp70 uczestniczą w transferze centrum żelazo-siarkowego z białka Isu1 do białek docelowych**

Białko Isu1 ze zrekonstruowanym centrum żelazo-siarkowym będąc związane z desulfurazą cysteinową Nfs1 jest rozpoznawane przez białko Hsc20. Oddziaływanie z Hsc20 powoduje oddysocjowanie Isu1 z kompleksu z desulfurazą cysteinową. Następnie białko Hsc20 specyficznie ukierunkowuje białko Isu1 do wiązania przez białko Hsp70. Kompleks podwójny Hsc20:Isu1 stymuluje aktywność ATPazową białka Hsp70. Białko Hsp70 związane z ADP przyjmuje konformację pozwalającą na stabilne wiązanie z Isu1. Kolejny etap cyklu ATPazowego białka Hsp70 wymaga wymiany cząsteczki ADP na ATP przez czynnik wymiany nukleotydów, co prowadzi do takiej zmiany konformacji białka Isu1, która prowadzi do dysocjacji centrum żelazo-siarkowego. Na kolejnym etapie uwolnione centrum FeS jest wiązane przez glutaredoksynę (Grx5) która jest wymagana do dalszego transferu FeS do białek docelowych.

Ewolucja białek z rodziny Hsp70 miała dość skomplikowany przebieg. Głównym wielofunkcyjnym bakteryjnym białkiem Hsp70 jest DnaK. Pełni większość funkcji typowych dla Hsp70 jak fałdowanie białek, czy ochrona białek przed stresem. Białko to nie uczestniczy w biogenezie centrów FeS. Tę rolę u *E.coli* pełni białko HscA (Vickery i Cupp-Vickery 2007) mające odległego wspólnego przodka z DnaK. Między tymi dwoma białkami, które należą do tej samej rodziny jest kilka istotnych różnic. DnaK oddziałuje z wieloma substratami, podczas gdy jedynym substratem HscA jest IscU. DnaK współpracuje z białkami zawierającymi domenę J należącymi do różnych klas. HscA oddziałuje wyłącznie z HscB, białkiem o masie 20kDa zawierającym domenę J i domenę wiążącą substrat. W odróżnieniu od DnaK, białko HscA nie wymaga współpracy z czynnikiem wymiany nukleotydów (NEF), ponieważ jego niskie powinowactwo do nukleotydów adeninowych umożliwia spontaniczną wymianę ADP do ATP (Vickery i Cupp-Vickery 2007). Analiza filogenetyczna dotycząca systemów białek Hsp70 jednoznacznie wykazała, że w toku ewolucji Eukarionty odziedziczyły po bakteryjnym przodku w obrębie mitochondrii wielofunkcyjne białko mtHsp70 spokrewnione z DnaK oraz białko zawierające domenę J Hsc20, spokrewnione z HscB. W nomenklaturze przyjętej dla drożdży *S. cerevisiae* gen kodujący białko wielofunkcyjne to SSC1, natomiast gen HSC20 koduje białko Hsc20. Ta sama analiza wykazała, że gen kodujący białko HscA nie został odziedziczony przez mitochondria.





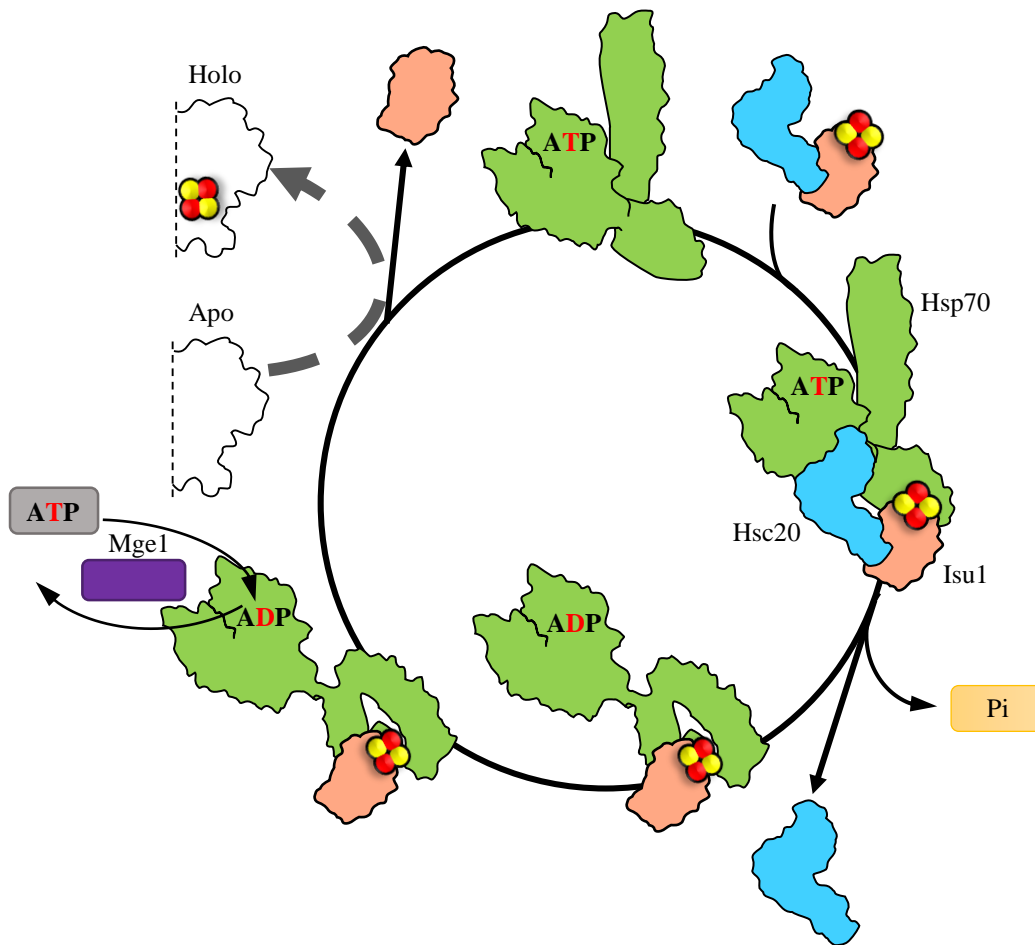
### Ryc.10 Ewolucja białek Hsp70 zaangażowanych w biogenezę FeS

U *E. coli* Hsc20 współpracuje z wyspecjalizowanym białkiem Hsp70 zwanym HscA. W mitochondriach ortolog DnaK zwany mtHsp70 zastępuje HscA w procesie transferu centrum FeS. Duplikacja mtHsp70 (gwiazdka) poskutkowała powstaniem multifunkcyjnego białka Ssc1 i wyspecjalizowanego Ssq1 które współpracuje z Hsc20 w biogenezie FeS. Strzałka pokazuje gałąź, kiedy Ssq1 współewoluowało z Hsc20.

W związku z tym u większości Eukariota w proces biogenezy centrów FeS zaangażowane jest białko Ssc1, którego funkcja jest determinowana przez białko zawierające domenę J. Niemniej w przypadku wąskiej grupy, w tym u *S. cerevisiae*, doszło do duplikacji genu kodującego mtHsp70, i specjalizacji drugiej kopii (Ryc.10). Ten proces doprowadził do powstania białka Ssq1, wyspecjalizowanego do pełnienia roli wyłącznie w procesie biogenezy centrów FeS (Schilke i wsp., 2006). Jedynym substratem białka Ssq1 jest molekularne rusztowanie Isu1, a jedynym białkiem z domeną J z którym współpracuje Ssq1 jest Hsc20. Jest to powtórzenie sytuacji ze specjalizacją systemu do pełnienia jednej funkcji jak dla wyżej opisanego bakteryjnego systemu HscA-HscB-IscU. Niemniej w tym przypadku Ssq1 jest spokrewnione z DnaK, w związku z tym proces specjalizacji był niezależny od procesu, który miał miejsce u bakterii. Ponadto biochemiczną cechą wspólną Ssq1, Ssc1 i DnaK jest wymóg współpracy z NEF podczas cyklu ATPazowego. Głównym determinantem specyficzności substratowej jest dedykowane białko Hsc20, z którym oddziałuje białko Hsp70. Dlatego w organizmach post-duplikacyjnych wielofunkcyjne białko Ssc1, posiadając szczątkowe powinowactwo do Hsc20, jest w stanie funkcjonalnie zastąpić białko Ssq1 w sytuacji delekcji genu  $\Delta ssq1$  kodującego to białko. Ze względu na mniejsze powinowactwo Ssc1 do Hsc20 wzrost drożdży w sytuacji delekcji  $\Delta ssq1$  jest zaburzony, lecz nie jest to delekcja letalna. Kompensacja efektów fenotypowych może nastąpić przez nadprodukcję białka Ssc1 (Knieszner i wsp., 2005). Świadczy to o tym, że w przypadku obecności dwóch kopii i specjalizacji jednej z nich, współpraca z Hsc20 ulega zacieśnieniu względem kopii dedykowanej biogenezie FeS. Jednakże oddziaływanie z substratem i aktywność enzymatyczna opierają się nadal na tych samych mechanizmach w przypadku obu kopii

mtHsp70. Białko Ssc1 jest w stanie wiązać molekularne rusztowanie Isu1 jako substrat, lecz w warunkach fizjologicznych do takiego oddziaływania nie dochodzi. Jest tak, gdyż niskie powinowactwo Hsc20 do Ssc1 powoduje, że Hsc20 nie kieruje Isu1 do tej kopii mtHsp70. W zamian za to Hsc20 kieruje Isu1 do Ssq1 preferencyjnie ze względu na wysokie powinowactwo Hsc20 do Ssq1 (Kleczewska i wsp., 2020).

Oddziaływanie Hsc20 z białkiem rusztowaniem Isu1 następuje niezależnie od obecności Hsp70 (Craig i Marszałek 2017). Miejsce oddziaływania Hsc20 z Isu1 ma dużą powierzchnię i warunkach *in vivo* wprowadzenie zaburzeń w oddziaływaniu jest letalne. Domena C-terminalna Hsc20 zawiera trzy wysoce konserwowane reszty hydrofobowe L105, L109, Y163 i trzy konserwowane w mniejszym stopniu ujemnie naładowane reszty D110, D113, E114 które są odpowiedzialne za oddziaływanie z Isu1 (Schilke i wsp., 2006, Ciesielski i wsp., 2012). Po stronie Isu1 za oddziaływanie odpowiedzialne są konserwowane hydrofobowe reszty L63, V72, F94 i dodatnio naładowane reszty K54, K55 i R74 (Majewska i wsp., 2013). Warto zaznaczyć, że te reszty Isu1 odpowiedzialne za oddziaływanie z Hsc20, są również odpowiedzialne za oddziaływanie z desulfurazą cysteinową Nfs1 (Majewska i wsp., 2013). Możliwe, że takie współdzielenie reszt ma fizjologiczne znaczenie w kontrolowanym przejściu Isu1 z kompleksu syntezy do kompleksu uczestniczącego w transferze centrów FeS do białek docelowych. Postuluje się, że apo forma Isu1 może mieć większe powinowactwo do Nfs1, a holo forma do Hsc20. Jest też możliwe, że Hsc20 może inicjować transfer dzięki temu, że Isu1 posiada reszty K54, K55 i R74 oddziałujące tylko z Hsc20, więc oddziaływanie Isu1 z Hsc20 może już zajść gdy Isu1 nadal jest w kompleksie z Nfs1. Dodatkowo oddziaływanie Isu1 z Hsc20 chroni Isu1 przed degradacją przez proteazę Pim1 tak samo jak desulfuraza cysteinowa (Ciesielski i wsp., 2016). Wynik ten został dodatkowo zweryfikowany poprzez zastosowanie w doświadczeniach wariantu białka Hsc20 defektywnego w wiązaniu się do Isu1. Brak możliwości utworzenia stabilnego kompleksu Hsc20-Isu1 prowadził do degradacji białka Isu1. Z drugiej strony nadprodukcja Hsc20 w komórce miała odwrotny efekt i prowadziła do wzmożonej ochrony Isu1 przed degradacją.



### Ryc.11 Cykl ATPazowy białek systemu Hsp70

Podczas cyklu na wstępie białko Hsc20 wiąże substrat - Isu1. Tak utworzony kompleks podwójny oddziałuje z Hsp70. Na etapie oddziaływania trzech białek aktywność ATPazowa białka Hsp70 jest maksymalnie stymulowana i dochodzi do wydajnej hydrolizy ATP. Na kolejnym etapie białko Hsc20 ulega dysocjacji, a Hsp70 zmienia konformację, która pozwala na utworzenie stabilnego kompleksu z Isu1. Czynniki wymiany nukleotydów Mge1 wymieniają cząsteczkę ADP na ATP, doprowadzając do ponownej zmiany konformacji Hsp70 co z kolei może prowadzić do zmiany konformacyjnej substratu w taki sposób, że centrum żelazo-siarkowe może być przekazane do białek docelowych.

Oddziaływanie Isu1 z Hsp70 i Hsc20 jest niezbędne do transferu centrum FeS z molekularnego rusztowania do białek docelowych, zarówno *in vitro* oraz *in vivo* (Dutkiewicz i wsp., 2017). Gdy zostanie obniżona ekspresja białka Hsp70 lub Hsc20 następuje akumulacja centrów żelazo-siarkowych w obrębie molekularnego rusztowania i obserwuje się zmniejszoną aktywność enzymów wymagających centrów FeS do prawidłowego funkcjonowania, przykładowo akonitazy (Dong i wsp., 2017). Obserwowana akumulacja centrów FeS na Isu1 pokazuje, że synteza centrów zachodzi niezależnie od obecności Hsp70 i Hsc20, niemniej system tych białek opiekuńczych jest niezbędny, żeby centra zostały potem przekazane do białek docelowych. Transfer jest bezpośrednio powiązany z cyklem ATPazowym białek opiekuńczych systemu Hsp70 (Dutkiewicz i wsp., 2017). Cykl ATPazowy został przedstawiony na Ryc.11. Białko Hsp70 wiąże się do obecnego na Isu1 pentapeptydu LPPVK zlokalizowanego na elastycznej pętli zlokalizowanej blisko kieszeni wiążącej centrum żelazo-siarkowe (Dutkiewicz i wsp., 2004). Motyw LPPVK jest silnie

konserwowany, jest obecny we wszystkich ortologach Isu1, zarówno prokariotycznych i eukariotycznych. W przypadku wyspecjalizowanych Hsp70 takich jak HscA i Ssq1 są biochemiczne dowody, że ta sekwencja jest jedyną rozpoznawaną przez te białka, chociaż sam mechanizm interakcji jest typowy dla tej klasy białek (Cupp-Vickery i wsp., 2004). Mimo ścisłej konserwacji, motyw LPPVK jest zbliżony do sekwencji consensus rozpoznawanej przez DnaK na którą składa się hydrofobowy rdzeń pięciu reszt, głównie L, lecz także I, V, F, Y, który jest otoczony dwoma regionami flankującymi zawierającymi reszty zasadowe (Rüdiger i wsp., 1997). Mimo, że jest jasne, że oddziaływanie Hsp70 z Isu1 jest kluczowe do transferu, to dokładny mechanizm jest wciąż niejasny. Często przytaczany jest model który zakłada, że po uformowaniu się kompleksu Hsp70 i Isu1, dochodzi do zmiany konformacji Isu1 w taki sposób, że traci zdolność do koordynacji centrum FeS co umożliwia łatwą dysocjację i transfer do białka docelowego (Bonomi i wsp., 2011). Byłoby to zgodne z typowym zjawiskiem rearanżacji konformacji białkowej przez Hsp70. Przykładowo ludzkie białka Hsp70, oddziałując z zagregowanymi amyloidami Tau, zmieniają je tak, żeby uwolnić formy monomeryczne które mogą zostać przywrócone funkcjonalnie, zdegradowane lub przy braku działania innych czynników stanowić zarodki nowych agregatów (Nachman i wsp., 2020). Bazowa aktywność ATPazowa białek Hsp70 jest niska, gdy do mieszaniny reakcyjnej zostanie dodane osobno białko Hsc20 lub Isu1 obserwuje się jedynie niewielki wzrost aktywności ATPazowej (Dutkiewicz i wsp., 2003). Dopiero gdy obecne są wszystkie trzy białka to obserwuje się maksymalny wzrost aktywności. Jest to wyraźny dowód pokazujący zależność całego procesu od cyklu ATPazowego.

## 1.5 Elementy systemu biogenezy FeS działające na późnych etapach procesu

Twierdzenie, że białka systemu Hsp70 umożliwiają transfer centrów żelazo-siarkowych do białek docelowych z jednej strony jest prawdą, lecz z drugiej strony jest też uproszczeniem faktycznego obrazu. Często między molekularnym rusztowaniem Isu1, a białkami docelowymi funkcjonuje szereg różnych przekaźników. Warto tu się skupić na rodzinie białek zwanych glutaredoksynami. Monotiolowe glutaredoksyny są białkami z miejscami aktywnymi, na które składają się reszty aminokwasowe CGFS (Li i Outten 2012). Białka te wykazują niską aktywność oksydoreduktazy tiolowo-dwusiarczkowej zależnej od glutationu. W drożdżach *S. cerevisiae* zaobserwowano, że mitochondrialna glutaredoksyna Grx5 jest w stanie wiązać centrum żelazo-siarkowe 2Fe-2S. Pojedyncze centrum 2Fe-2S jest koordynowane przez dwie cząsteczki Grx5 razem z dwoma cząsteczkami glutationu. Efektywny transfer z molekularnego rusztowania Isu1 do Grx5 zachodzi w obecności systemu białek Hsp70. Transfer z Isu1 do Grx5 bez Hsp70 zachodzi wielokrotnie wolniej (Shakamuri i wsp., 2012). W następnej kolejności Grx5, oddziałując z białkami docelowo wymagającymi centrum 2Fe-2S, doprowadza do skutecznego transferu centrum do tych białek.

Natomiast w przypadku biosyntezy centrów 4Fe-4S istnieje alternatywna ścieżka biochemiczna, która łączy Grx5 z mitochondrialną maszyną biogenezy centrów 4Fe-4S. 70% centrów żelazo-siarkowych w białkach eukariotycznych należy do typu 4Fe-4S. Źródłem tych centrów dla białek mitochondrialnych jest kompleks Isa1-Isa2-Iba57. Para białek Isa1 i Isa2 tworzy molekularne rusztowanie, a Iba57 jest elementem regulatorowym (Braymer i wsp., 2021). Dwa centra 2Fe-2S zostają dostarczone przez dwa kompleksy składające się z Grx5 i glutationu. Centra te mogą zostać połączone w pojedyncze centrum 4Fe-4S pod

warunkiem dostarczenia elektronów w celu redukcji. W przypadku systemu drożdżowego w proces ten jest zaangażowany wcześniej opisany system przekazywania elektronów złożony z ferrodoksyny Yah1 i reduktazy ferrodoksyny Arh1, który jednocześnie uczestniczy w redukcji siarki podczas biogenezy centrów 2Fe-2S. Tak samo ferrodoksyna zostaje zredukowana, dzięki aktywności białka Arh1, które pozyskuje elektrony z NADPH. W wyniku aktywności ferrodoksyny następuje redukcyjne złączenie dwóch centrów 2Fe-2S w centrum 4Fe-4S. Nowo zsyntetyzowane centrum zawierające cztery atomy żelaza i cztery atomy siarki może być przekazane bezpośrednio z kompleksu Isa1-Isa2-Iba57 do białek docelowych. Taki transfer zaobserwowano podczas dojrzewania akonitazy (Weiler i wsp., 2020). Transfer 4Fe-4S do wybranych białek docelowych może jednak wymagać dodatkowych czynników przejściowo wiążących centrum. Przykładowo transfer 4Fe-4S do syntazy lipoilowej wymaga udziału białek Nfu1 i Bol3 (Navarro-Sastre i wsp., 2011). W ludzkich mitochondriach czynnik IND1 umożliwia transfer 4Fe-4S z homologicznego molekularnego rusztowania ISCA1-ISCA2-IBA57 do mitochondrialnego kompleksu I (Sheftel i wsp., 2009).

Produkty systemu ISC mają też kluczowe znaczenie podczas biosyntezy centrów żelazo-siarkowych poza mitochondrium. Cytosolowy szlak CIA (*ang. Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly*) wymaga nieznanego substratu X-S do prawidłowego funkcjonowania. Nie jest znany dokładny skład tego substratu. Wiadomo, że wymagana jest pełna sprawność maszynierii ISC do tego, żeby eksport substratu z mitochondriów do cytozolu zachodził. Istnieją wskazówki, że ten substrat zawiera siarkę i żelazo choć nie wiadomo w jakich proporcjach (Braymer i wsp., 2021). Wiadomo, że podczas eksportu białko Grx5 oddziałuje z transporterem ABC nazwanym Atm1, będącym białkiem transmembranowym zlokalizowanym w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Analizując literaturę dotyczącą zagadnienia eksportu czynnika X z mitochondrii do cytozolu, który to jest niezbędny do dojrzewania cytosolowych i jądrowych białek FeS, na chwilę obecną można rozważać dwie hipotezy. Jedna hipoteza zakłada, że maszyneria ISC syntezuje unikatowy substrat i Grx5 transportuje go w sposób analogiczny, jak ma to miejsce podczas transferu centrum 2Fe-2S. Natomiast druga hipoteza zakłada, że na wstępie zachodzi transfer centrum 2Fe-2S przez Grx5 do błonowego transportera Atm1 i następnie dochodzi do modyfikacji centrum 2Fe-2S do substratu X-S już w obrębie Atm1 lub dodatkowych niezidentyfikowanych czynników pośrednich. Dotychczasowa literatura pozwala jedynie jednoznacznie stwierdzić, że Atm1 jest transporterem ABC, który jest zależny od glutationu. W związku z tym efektywny transport czynnika X-S do cytozolu wymaga obecności glutationu, który to jest niezbędny w tym procesie (Sipos i wsp., 2002).

Aktywność systemu CIA jest zależna od systemu ISC. Co więcej mitochondrialna lokalizacja białek systemu ISC jest istotna. Doświadczenie, w którym wprowadzono modyfikacje w obrębie białek systemu ISC prowadzące do ich cytosolowej lokalizacji przy jednoczesnym defekcie mitochondrialnego systemu ISC wykazało, że białka ISC zlokalizowane w cytozolu nie kompensowały defektu w obrębie białek ISC znajdujących się w mitochondriach. Sam system CIA składa się z komponentów strukturalnie odmiennych od systemu ISC. Molekularne rusztowanie stanowi kompleks białek Nbp35 i Cfd1. Oba te białka należą do podrodziny NTPaz z pętlą P przejściowo wiążącą metale podczas składania metaloprotein. Nbp35 i Cfd1 tworzą heterodimery lub heterotetramery i wykazują słabą zdolność do hydrolizy ATP i GTP. Zsyntetyzowane w obrębie kompleksu centrum 4Fe-4S jest koordynowane przez cztery cysteiny. Odpowiednio dwie stanowią część białka Nbp35, a pozostałe dwie należą do Cfd1. Prócz systemu ISC, białek Atm1, Nbp35, Cfd1 potrzebne jest

też źródło elektronów. Ich źródło stanowi zależna od NADPH flawinooksydoreduktaza Tah18 oraz białko Dre2, które zawiera w swoim obrębie centrum żelazo-siarkowe. Zaobserwowano przepływ elektronów między Tah18, a Dre2, ale dokładny mechanizm ich przekazania do Nbp35-Cfd1 jest nieznany (Netz i wsp., 2010).

Po zsintetyzowaniu, centrum 4Fe-4S jest przenoszone przez białko przekaznikowe Nar1 do kompleksów dostarczających centrum FeS do białek docelowych (w skrócie CTC, *ang. CIA Targeting Complex*) obecnych w cytozolu i jądrze (Braymer i wsp., 2021). Zależnie od białka docelowego, skład tych kompleksów może się różnić. Przykładowo kompleks złożony z białek Cia1, Cia2 i Mms19 dostarcza centrum 4Fe-4S do homologa endonukleazy III (Ntg2), zaś za dostarczenie centrum FeS do octanotransferazy glicerolo-3-fosforanu odpowiada prostszy kompleks składający się wyłącznie z białek Cia1 i Cia2. W przypadku zaś dojrzewania czynnika inicjacji translacji Rli1 insercja centrum 4Fe-4S następuje, gdy kompleks Cia1-Cia2-Mms19 dodatkowo oddziałuje z kompleksem adaptorowym składającym się z białek Yae1-Lto1 (Paul i wsp., 2015). Na podstawie tych przykładów widać, jak ściśle zależne jest dojrzewanie białek cytozolowych i jądrowych od mitochondrialnego systemu ISC. W ostatnim czasie odkryto organizmy, które w wyniku horyzontalnego transferu genów pozyskały wybrane elementy systemu SUF, łącząc funkcję tych elementów z komponentami systemu CIA, uniezależniając biogenezę FeS od systemu ISC (Braymer i wsp., 2021). Jednakże są to wyjątki i zdecydowana większość Eukariontów wymaga obecności maszynierii ISC jako niezbędnej do życia.

## 1.6 Rola centrów żelazo-siarkowych w patogenezie

Systemy biogenezy i transferu centrów żelazo-siarkowych są na tyle istotne, że problemy z funkcjonowaniem jednego z nich mogą prowadzić do wielu zaburzeń. Wybrane gatunki bakterii mają więcej niż jeden system biogenezy FeS. Różne systemy spełniają różne zapotrzebowanie i w normalnych warunkach funkcjonują niezależnie. Jednakże w sytuacji utraty jednego z systemów jest możliwa substytucja jego funkcji w bardzo ograniczonym zakresie. Jako, że grzyby i zwierzęta odziedziczyły jedynie system ISC, defekty w tym systemie nie są możliwe do skompensowania. Zaburzenia mogą uniemożliwić eksport substratu X-S dla cytozolowego systemu CIA, co ma kluczowy wpływ na funkcjonowanie tego systemu. Do tego mogą wystąpić mutacje w obrębie białek samego systemu CIA. Większość mutacji i delecji w systemie ISC jest letalna, lecz są też możliwe mutacje umożliwiające przeżycie, lecz skutkujące poważnymi chorobami w okresie dorosłości. Sztandarowym przykładem jest ataksja Friedreicha, zaburzenie aktywności frataksyny prowadzące do śmierci w wieku 30-tu lat (Lodi i wsp., 2006). Jest to rzadka choroba dotykająca jedną osobę na 50000. Inne zaburzenia potrafią być jeszcze rzadsze. Przykładowo miopatia spowodowana zaburzeniem obróbki mRNA genu kodującego molekularne rusztowanie została zidentyfikowana u 27 osób (Mochel i wsp., 2008). Z kolei nieketonowa hiperglicynemia wywołana jest mutacjami w genie kodującym białko glutaredoksynę Grx5 i zidentyfikowana została u 3 osób (Baker i wsp., 2013). Zidentyfikowano też mutacje w obrębie ludzkiego białka ABCB7, będącego transporterem uczestniczącym w homeostazie żelaza, które wywołują anemię sideroblastyczną w wyniku akumulacji nierozpuszczalnych jonów  $Fe^{3+}$  w komórce (Ye i Rouault 2010). Wymienione przypadki to choroby zidentyfikowane. Uwzględniając jednak złożoność procesów biochemicznych zależnych od centrów żelazo-siarkowych, zaburzenia ich funkcjonowania mogą wywoływać choroby których przyczyny są obecnie nieznane. Potencjalnie zaburzenia biologii FeS mogą mieć

wpływ na takie struktury organizmu jak krew, serce, mózg. Możliwe, że istnieją powiązania z występowaniem chorób sercowo naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych. U niektórych pacjentów, cierpiących na choroby związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem łańcucha oddechowego, deficyt funkcji niektórych białek wynikała z czynnika będącego poza sekwencją aminokwasową tych białek. Nie potwierdzono czym jest ten czynnik, lecz centra żelazo siarkowe potencjalnie mogą nim być. Jako, że centra FeS są niezbędne do działania enzymów zaangażowanych w naprawę i syntezę DNA, przykładowo helikaz (Rudolf i wsp., 2006), zaburzenia funkcjonowania mogą mieć wpływ na powstawanie nowotworów (Andressoo i wsp., 2006). Jednocześnie zaobserwowano, że w przypadku niektórych mechanizmów nowotworzenia, mogą one zachodzić tylko przy prawidłowo działającym szlaku biogenezy FeS. Tak więc jest jeszcze wiele niewiadomych dotyczących powiązania funkcjonowania szlaku biogenezy FeS z patogenezą, które mogą stanowić przedmiot niezwykle interesujących badań.

## CEL PRACY

Celem pracy było przeprowadzenie analizy strukturalno-funkcjonalnej kompleksu mitochondrialnych białek opiekuńczych systemu Hsp70 (Ssq1-białko Hsp70 oraz Hsc20-białko zawierające domenę J) z białkiem Isu1, które stanowi molekularne rusztowanie w obrębie którego zachodzi biosynteza centrów żelazo-siarkowych (FeS). Aby zrealizować ten cel opracowałem wydajną metodę oczyszczania kompleksu, który obejmował wszystkie trzy białka, Ssq1-Hsc20-Isu1. Następnie przygotowany kompleks Ssq1-Hsc20-Isu1 był analizowany w doświadczeniach wymiany deuterowej połączonej ze spektrometrią mas (HDX-MS). Przeprowadzona analiza bioinformatyczna w oparciu o uzyskane wyniki z doświadczeń HDX-MS pozwoliła na wytypowanie potencjalnych miejsc oddziaływań białko-białko, które następnie zweryfikowałem, stosując doświadczenia biochemiczne z wykorzystaniem oczyszczonych białek z wprowadzonymi mutacjami w obrębie przewidzianych miejsc oddziaływania.

## 2. MATERIAŁY

### 2.1 Szczepy bakteryjne

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$

*supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

*Escherichia coli* C41(DE3)

*hsdS gal ( $\lambda$ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*

*Escherichia coli* BL21(DE3)

*F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)*

*Escherichia coli* Rosetta 2

*F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam<sup>R</sup>)*

## 2.2 Plazmidy

Wektory plazmidowe zostały przygotowane przez Dr Brendę Schilke z współpracującego zespołu Prof. Elizabeth Craigh z Uniwersytetu w Wisconsin-Madison, USA. Wszystkie wektory są opracowane do wykorzystania w szczepach ekspresyjnych *Escherichia coli*.

Sekwencja kodująca białko Hsc20 (reszty od 10 do 184 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pET21d. Wektor z oryginalną sekwencją *HSC20* stanowił matrycę do przygotowania wariantów z substytucjami alaninowymi za pomocą mutagenyzy miejscowo specyficznej (Quik Change protocol, Stratagene).

### pET21d-HSC20His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20 WT.

### pET21d-HSC20<sup>H48/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>H48/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>H48/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty H48.

### pET21d-HSC20<sup>P49/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>P49/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>P49/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty P49.

### pET21d-HSC20<sup>D50/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>D50/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>D50/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty D50.

### pET21d-HSC20<sup>H48,P49,D50/AAA</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>H48,P49,D50/AAA</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>H48,P49,D50/AAA</sup> posiadający substytucję na alaninę reszt H48, P49 i D50.

### pET21d-HSC20<sup>R37/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>R37/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>R37/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty R37.

### pET21d-HSC20<sup>K38/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>K38/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>K38/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty K38.

### pET21d-HSC20<sup>R41/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>R41/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>R41/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty R41.



pET21d-HSC20<sup>K70/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>K70/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>K70/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty K70.

pET21d-HSC20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> posiadający substytucję na alaninę reszt L105, L109 i Y163.

pET21d-HSC20<sup>K125/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>K125/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>K125/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty K125.

pET21d-HSC20<sup>K132/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>K132/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>K132/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty K132.

pET21d-HSC20<sup>K172/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>K172/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>K172/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty K172.

pET21d-HSC20<sup>D173/A</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>D173/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>D173/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty D173.

pET21d-HSC20<sup>K132,K172/AA</sup>His

Gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20*<sup>K132,K172/AA</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20<sup>K132,K172/AA</sup> posiadający substytucję na alaninę reszt K132 i K172.

Sekwencja kodująca białko Isu1 (reszty od 36 do 165 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pET21d.

pET21d-ISU1His

Gen oporności na ampicylinę, gen *ISU1* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Isu1 WT.

Sekwencja kodująca białko Isu1 (reszty od 36 do 165 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z fragmentem glutationo-S-transferazy (GST) na końcu 3' zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pET3a. Wektor do ekspresji białka fuzyjnego został przygotowany przez amplifikację sekwencji kodującej Isu1-GST w wektorze p416-Isu1-GST udostępnionej dzięki uprzejmości Prof. Rolanda Lilla. Amplifikacja nastąpiła przez dodanie

dwóch starterów. Pierwszy komplementarny do początkowego fragmentu sekwencji białka Isu1 i zawierający miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym NdeI. Drugi komplementarny do sekwencji kodującej fragment GST i zawierający miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym BamHI. Następnie fragment między miejscami NdeI oraz BamHI został wklonowany do wektora plazmidowego pET3a.

#### pET3a-ISU1-GST

Gen oporności na ampicylinę, gen *ISU1* z sekwencją kodującą fragment GST na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Isu1-GST z fragmentem białka Isu1 odpowiadającym białku typu dzikiego.

#### pET3a-ISU1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST

Gen oporności na ampicylinę, gen *ISU1*<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>, z sekwencją kodującą fragment GST na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST z fragmentem białka Isu1 posiadającym substytucję na alaninę reszt P134, V135 i K136.

Sekwencja kodująca białko Hep1 oraz białko Ssq1 (reszty od 16 do 657 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' (o ile nie jest wskazane inaczej) zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pRSF Duet1 lub pET Duet1.

#### pRSFDuet1- SSQ1His/HEP1

Gen oporności na kanamycynę, gen *HEP* oraz *SSQ1* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Ssq1 WT.

#### pRSFDuet1- SSQ1<sup>R450/A</sup>His/HEP1

Gen oporności na kanamycynę, gen *HEP* oraz *SSQ1*<sup>R450/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Ssq1<sup>R450/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty R450.

#### pRSFDuet1- SSQ1<sup>T239/A</sup>His/HEP1

Gen oporności na kanamycynę, gen *HEP* oraz *SSQ1*<sup>T239/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Ssq1<sup>T239/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty T239.

#### pETDuet1-SSQ1<sup>T239/A</sup>His/HEP1

Gen oporności na ampicylinę, gen *HEP* oraz *SSQ1*<sup>T239/A</sup> z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Ssq1<sup>T239/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty T239.

#### pETDuet1-SSQ1<sup>T239/A</sup>/HEP1

Gen oporności na ampicylinę, gen *HEP* oraz *SSQ1*<sup>T239/A</sup> bez dodatkowych znaczników na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Ssq1<sup>T239/A</sup> posiadający substytucję na alaninę reszty T239.

Sekwencja kodująca białko Hsc20 (reszty od 10 do 184 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) bez znacznika oraz białko Isu1 (reszty od 36 do 165 bez presekwencji

kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pRSF Duet1.

#### pRSFDuet1-HSC20/ISU1His

Plazmid zawiera gen oporności na kanamycynę. Geny *HSC20* bez dodatkowych znaczników na końcu 3' oraz *ISU1* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' znajdują się pod kontrolą dwóch niezależnych promotorów T7. Plazmid koduje wariant Hsc20 WT oraz Isu1 WT.

## 2.3 Pożywki do hodowli bakterii

LA (*ang. lysogenic agar*)

0.5% (w/v) ekstrakt drożdżowy, 1% (w/v) trypton, 1% (w/v) NaCl, 2% (w/v) agar

LB (*ang. lysogenic broth*)

0.5% (w/v) ekstrakt drożdżowy, 1% (w/v) trypton, 1% (w/v) NaCl

TB (*ang. terrific broth*)

24g/L ekstrakt drożdżowy, 20g/L trypton, 4ml/L glicerol, 0.017M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.072M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

## 2.4 Inne

Złoża chromatograficzne:

HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich);

HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade (Sigma-Aldrich);

Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen);

CL-4B pokryte immobilizowanym zredukowanym glutationem (Sigma-Aldrich);

CM-Sephacrose (GE Healthcare);

Q-Sephacrose (GE Healthcare);

PD-10 (GE Healthcare).

Bufor Laemmli (stężony czterokrotnie):

250mM Tris-HCl pH 6.8;

8% SDS;

40% glicerol;

10%  $\beta$ -merkaptoetanol

0.025% błękit bromofenolowy

Bufor PD (stężony czterokrotnie):

160mM HEPES-KOH pH 7.5;

400mM KCl;

20% glicerol;

4mM DTT;

40mM  $\text{MgCl}_2$ .

## 3. METODY

### 3.1 Izolacja DNA plazmidowego

Do izolacji plazmidowego DNA wykorzystałem gotowy zestaw do izolacji o nazwie Plazmid-Mini firmy A&A Biotechnology. Zestaw działa w oparciu o metodę lizy alkalicznej. 3ml nocnej hodowli wirowałem w celu uzyskania osadu który następnie zawieszałem w buforze L1. Następnie dodawałem dający odczyn zasadowy bufor L2, po 3 minutowej inkubacji pH neutralizowałem buforem GL3. Uzyskany po wirowaniu supernatant przenieśliem na dołączoną do zestawu krzemionkową kolumnienkę wiążącą DNA i w celu pozbycia się zanieczyszczeń przeprowadziłem płukania odpowiednio pierwszym buforem płuczącym W i drugim buforem płuczającym A1. Po płukaniu DNA plazmidowe eluowałem do nowej probówki, nanosząc 60μl jałowej wody destylowanej.

### 3.2 Wprowadzenie bakterii w stan kompetencji

Na pierwszym etapie przygotowałem jałowy roztwór 0,1M CaCl<sub>2</sub> oraz nocną hodowlę szczepu ekspresyjnego *E. coli* (procedura stosowana była podczas doświadczeń z wykorzystywanymi w pracy szczepach BL21(DE3), BL21 Codon+, C41(DE3) i Rosetta 2). W następnej kolejności hodowlę odmłodziłem przez dodanie 1ml hodowli nocnej do 100ml świeżej pożywki LB. Odmłodzona hodowla była inkubowana w wyrząsarce wodnej ustawionej na temperaturę 37°C. Po uzyskaniu OD<sub>600</sub>= 0,2-0,3 wirowałem 50ml hodowli z prędkością 4000obr/min w wirówce z rotorem 11192 firmy Sigma przez 5 minut. Uzyskany osad zawiesiłem w 25ml 50mM CaCl<sub>2</sub>. Po 30 minutach inkubacji na lodzie komórki wirowałem ponownie z prędkością 4000obr/min (rotor 11192 firmy Sigma) przez 5 minut. Osad zawiesiłem w 2,8ml CaCl<sub>2</sub> i inkubowałem kolejne 2 godziny. Następnie dodałem 1,3ml glicerolu 50% i przygotowałem porcje komórek po 200μl. Po rozdzieleniu komórek kompetentne przechowywałem w temperaturze -80°C.

### 3.3 Transformacja szczepów ekspresyjnych

Wcześniej przygotowaną porcję komórek kompetentnych rozmroziłem i następnie dodałem 2μl wybranego plazmidu o stężeniu większym lub równym niż 20ng/μl. Po dodaniu plazmidu komórki inkubowałem przez 1h na lodzie, następnie przeprowadziłem szok termiczny w temperaturze 43°C przez 3 minuty, potem mieszaninę ponownie inkubowałem na lodzie przez kolejne 3 minuty. Po szoku termicznym do komórek dodałem 1ml świeżej pożywki LB po czym inkubowałem w termomikserze w temperaturze 37°C z prędkością 750 obr/min przez 1 godzinę. Na wcześniej przygotowane płytki LA z odpowiednim antybiotykiem naniosiłem 100μl zawiesiny komórek i równomiernie rozprowadziłem za pomocą głaszczki. Pozostałą objętość wirowałem przez 5 minut z prędkością 6000 obr/min (rotor 12134 firmy Sigma). Uzyskany osad przenieśliem na osobny zestaw płytek LA z antybiotykiem. Wszystkie płytki wstawiłem do ciepłarki na całonocną inkubację w temperaturze 37°C.

### 3.4 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących z użyciem żelu poliakrylamidowego (SDS-PAGE)

W toku badań używałem własnoręcznie przygotowanych żeli poliakrylamidowych przeznaczonych do wykorzystania w aparatach do elektroforezy mini-Protean firmy Bio-rad oraz używałem komercyjnych gotowych żeli Bolt™ 12% Bis-Tris Plus Gels 15-well i Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels 15-well firmy Thermo Fisher Scientific przeznaczonych do dedykowanego aparatu do elektroforezy Bolt™ firmy Thermo Fisher Scientific. W pierwszym przypadku sporządziłem żel dolny, przygotowując mieszaninę składającą się z 15% (v/v) roztworu akrylamidów o proporcji 37,5:1 akrylamidu do bisakrylamidu, 375mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,04% (w/v) APS i 0,1% (v/v) TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina). Po tym jak żel dolny uległ polimeryzacji, żel górny sporządziłem przez przygotowanie mieszaniny składającej się z 5% (v/v) roztworu akrylamidów o proporcji 37,5:1 akrylamidu do bisakrylamidu, 125mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,04% (w/v) APS i 0,1% (v/v) TEMED. Tak przygotowane żele po 60 minutowym czasie polimeryzacji były gotowe do użycia.

Próbki białek do rozdzielania elektroforetycznego przygotowywałem przez zmieszanie z 4-razy stężonym buforem Laemmli w proporcji 2 objętości białka do 1 objętości L4x lub przez mieszanie z 2-razy stężonym buforem Laemmli w proporcji 1 objętość białka do 2 objętości Laemmli 2x. Próbki gotowałem w temperaturze 100°C przez 5 minut w termobloku i następnie nanosiłem przygotowane próbki do studzienek żelu poliakrylamidowego. Żele własnoręcznie przygotowane rozdzielałem w buforze 1x SDS (przygotowany przez odpowiednie rozcieńczenie buforu 10xSDS o składzie 3% (w/v) Tris, 14,4% (w/v) glicyna, 1% (w/v) SDS) przez 1-1,5h przy napięciu 180V. Komercyjne żele Bolt™ rozdzielałem w buforze 1x MES-SDS (przygotowany z komercyjnego buforu 20x Bolt™ MES SDS Running Buffer). W tym przypadku czas rozdzielania wynosił 35 minut przy napięciu 170V. Żele własnoręcznie przygotowane barwiłem przez noc w barwniku Coomassie Brilliant Blue G-250, którego roztwór przygotowałem przez zmieszanie 5 objętości stężonego roztworu Coomassie (0,28% (w/v) barwnik w 50% (v/v) metanolu) z 2 objętościami stężonego kwasu octowego i 3 objętościami wody destylowanej. Żele Bolt™ barwiłem komercyjnym barwnikiem InstantBlue Protein Stain firmy Expedeon.

### 3.5 Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach natywnych (Blue Native PAGE)

W celu przeprowadzenia elektroforezy białek w warunkach natywnych użyłem komercyjnych żeli NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris 10-well firmy Thermo Fisher Scientific.

Próbki białek do rozdzielania elektroforetycznego przygotowywałem przez ich zmieszanie z 4-razy stężonym buforem do próbek. Całkowita objętość próbki wynosiła 10µl, na tę objętość składało się 2,5µl buforu do próbek, określona objętość preparatu białkowego, w przypadku stosowanych preparatów 2,5µl lub 5µl, oraz całość uzupełniałem wodą. Po zmieszaniu, w gotowej do nałożenia próbce, stężenia składników buforu do nakładania próbek były następujące: 50mM Bis-Tris, 6N HCl, 50mM NaCl, 10% glicerol, 0,001% Ponceau S.

Żele, aparat do elektroforezy i bufory stosowane podczas eksperymentu schłodziłem do temperatury 4°C i w trakcie rozdziału aparat został umieszczony w lodzie. Poszczególne bufory wykorzystane podczas rozdziału elektroforetycznego były przeze mnie przygotowane w oparciu o 20-krotnie stężony bufor NativePAGE™ Running Buffer zawierający 1M Bis-Tris, 1M tricyna, pH 6.8. Bufor anodowy stanowił 20-krotnie rozcieńczony bufor NativePAGE™ Running Buffer, natomiast bufor katodowy przygotowałem poprzez zmieszanie 50ml 20x NativePAGE™ Running Buffer, 50ml 20x dodatku katodowego (1g Coomassie G-250 w 250ml H<sub>2</sub>O) i 900ml H<sub>2</sub>O. Po naniesieniu próbek został przeprowadzony rozdział. Przez pierwsze 60 minut rozdział był prowadzony przy napięciu 150V, a przez kolejne 60 minut rozdział był kontynuowany przy napięciu 250V. Po rozdziale żele były barwione komercyjnym barwnikiem InstantBlue Protein Stain firmy Expedeon.

### 3.6 Oczyszczanie białek

Podczas prowadzonych badań prócz własnoręcznie oczyszczonych białek korzystałem też z preparatów z kolekcji Zakładu Biochemii Ewolucyjnej.

#### 3.6.1 Oczyszczanie białka Isu1-His

Na wstępie szczep ekspresyjny *E. coli* C41(DE3) z wektorem plazmidowym pET21d-ISU1His był hodowany przez noc w 400ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny 100μg/ml, w temperaturze 37°C. Uzyskaną hodowlę nocną wykorzystałem do inokulacji hodowli w 6l pożywki LB do wartości OD<sub>600</sub>=0,1. Następnie prowadziłem hodowlę w wytrząsarce powietrznej ustawionej na wytrząsanie z prędkością 160 obr/min w temperaturze 30°C. W momencie uzyskania przez hodowlę wartości OD<sub>600</sub>=0,6 dodałem IPTG do końcowego stężenia 1mM i kontynuowałem hodowlę przez kolejne 3 godziny.

Hodowla po wyznaczonym czasie była wirowana przez 10 minut z prędkością 5000 obr/min z użyciem rotora JLA 10.500 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Osad uzyskany w trakcie wirowania zawiesiłem w buforze I1 (25mM Tris-HCl pH 8,0, 500mM KCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 0,05% Triton X-100, 50mM imidazol pH 8,0) i poddałem trzykrotnej lizie z wykorzystaniem prasy Frencha przy ciśnieniu 1500 psi. Lizat komórkowy wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min w wirówce z rotorem JA 30.50 firmy Beckman w temperaturze 4°C. Supernatant został naniesiony na kolumnę z 2,5ml złoża His-Bind Resin firmy Novagen, którą wcześniej zrównoważyłem buforem I1. Po naniesieniu supernatantu na złożo, zostało ono przepłukane 50ml buforu I2 (wariant buforu I1 ze stężeniem KCl podwyższonym do 1M) i 100ml buforu I3 (wariant buforu I1 ze stężeniem KCl obniżonym do 150mM). Rozdział prowadziłem w oparciu o metodę o następujących parametrach: liniowy gradient stężenia imidazolu od 50mM do 500mM w buforze I3, objętość całego gradientu wynosiła 50ml, natomiast objętość pojedynczej frakcji 1ml, prędkość przepływu 0,3ml/min. Po rozdziale wszystkie frakcje zostały sprawdzone pod kątem obecności białek za pomocą testu z czernią amidową (0,1% (w/v) czerń amidowa, 25% (v/v) izopropanol, 10% (v/v) kwas octowy). Te frakcje które zawierały białka poddałem elektroforezie SDS-PAGE.

Wybrane frakcje zawierające Isu1 o największym stężeniu połączyłem i dializowałem do buforu GF (25mM HEPES-KOH pH 8,0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>) przez 3 godziny, w czterech rundach trwających 45 minut i potem preparat Isu1

zagęściłem do objętości 5ml, wykorzystując filtr Amicon® Ultra – 15 o MWCO=10kDa zgodnie z protokołem firmy Milipore.

Kolumnę do sączenia molekularnego HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich) zrównoważyłem buforem GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>). Do próbki Isu1 dodawałem DTT do końcowego stężenia 1mM, inkubowałem w temperaturze 4°C przez 10 minut, dodawałem ATP do końcowego stężenia 2mM i MgCl<sub>2</sub> do stężenia 10mM i inkubowałem dodatkowo 20 minut. W następnej kolejności analizowaną próbkę wirowałem z prędkością 15000 obr/min przez 15 minut w rotorze 12148 firmy Sigma w celu eliminacji makroskopowych agregatów i nakładałem na złożę do sączenia molekularnego, stosując pętlę o objętości 5ml. Rozdział prowadziłem w oparciu o metodę o następujących parametrach: całkowita objętość rozdziału 120ml, przy czym 40ml obejmowało objętość zerową kolumny, szybkość przepływu 1ml/min, objętość zbieranych frakcji 1ml. Rozdział chromatograficzny Isu1 pozwolił na uzyskanie frakcji zawierających dimer oraz monomer analizowanego białka. Oba preparaty zagęszczałem, wykorzystując filtr Amicon® Ultra – 15 o MWCO=10kDa. Po zagęszczeniu uzyskane preparaty monomeru i dimeru Isu1 porcjałem na mniejsze objętości i zamroziłem w -80°C.

### 3.6.2 Oczyszczanie białka Isu1-GST

Komórki *E. coli* C41(DE3) z wektorem plazmidowym pET3a-ISU1-GST były hodowane przez noc w 400ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny 100µg/ml, w temperaturze 37°C. Nocna hodowla posłużyła do inokulacji hodowli w 6l pożywki LB do wartości OD<sub>600</sub>=0,1. W następnej kolejności prowadziłem hodowlę w wytrząsarce powietrznej ustawionej na wytrząsanie z prędkością 160 obr/min w temperaturze 30°C. W momencie uzyskania przez hodowlę wartości OD<sub>600</sub>=0,6 dodałem IPTG do końcowego stężenia 1mM i kontynuowałem hodowlę przez kolejne 3 godziny.

Hodowla po 3 godzinach była wirowana przez 10 minut z prędkością 5000 obr/min z użyciem rotora JLA 10.500 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Osad uzyskany w trakcie wirowania zawiesiłem w buforze IG1 (25mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM NaCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 1mM DTT, 0,05% Triton X-100) i poddałem trzykrotnej lizie z wykorzystaniem prasy Frencha przy ciśnieniu 1500 psi. Lizat komórkowy wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min w wirówce z rotorem JA 30.50 firmy Beckman w temperaturze 4°C. Następnie wcześniej przygotowaną kolumnę zawierającą 1ml złoża CL-4B opłaszczanego glutationem firmy Sigma-Aldrich zrównoważyłem 30ml buforu IG1. Cykl nanoszenia frakcji rozpuszczalnej, płukania, elucji i regeneracji kolumny został powtórzony trzy razy. W każdym cyklu, po naniesieniu frakcji, kolumna była płukana 100ml buforu IG2 (IG1 bez PMSF), potem 10ml buforu IG3 (IG1 z dodatkiem 1mM ATP i 10mM MgCl<sub>2</sub>) i 10ml IG1. Elucja była prowadzona z użyciem 10ml buforu IG4 (IG1 z dodatkiem 50mM zobojętnionego glutationu). Z każdego cyklu oczyszczania uzyskałem 10 lub 11 frakcji o objętości 1ml. Złożę przed każdym cyklem oczyszczania było regenerowane poprzez płukania 2ml (2x objętość złoża) 6M chlorowodoru guanidyny, 4ml (4x objętość złoża) 70% etanolu i ponownie równoważona 5ml buforu IG1. Wszystkie zebrane frakcje analizowałem z użyciem elektroforezy SDS-PAGE.

Frakcje o najwyższej czystości połączyłem i dializowałem do buforu IG5 (20mM MOPS-NaOH pH 7.0, 25mM NaCl, 1mM DTT i 0,05% Triton X-100) przez 3 godziny, w

trzech rundach trwających 1 godzinę. Po dializie preparat został naniesiony na kolumnę zawierającą 2,5ml złoża CM-Sepharose firmy GE Healthcare, wcześniej zrównoważonego 50ml buforu IG5. Po naniesieniu białka kolumna była płukana 50ml buforu IG5. Rozdział był prowadzony z zastosowaniem liniowego gradientu NaCl od 25mM do 600mM, całkowita objętość rozdzału wynosiła 50ml, przepływ 0,4ml/min, natomiast objętość zbieranych frakcji 1,2ml.

Po przeprowadzeniu rozdzału do uzyskanych frakcji dodałem 0,1ml 100% glicerolu. Te frakcje które zawierały białka, zostały poddane dokładniejszej analizie za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Frakcje zawierające Isu1-GST o najwyższej czystości połączyłem i w celu zagęszczenia uzyskany preparat dializowałem przez 3 godziny wobec buforu IG6 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 10% glicerol, 5mM  $\beta$ -merkaptotanol, 0,05% Triton X-100). Po dializie preparat został naniesiony na kolumnę ze złożem Q Sepharose (1ml) firmy GE Healthcare wcześniej zrównoważoną 20ml buforu IG6. Po naniesieniu białka kolumna była płukana 20ml buforu IG6. Elucja została przeprowadzona poprzez naniesienie na złożę 20ml buforu IG7 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 600mM NaCl, 10% glicerol, 5mM  $\beta$ -merkaptotanol, 0,05% Triton X-100). Podczas elucji zbierałem 12 frakcji o objętości 0,5ml każda. Następnie uzyskane frakcje analizowałem za pomocą elektroforezy SDS-PAGE.

W celu zmiany buforu na bufor IG8 o składzie 20mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM KCl, 10% glicerol, 5mM  $\beta$ -merkaptotanol, 0,05% Triton X-100, frakcje o najwyższej zawartości zostały połączone i poddane dializie wobec buforu IG8 trwającej 4 godziny, w czterech rundach trwających 1 godzinę. Po dializie poporcjowałem preparat Isu1-GST na mniejsze objętości, następnie zamroziłem w ciekłym azocie i umieściłem w zamrażalce w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6.3 Oczyszczanie białka Hsc20-His

Do nadprodukcji białka Hsc20-His typu dzikiego oraz wszystkich jego alaninowych wariantów wykorzystałem bakterie *E. coli* C41(DE3) z wektorem plazmidowym pET21d posiadającym sekwencję genetyczną danego wariantu białka Hsc20-His. Hodowla nocna była prowadzona w 400ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Uzyskana hodowla nocna posłużyła do inokulacji hodowli w 6l pożywki LB do wartości  $\text{OD}_{600}=0,1$ . Następnie prowadziłem hodowlę w wytrząsarce powietrznej ustawionej na wytrząsanie z prędkością 160 obr/min w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$ . W momencie uzyskania przez hodowlę bakteryjną wartości  $\text{OD}_{600}=0,6$  dodałem IPTG do końcowego stężenia 1mM i kontynuowałem hodowlę przez kolejne 3 godziny.

Hodowla po 3 godzinach była wirowana przez 10 minut z prędkością 5000 obr/min z użyciem rotora JLA 10.500 firmy Beckman schłodzonego do temperatury  $4^{\circ}\text{C}$ . Osad zawiesiłem w buforze H1 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 30mM imidazol pH 8.0). Zawiesinę komórek poddałem trzykrotnej lizie z wykorzystaniem prasy Frencha przy ciśnieniu 1500 psi. Następnie lizat komórkowy wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min w rotorze JA 30.50 firmy Beckman w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzyskany po lizie supernatant przenieśliem do czystej zlewki i przez godzinę białka w nim obecne wysalałem siarczanem amonu (AS), powoli dodając w formie sproszkowanej do finalnego stężenia 0,35g/ml. Po wysalaniu mieszaninę wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min w rotorze JA 30.50 firmy Beckman w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant usunąłem, a uzyskany osad zawiesiłem w 30ml buforu H1. W następnej kolejności



zawieszony osad został naniesiony na kolumnę z 2,5ml złoża His-Bind Resin firmy Novagen, wcześniej zrównoważoną buforem H1. Po naniesieniu preparatu na złożo, zostało ono przepłukane odpowiednio 50ml buforu H1, 20ml buforu H2 (wariant buforu H1 ze stężeniem NaCl podwyższonym do 1M oraz dodatkiem 1mM ATP i 2mM MgCl<sub>2</sub>) i 100ml buforu H1. Rozdział frakcji został przeprowadzony z wykorzystaniem liniowego gradientu stężenia imidazolu od 30mM do 300mM w buforze H1. Objętość gradientu wyniosła 30ml, objętości pojedynczej frakcji 0,8ml, natomiast stosowana prędkość przepływu 0,4ml/min. Po rozdzieleniu wszystkie frakcje zostały sprawdzone pod kątem obecności białek za pomocą testu z czernią amidową (0,1% (w/v) czerni amidowa, 25% (v/v) izopropanol, 10% (v/v) kwas octowy). Frakcje zawierające białko poddałem dalszej analizie na żelach SDS-PAGE.

Frakcje zawierające białko Hsc20 o najwyższej czystości połączyłem, zagęściłem zgodnie z protokołem firmy Milipore w filtrze Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 o MWCO=10kDa, do momentu uzyskania całkowitej objętości 3ml. Następnie zagęszczony preparat dializowałem wobec buforu finalnego H3 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 10% glicerol, 5mM β-merkaptioetanol) przez 3 godziny, w czterech rundach trwających 45 minut. Po dializie uzyskany preparat białka Hsc20 porcjałem na mniejsze objętości, zamroziłem w ciekłym azocie i umieściłem w zamrażalce w temperaturze -80°C.

### 3.6.4 Oczyszczanie białka Ssq1-His

Nadprodukcja białka Ssq1-His została przeprowadzona z wykorzystaniem szczepu *E. coli* BL21(DE3), który został transformowany wektorem plazmidowym pRSFDuet1-SSQ1His/HEP1 lub plazmidem z wariantem genu SSQ1T239A. Na wstępie przygotowałem 400ml nocnej hodowli w pożywce LA z dodatkiem kanamycyny (50μg/ml). Następnie komórki bakteryjne były hodowane w temperaturze 37°C przy obrotach wytrząsarki 180obr/min. Uzyskana hodowla posłużyła do inokulacji hodowli na dużą skalę w 6l pożywki LB do wartości OD<sub>600</sub>=0,1. Tak przygotowane hodowle zostały umieszczone w wytrząsarce powietrznej ustawionej na wytrząsanie z prędkością 160 obr/min. Hodowla była prowadzona w temperaturze 30°C. Po uzyskaniu przez komórki bakteryjne wartości OD<sub>600</sub>=0,6, w celu indukcji dodawałem IPTG do końcowego stężenia 1mM. Następnie po indukcji hodowlę prowadziłem przez 4 godziny.

Komórki po 4 godzinach były wirowane przez 10 minut z prędkością 5000 obr/min z użyciem rotora JLA 10.500 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Osad uzyskany w trakcie wirowania zawiesiłem w buforze S1 (20mM HEPES-KOH pH 7.5, 150mM KCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 2mM Mg(Ac)<sub>2</sub>, 20mM imidazol pH 8.0). Zawiesinę komórek poddałem trzykrotnej lizie z wykorzystaniem prasy Frencha przy ciśnieniu 1500 psi. Uzyskany lizat komórkowy wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min, używając rotora JA 30.50 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Uzyskany supernatant został naniesiony na kolumnę z 2,5ml złoża His-Bind Resin firmy Novagen. Po naniesieniu supernatantu na złożo, zostało ono przepłukane 50ml buforu S1, 50ml buforu S2 (wariant buforu S1 z dodatkiem 0,05% Triton X-100), 20ml buforu S3 (wariant buforu S1 z dodatkiem 1mM ATP i 10mM MgCl<sub>2</sub>) i 20ml buforu S4 (wariant buforu S1 ze stężeniem KCl podwyższonym do 1M). Białko eluowałem buforem S1, stosując liniowy gradient stężeń imidazolu od 30mM do 500mM. Objętość rozdzielenia wyniosła 50ml, objętość pojedynczej frakcji 1ml, natomiast prędkość przepływu 0,3ml/min. Po rozdzieleniu wszystkie frakcje zostały sprawdzone pod kątem obecności białek za pomocą testu z czernią amidową (0,1% (w/v)

czernią amidową, 25% (v/v) izopropanol, 10% (v/v) kwas octowy). Te frakcje które zawierały białka poddałem analizie elektroforetycznej SDS-PAGE. Wybrane na podstawie elektroforezy najczystsze frakcje połączyłem razem, zagęściłem poprzez wirowanie z użyciem filtra Amicon® Ultra – 15 o MWCO=50kDa firmy Milipore. Po zagęszczeniu preparat dializowałem wobec buforu finalnego S5 (20mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 10% glicerol, 5mM  $\beta$ -merkaptioetanol) przez 3 godziny, w czterech rundach trwających 45 minut. Po dializie preparat Ssq1 porcjałem na mniejsze objętości, mroziłem w ciekłym azocie i umieściłem w zamrażalce w temperaturze -80°C.

### 3.6.5 Oczyszczanie kompleksu podwójnego Hsc20:Isu1-His

Komórki *E. coli* Rosetta 2 z wektorem plazmidowym pRSFDuet1-HSC20/ISU1His były hodowane przez noc w pożywce LB z dodatkiem kanamycyny (25 $\mu$ g/ml) i chloramfenikolu (10 $\mu$ g/ml) w temperaturze 37°C. Otrzymana hodowla nocna posłużyła do inokulacji hodowli na dużą skalę w 6l pożywki LB do wartości OD<sub>600</sub>=0,1. Następnie komórki bakteryjne hodowałem w wytrząsarce powietrznej ustawionej na wytrząsanie z prędkością 160 obr/min w temperaturze 37°C. W momencie uzyskania wartości OD<sub>600</sub>=0,6 dodałem IPTG do końcowego stężenia 1mM, obniżyłem temperaturę do 30°C i kontynuowałem hodowlę przez kolejne 3 godziny.

Uzyskane komórki bakteryjne po 3 godzinach były wirowane przez 10 minut z prędkością 5000 obr/min z użyciem rotora JLA 10.500 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Po wirowaniu osad zawiesiłem w buforze HI1 (25mM HEPES-KOH pH 7.5, 150mM KCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 2mM Mg(Ac)<sub>2</sub> i 30mM imidazol pH 7.5). W następnej kolejności zawiesinę komórek poddałem trzykrotnej lizie z wykorzystaniem prasy Frencha przy ciśnieniu 1500 psi. Przygotowany lizat komórkowy wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min używając rotora JA 30.50 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Po wirowaniu supernatant został naniesiony na kolumnę z 2,5ml złoża His-Bind Resin firmy Novagen, wcześniej zrównoważonego buforem HI1. Po naniesieniu supernatantu na złożo, zostało ono przepłukane 50ml buforu HI1, 25ml buforu HI2 (wariant buforu HI1 z dodatkiem 10mM MgCl<sub>2</sub> i 1mM ATP) i ponownie 25ml buforu HI1. Elucja była prowadzona poprzez zastosowanie liniowego gradientu stężenia imidazolu od 30mM do 300mM w buforze HI1. Objętość gradientu wynosiła 50ml, objętości pojedynczej frakcji 1ml, natomiast prędkość przepływu 0,3ml/min. Po rozdziale wszystkie frakcje zostały sprawdzone pod kątem obecności białek za pomocą testu z czernią amidową. Następnie frakcje zawierające białka poddałem analizie elektroforetycznej SDS-PAGE.

Frakcje zawierające kompleks połączyłem razem i zagęściłem, wykorzystując filtr Amicon® Ultra – 15 o MWCO=30kDa zgodnie z protokołem producenta Milipore. Wirowanie trwało do momentu uzyskania objętości 0,8ml. Kolumnę HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich) zrównoważyłem buforem GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>). Do próbki dodawałem DTT do końcowego stężenia 1mM, inkubowałem w temperaturze 4°C przez 10 minut, następnie dodawałem ATP do końcowego stężenia 2mM i MgCl<sub>2</sub> do stężenia 10mM, inkubowałem dodatkowe 20 minut. W następnej kolejności analizowaną próbkę wirowałem z prędkością 15000 obr/min przez 15 minut w rotorze 12148 firmy Sigma w celu eliminacji makroskopowych agregatów i nakładałem na złożo do sączenia molekularnego, stosując pętlę 2ml. Rozdział prowadziłem w oparciu o metodę o następujących parametrach: całkowita

objętość rozdziału 120ml, przy czym 40ml obejmowało objętość zerową kolumny, szybkość przepływu wynosiła 1ml/min, objętość zbieranych frakcji 1ml. Do elektroforezy SDS-PAGE wybrałem frakcje, które zawierały białka, których masa odpowiadała masie około 43kDa. Uzyskany preparat kompleksu Hsc20-Isu1 zagęszczałem wykorzystując filtr Amicon® Ultra – 15 o MWCO=30kDa. Po zagęszczaniu kompleks porcjałem na mniejsze objętości, mroziłem i przechowywałem w -80°C.

### 3.6.6 Oczyszczanie kompleksu potrójnego Ssq1-His:Hsc20:Isu1-His

Kompleks białkowy Ssq1-His:Hsc20:Isu1-His oczyszczalem według procedury opracowanej podczas realizacji projektu doktorskiego. Komórki *E. coli* Rosetta 2 z wektorem plazmidowym pRSFDuet1-HSC20/ISU1His oraz pETDuet1-SSQ1<sup>T239/A</sup>His/HEP1 były hodowane w 400ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (50µg/ml), kanamycyny (25µg/ml) i chloramfenikolu (10µg/ml) w wytrząsarce wodnej w temperaturze 37°C z prędkością 180 obr/min. Otrzymaną hodowlę nocną wykorzystałem do inokulacji hodowli w 6l pożywki LB (z dodatkiem ampicyliny (50µg/ml), kanamycyny (25µg/ml) i chloramfenikolu (10µg/ml)). Hodowla bakteryjna odmłodzona do OD<sub>600</sub>=0,1 została umieszczona w wytrząsarce powietrznej ustawionej na wytrząsanie z prędkością 160 obr/min i była dalej prowadzona w temperaturze 37°C do uzyskania wartości OD<sub>600</sub>=0,6, wówczas w celu indukcji dodawałem IPTG do końcowego stężenia 0,5mM oraz obniżałem temperaturę hodowli do 30°C. W następnej kolejności hodowlę prowadziłem przez kolejne 3 godziny.

Komórki bakteryjne po 3 godzinnej inkubacji były wirowane przez 10 minut z prędkością 5000 obr/min z użyciem rotora JLA 10.500 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. Osad, uzyskany po etapie wirowania, zawiesiłem w buforze SHI1 (25mM HEPES-KOH pH 7.5, 150mM KCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 2mM Mg(Ac)<sub>2</sub> i 30mM imidazol pH 7.5). Następnie zawiesinę komórek poddałem trzykrotnej lizie z wykorzystaniem prasy Frencha przy ciśnieniu 1500 psi. Otrzymany lizat komórkowy wirowałem przez godzinę z prędkością 25000 obr/min, używając rotora JA 30.50 firmy Beckman schłodzonego do temperatury 4°C. W następnej kolejności supernatant został naniesiony na kolumnę z 2,5ml złoża His-Bind Resin firmy Novagen, wcześniej zrównoważonego buforem SHI1. Po naniesieniu supernatantu na złożo, zostało ono przepłukane 50ml buforu SHI1, 25ml buforu SHI2 (wariant buforu SHI1 z dodatkiem 10mM MgCl<sub>2</sub> i 1mM ATP) i ponownie 25ml buforu SHI1. Kompleks białek eluowałem w buforze SHI1, stosując liniowy gradient stężenia imidazolu od 30mM do 500mM. Całkowita objętość rozdziału wynosiła 50ml, objętość pojedynczej frakcji 1ml, zaś prędkość przepływu 0,3ml/min. Po rozdziale wszystkie frakcje zostały sprawdzone pod kątem obecności białkowej za pomocą testu z czernią amidową (0,1% (w/v) czerń amidowa, 25% (v/v) izopropanol, 10% (v/v) kwas octowy). Te frakcje, które zawierały białka poddałem analizie z wykorzystaniem elektroforezy SDS-PAGE. Wybrane na podstawie elektroforezy najczystsze frakcje połączyłem razem i zagęściłem, wykorzystując filtr Amicon® Ultra – 15 o MWCO=100kDa zgodnie z protokołem producenta Milipore.

Kolumnę HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich) równoważyłem buforem GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>) lub buforem S5 (20mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 10% glicerol, 5mM β-merkaptotanol). Przed sączeniem do próbki o objętości 2ml dodawałem DTT do końcowego stężenia 1mM i inkubowałem w temperaturze 4°C przez 10 minut. Następnie dodawałem

ATP do końcowego stężenia 2mM i MgCl<sub>2</sub> do stężenia 10mM i inkubowałem dodatkowe 20 minut. W następnej kolejności analizowaną próbkę wirowałem z prędkością 15000 obr/min przez 15 minut w rotorze 12148 firmy Sigma w celu eliminacji makroskopowych agregatów i nakładałem na złoże do sączenia molekularnego, stosując pętlę 2ml. Rozdział prowadziłem w oparciu o metodę o następujących parametrach: całkowita objętość rozdziału wynosiła 120ml, przy czym 40ml obejmowała objętość zerową kolumny, szybkość przepływu 1ml/min, natomiast objętość zbieranych frakcji 1ml. Zebrane zostały frakcje zawierające białka o masie odpowiadającej masie 139kDa. Następnie zebrane frakcje były analizowane za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Najczystsze frakcje zawierające kompleks zostały zagęszczone z wykorzystaniem filtra Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 o MWCO=100kDa firmy Milipore. Uzyskany preparat porcjowałem na mniejsze objętości, mroziłem w ciekłym azocie i umieściłem w zamrażalce w temperaturze -80°C.

### 3.7 Przygotowanie złoża do precypitacji kompleksów białkowych

Na wstępie odważałem 210mg sproszkowanego złoża CL-4B opłaskzonego glutationem firmy Sigma-Aldrich w celu uzyskania 3ml złoża gotowego do doświadczeń. Zważone złoże zawieszałem w 40ml jednokrotnie stężonego buforu PD (40mM HEPES-KOH pH 7.5, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT, 10mM MgCl<sub>2</sub>). Taką mieszaninę inkubowałem 18 godzin. Inkubacja z rotacją była przeprowadzana w temperaturze 4°C. Po inkubacji mieszaninę wirowałem 5 minut z przyspieszeniem 1000g w wirówce z rotorem 11192 firmy Sigma, schłodzoną do temperatury 4°C. Po wirowaniu supernatant ostrożnie usuwałem za pomocą igły podłączonej do systemu próżniowego. Po usunięciu supernatantu złoże zawieszałem w 6ml jednokrotnie stężonego buforu PD. Następnie wirowałem 1000g w wirówce z rotorem 11192 firmy Sigma. Procedurę płukania buforem PD i wirowania powtarzałem trzykrotnie. Po ostatnim płukaniu zawieszałem złoże w 15ml buforu PD z dodatkiem 0,1% Triton X-100 i inkubowałem w 4°C z rotacją przez 2,5 godziny. Po inkubacji złoże ponownie trzykrotnie płukałem 9ml buforu PD. Po tym cyklu płukania złoże zawieszałem w 15ml buforu PD z dodatkiem 0,1% BSA (wołowa albumina osocza) po czym taka zawiesina była znowu inkubowana 2,5 godziny. Po tym czasie złoże płukałem trzykrotnie 9ml buforu PD. Po ostatnim wirowaniu złoże zostało pozostawione na nocną inkubację w buforze PD w temperaturze 4°C. Po nocnej inkubacji złoże czterokrotnie płukałem 6ml buforu PD. Po ostatnim wirowaniu usuwałem supernatant i złoże zawieszałem w 3ml buforu PD.

### 3.8 Precypitacja kompleksów białkowych

Precypitację kompleksów białkowych przeprowadzałem z wykorzystaniem oczyszczonego wcześniej białka fuzyjnego Isu1-GST z wprowadzonym fragmentem S-transferazy glutationu w buforze PD (40mM HEPES-KOH pH 7.5, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT, 10mM MgCl<sub>2</sub>). Sumaryczna objętość mieszaniny reakcyjnej zawierającej analizowane białka wynosiła 150μl. Podczas analizy oddziaływania białek systemu Hsp70 z białkiem Isu1-GST niezbędna była obecność ATP w stężeniu końcowym wynoszącym 2mM. Po dodaniu ATP mieszaniny reakcyjne były inkubowane przez 15 minut w temperaturze 25°C. Po inkubacji pobierałem 7,5μl z zawartości probówek i mieszałem z 7,5μl dwukrotnie stężonego buforu Laemmli w celu przygotowania próbek na żel reprezentujących referencyjną pierwotną zawartość mieszaniny reakcyjnej (*ang. load control*). W następnej kolejności reszta mieszaniny reakcyjnej była dodawana do probówek zawierających 40μl

wcześniej rozmieszanego złoza CL-4B opłaszczonego glutationem, zawieszzonego w buforze PD. Po dodaniu złoza próbki inkubowałem z rotacją w temperaturze 4°C przez godzinę. Po inkubacji próbki wirowałem 2 minuty z przyspieszeniem 1000g w wirówce z rotorem 12148 firmy Sigma. Po wirowaniu usuwałem supernatant i dodawałem 500μl buforu PD (40mM HEPES-KOH pH 7.5, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT, 10mM MgCl<sub>2</sub>) i ponownie wirowałem. Na następnym etapie przeprowadzałem trzykrotne płukanie 200μl buforu PD. Po ostatnim płukaniu usuwałem supernatant i dodawałem 20μl czterokrotnie stężonego buforu Laemmli. Tak przygotowane próbki gotowałem w temperaturze 100°C przez 10 minut i następnie wirowałem 5 minut z prędkością 14000 obr/min w wirówce z rotorem 12134 firmy Sigma. Po zwirowaniu wszystkich próbek przeprowadzałem analizę uzyskanych białek w wyniku precypitacji na żelach SDS-PAGE. Do tej analizy najczęściej wykorzystywałem komercyjne żełe Bolt™ 12% Bis-Tris Plus Gels 15-well. Rozdział elektroforetyczny z ich wykorzystaniem przeprowadzałem 35 minut przy napięciu 170V. Po rozdziale żełe były barwione z użyciem komercyjnego barwnika InstantBlue Protein Stain firmy Expedeon.

### 3.9 Pomiar aktywności ATPazowej

Pomiary wykonałem w oparciu o system sprzężonych enzymów (Nørby 1988). Na wstępie przygotowywałem dwie mieszaniny reakcyjne w buforze A (50mM HEPES pH 7.5, 150mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT). Pierwsza mieszanina reakcyjna zawierała białka mtHsp70, Isu1, Hsc20 i Mge1 odpowiednio w stężeniach 1μM, 1μM lub 10μM, 1μM, 1μM. Druga mieszanina zawierała 3-5U dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), 2-4U kinazy pirogronianowej (PK), 4mM kwas fosfoenolopirogronianowy (PEP), 0,5mM NADH i 2mM ATP. Obie mieszaniny były niezależnie inkubowane przez 4 minuty w temperaturze 25°C. Po inkubacji obie mieszaniny zostały zmieszane i tym samym reakcja pomiarowa została zainicjowana. Kinaza pirogronianowa przetwarza PEP na pirogronian, który następnie jest wykorzystywany przez LDH, do wytwarzania kwasu mlekowego, z jednoczesnym zużyciem NADH, którego spadek jest obserwowany przez spektrofotometr. Pomiar był prowadzony w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1cm. Spadek stężenia NADH w miarę jak jest zużywane jako substrat był rejestrowany z zastosowaniem spektrofotometru JASCO V-660 jako spadek absorbancji przy λ=340nm. Spadek stężenia NADH jest wprost proporcjonalny do spadku stężenia ATP w miarę jego hydrolizy. W oparciu o tę zależność możliwe jest obliczenie zmiany stężenia ATP w oparciu o poniższy wzór:

$$\Delta C = \frac{\Delta A_{340}}{\epsilon l}$$

$\Delta C$  oznacza zmianę stężenia ATP [M/min],  $\Delta A_{340}$  zmianę absorbancji przy długości fali 340nm,  $\epsilon$  oznacza molowy współczynnik ekstynkcji dla NADH równy 6440mol<sup>-1</sup>\*cm<sup>-1</sup>,  $l$  to długość drogi optycznej.

### 3.10 Dichroizm kołowy

Poszczególne białka były analizowane w buforze CD o składzie 20mM KPi pH 7.6, 80mM KCl. Stężenia analizowanych białek mtHsp70, Isu1-GST oraz Hsc20 wynosiły odpowiednio 5μM, 2μM i 3μM. Widma dichroizmu kołowego białek były analizowane w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1mm z wykorzystaniem spektrometru dichroizmu kołowego JASCO J-1500. Pomiar widma CD był został przeprowadzony przy

następujących parametrach pomiarowych:

Zakres długości fal 196-260nm;

Temperatura 20°C;

Szerokość wiązki 1nm;

Ilość akumulacji 4;

Szybkość pomiaru 50nm/min;

Interwał 0,1nm;

Uzyskiwane widma wyrażone w milistopniach były przeliczane na eliptyczność molową wyrażoną w  $10^3 \times \text{deg} \times \text{cm}^2 / \text{dmol}^{-1}$ .

W celu określenia stabilności oczyszczonych zmutowanych wersji białek oprócz analizy widma dichroizmu kołowego przeprowadzałem także pomiar ich temperatury topnienia. Pomiary temperatury topnienia zostały przeprowadzone także w aparacie JASCO J-1500 przy następujących parametrach pomiarowych:

Długość fali 220nm;

Temperatura 20-90°C;

Interwał 0,5°C/min;

Szerokość wiązki 1nm.

### 3.11 Wymiana deuterowa połączona ze spektrometrią mas (HDX-MS)

Przeprowadzona przez mgr Katarzynę Dąbrowską analiza wymiany deuterowej próbek białek Ssq1, Hsc20, Isu1 oraz ich kompleksów odbyła się z wykorzystaniem spektrometru mas Synapt G2-HDMS firmy Waters, sprzężonego z systemem ultra-sprawnej chromatografii cieczowej nanoACQUITY UPLC. Próbkki zostały 10-krotnie rozcieńczone w buforze zawierającym D<sub>2</sub>O o składzie 25mM HEPES-KOD pD 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT. Po rozcieńczeniu objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 50µl. Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej. Dla poszczególnych reakcji czasy inkubacji wynosiły odpowiednio 10s, 1min, 5min, 25min, 120min. Każda reakcja była powtarzana czterokrotnie. Reakcje były zatrzymywane poprzez przeniesienie mieszaniny reakcyjnej do 10µl schłodzonego buforu „stop” (2M glicyna, 4M chlorowodorek guanidyny, 1M TCEP; pD=2.4). Do czasu analizy próbki zostały zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C. Próbkki kontrolne o minimalnym i maksymalnym poziomie wymiany wódór-deuter zostały przygotowane odpowiednio przez rozcieńczenie białek bezpośrednio do schłodzonej mieszaniny buforu D<sub>2</sub>O i buforu STOP.

W celu wykonania analizy, rozmrożone próbki były nastrzykiwane do systemu HDX Manager i trawione w trakcie migracji przez kolumnę ze złożem, zawierającym immobilizowaną pepsynę (Poroszyme). Kolumna pepsynowa posiadała długość 30mm, średnicę wewnętrzną 2,1mm, porowatość złoża 500-10000Å, fazę stacjonarną stanowił usieciowany kopolimer polistyren-diwinylbenzen, dodatkowo faza stacjonarna była wypełniona immobilizowaną pepsyną. Fazę ruchomą stanowił roztwór 0,07% kwasu mrówkowego w wodzie, prędkość przepływu wynosiła 200µl/min. Preparaty po trawieniu były ładowane na prekolumnę C18 (Acquity BEH C18 VanGuard, 2,1mm x 5mm, średnica ziaren złoża 1,7µm, produkt firmy Waters) i rozdziel następował w 7-35% gradiencie acetonitrylu w 0,1% kwasie mrówkowym, z prędkością przepływu 90µl/min. Temperatura

cieczy, kolumn i zaworów była utrzymywana na poziomie 0,5°C przez system HDX Manager, z wyjątkiem kolumny zawierającej immobilizowaną pepsynę (13°C). Właściwa kolumna chromatograficzna była sprzężona z źródłem jonów tandemowego spektrometru mas Synapt G2-HDMS (ESI-Q-ToF z modułem IMS, służącym do pomiaru mobilności jonów w fazie gazowej). W celu wykrycia protonowanych lub deuterowanych cząsteczek, spektrometr był ustawiony w trybie dodatniej jonizacji typu elektrorozpylanie (ESI+). Kalibracja spektrometru została przeprowadzona z użyciem standardowych procedur. Widma masowe zostały uzyskane w zakresie 50-2000m/z. W celu uzyskania listy referencyjnej trawionych peptydów, procedurze trawienia podlegały też białka niepoddane wymianie deuterowej, z zachowaniem warunków takich jak w pomiarach z wymianą wodór-deuter.

### 3.12 Analiza bioinformatyczna

Przed wykonaniem doświadczeń HDX-MS wykonane zostało modelowanie struktury kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1 przez mgr Igora Grochowinę, mgr Łukasza Nierzwickiego i dr Bartłomieja Tomiczka. Modele homologiczne białka Isu1 i Ssq1 w konformacji otwartej zostały otrzymane z wykorzystaniem narzędzia I-TASSER (Zhang 2008). Model Ssq1 został przewidziany w oparciu o strukturę krystalograficzną bakteryjnego białka DnaK (PDB ID: 4JN4). Model Isu1 został przewidziany na podstawie struktury krystalograficznej bakteryjnego białka IscU (PDB ID: 3LVL). Wpierw otrzymane zostały dwa kompleksy podwójne, odpowiednio Ssq1-Hsc20 i Hsc20-Isu1. W przypadku obu kompleksów, do struktury krystalograficznej Hsc20 były dokowane modele homologiczne Ssq1 i Isu1 za pomocą narzędzia ClusPro (Kozakov i wsp., 2017), a następnie były symulowane najkorzystniejsze energetycznie kompleksy w pełnoatomowych, równowagowych symulacjach dynamiki molekularnej (MD). Po uzyskaniu struktur obu kompleksów podwójnych, na podstawie ich superpozycji został uzyskany model kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1. Do struktury Ssq1-Hsc20 zostało dostawione Isu1, na podstawie modelu kompleksu Hsc20-Isu1, z manualną korektą pozycji białek w programie VMD w celu usunięcia kolizji między atomami. Stworzony w ten sposób model kompleksu potrójnego został poddany trwającej 100ns relaksacji i następnie równowagowej symulacji MD w czasie 1μs. Otrzymana trajektoria MD została poddana analizie skupień z wykorzystaniem narzędzia gmx cluster z pakietu GROMACS. Krok czasowy analizowanej trajektorii wynosił 0,5ns, a struktury były skupiane w populacje konformacyjne gdy pierwiastek kwadratowy z średniego odchylenia kwadratowego (*ang. root-mean-square deviation, RMSD*) między strukturami był mniejszy niż 0,7nm. Symulacje dynamiki molekularnej potrójnego kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1 były prowadzone z wykorzystaniem pakietu GROMACS 5.1.4 (Abraham i wsp., 2015) z zaimplementowanym polem siłowym CHARMM36 (Huang i MacKerell 2013). Symulowany układ składał się z białek Ssq1, Hsc20, Isu1, nukleotydu ATP, pojedynczego jonu Mg<sup>2+</sup>, NaCl w stężeniu 0,15M i 82404 cząsteczek wody (model TIP3P). Symulacje były prowadzone z krokiem czasowym równym 2fs, w temperaturze 310K, utrzymywanej za pomocą algorytmu v-rescale, ciśnieniu 1bar, utrzymywanym za pomocą algorytmu Parrinello-Rahmana i z wykorzystaniem periodycznych warunków brzegowych. Zasoby obliczeniowe, konieczne do wykonania symulacji, zostały zapewnione przez infrastrukturę PL-Grid.

Następnie peptydy analizowane w doświadczeniach HDX-MS zostały zestawione z sekwencją aminokwasową białka i zostało określone pokrycie sekwencji peptydami (*ang. peptide coverage*). Mając odniesienie peptydów do sekwencji, następnie możliwe było nałożenie informacji uzyskanych z analizy peptydów na model strukturalny. Identyfikacja

peptydów została przeprowadzona przez mgr Igora Grochowinę oraz mgr Katarzynę Dąbrowską z wykorzystaniem oprogramowania ProteinLynx Global Server (PLGS, Waters) na podstawie przebiegów identyfikacyjnych białka nieznanego deuterem. Lista peptydów w PLGS była filtrowana na podstawie minimalnej intensywności (3000) i minimalnej liczby potomnych jonów na aminokwas (0,3). Lista peptydów, wraz z odpowiadającymi wartościami m/z, ładunku, czasu retencji i mobilności jonu, została wprowadzona do programu DynamX 3.0 (Waters), służącego do identyfikacji i określenia stopnia wymiany peptydów w deuterowanych próbkach na podstawie przedziału czasu retencji danego peptydu. Widma masowe były analizowane w zakresie czasu retencji od 1,8 do 8,1 min. Anotacja obwiedni izotopowych do każdego z analizowanych peptydów, uzyskana za pomocą programu została poddana manualnej weryfikacji. Przyrost masy peptydu w wyniku wymiany deuterowej był określany w programie DynamX przez odjęcie środka masy peptydów występujących w kilku stopniach naładowania, masy peptydów wyznaczone były jako średnia ważona mas peptydów względem intensywności sygnału w różnych stopniach naładowania. Widma masowe były eksportowane bezpośrednio z programu DynamX, w formie plików „state” i „cluster”. Następnie wyniki były dalej analizowane z wykorzystaniem programu HaDeX (Puchala i wsp., 2020) i skryptów w środowisku MATLAB opracowanych w laboratorium mojego zespołu. Różnice w stopniu wymiany deuterowej zostały naniesione na strukturalne modele białek w programie VMD (Humphrey i wsp., 1996). Wizualizacja danych liczbowych w postaci wykresów została wykonana w środowisku MATLAB.

### 3.13 Spektrometria masowa prążków uzyskanych po rozdiale elektroforetycznym SDS-PAGE

Przeprowadzona została elektroforeza w warunkach denaturujących SDS-PAGE zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.4. Po rozdiale i wybarwieniu żelu, ostrym nożem zostały wycięte fragmenty żelu z zabarwionymi prążkami zawierającymi białka. Następnie fragmenty żelu zostały wysłane do współpracującego z naszym zespołem Zakładu Spektrometrii Masowej w Warszawie, kierowanej przez Prof. Dadleza. Na wstępie fragmenty żelu zawierające białka zostały wysuszone acetonitrylem i poddane redukcji przez 30 minut w temperaturze 57°C poprzez inkubację z 10mM DTT w 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Cysteiny w strukturze białek zostały poddane alkilacji poprzez inkubację z 0,5M jodoacetamidem w 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (45 minut w ciemni, w temperaturze pokojowej). Po tym kroku białka były trawione przez noc z użyciem 10ng/μl trypsyny w 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. W następnej kolejności w celu zatrzymania procesu trawienia, do mieszaniny reakcyjnej był dodawany kwas trifluorooctowy do końcowego stężenia 0,1%. Następnie mieszanina reakcyjna była wirowana w temperaturze 4°C z prędkością 14000g przez 30 minut w celu usunięcia precypitatów. Analiza LC-MS została przeprowadzona z wykorzystaniem systemu nanoAcquity UPLC (Waters) podłączonego do pułapki Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). Spektrometr masowy był użytkowany w trybie MS2 zależnym od danych, dane zostały zebrane dla zakresu m/z od 300 do 2000. Peptydy były rozdzielane poprzez zastosowanie liniowego gradientu roztworów od 95% roztworu A (0,1% kwas mrówkowy w wodzie) do 35% roztworu B (acetonitryl i 0,1% kwas mrówkowy). Rozdział trwał 180 minut. Dane zostały poddane analizie z zastosowaniem serwera Mascot według następujących parametrów, enzym: Trypsyna; tolerancja dla masy jonów rodzicielskich: 20 ppm; tolerancja dla masy jonów fragmentarycznych: 0,1; pominięte cięcia: 1; stałe modyfikacje:



karbamidometylacja (C); zmienne modyfikacje: Utlenienie (M). Identyfikacje białek były zwalidowane z użyciem metody przeszukiwania „target-decoy”.

### 3.14 Natywna spektrometria masowa

Pomiary natywnej spektrometrii masowej zostały przeprowadzone w ramach współpracy przez dr Alexandra Moysa z Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. W ramach przygotowania próbek białek do natywnej spektrometrii masowej zostały one na wstępie poddane odsalaniu i wymianie buforu do zawierającego wyłącznie 100mM octan amonu. Wymiana buforu nastąpiła dzięki wykorzystaniu kolumn P-6 Micro BioSpin firmy Bio-Rad wcześniej zrównoważonych 100mM octanem amonu. Doświadczenia MS zostały przeprowadzone z użyciem spektrometru Q-TOF Synapt G2 HDMS firmy Waters. Próbkę została wprowadzona do spektrometru masowego z wykorzystaniem jonizacji typu nanoelektrozpylanie (nanoESI), z użyciem szklanych kapilar pokrytych złotem. Spektrometr masowy był skalibrowany do utrzymania natywnej struktury kompleksów białkowych. W celu utrzymania optymalnej transmisji jonów następujące parametry zostały ustawione: napięcie w kapilarze 1,4-1,6kV, stożek próbkowy 25-27V, stożek ekstrakcji 3V, temperatura źródła 30°C, energia kolizji z pułapką 15-30V, energia kolizji transferowej 5V. Ciśnienie utrzymane w instrumencie wynosiło 6-9 mbar oddolnie, 3,1mbar w komorze jonowej, 2,5mbar w komorze pułapki i 10-2mbar w komorze transferu.

## 4. WYNIKI

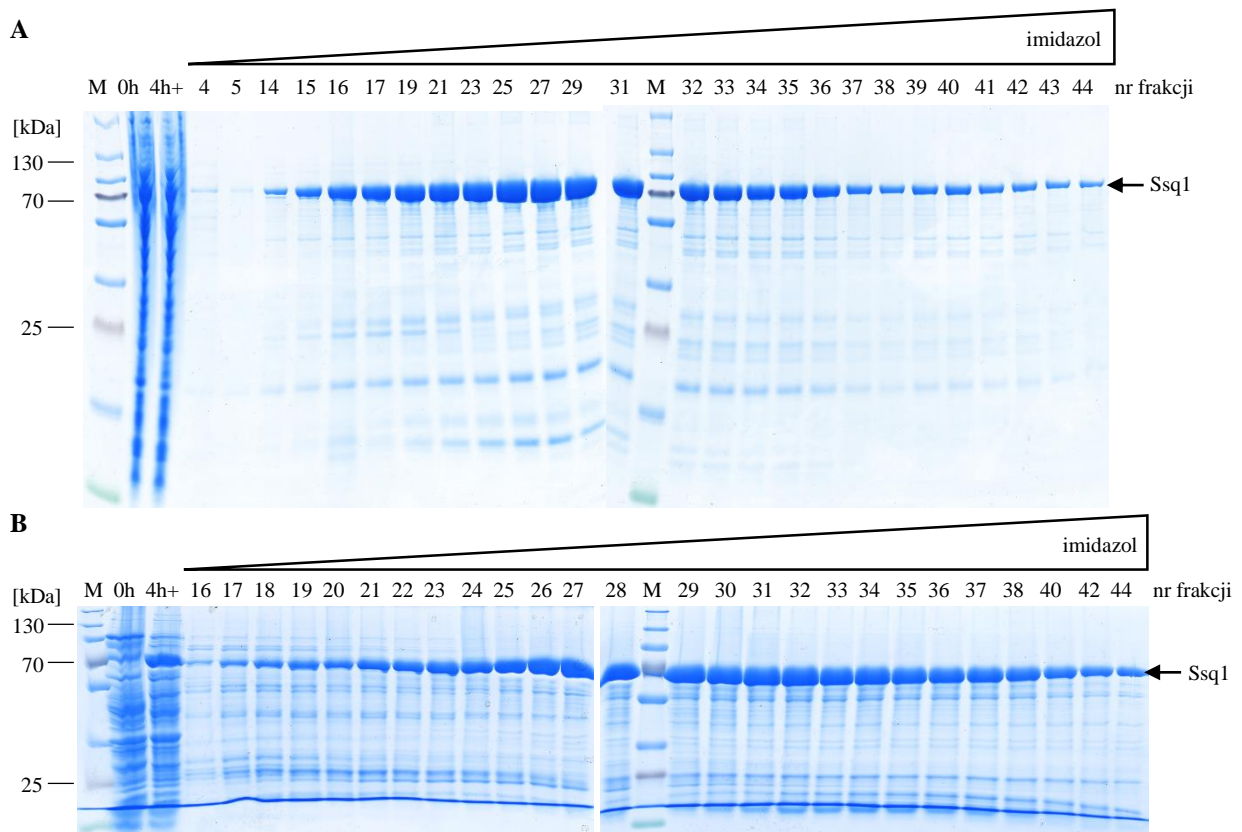
### 4.1 Oczyszczanie białek Isu1, Hsc20 oraz Ssq1

#### 4.1.1 Oczyszczanie białka Ssq1

Przystępując do realizacji projektu doktorskiego, na wstępie kluczowym było uzyskanie zestawu oczyszczonych preparatów białek. Uzyskanie preparatu białka Ssq1 wymagało koekspresji genu *SSQ1* oraz *HEP1* w bakteryjnym szczepie ekspresyjnym. W związku z tym podczas opracowywania procedury oczyszczania białka Ssq1 został wykorzystany plazmid pRSFDuet1-SSQ1/HEP, który zawierał geny *SSQ1* oraz *HEP1*. Nadprodukcja białka Ssq1 przy jednoczesnej nadprodukcji białka Hep1 pozwoliła na oczyszczanie mtHsp70 z zastosowaniem bakteryjnego systemu ekspresyjnego. Warto podkreślić istotną rolę białka Hep1 podczas nadprodukcji białka Ssq1. Dotychczasowa literatura wskazuje, że białko Ssq1 tak jak inne mtHsp70 wykazuje tendencję do agregacji. Tendencja do agregacji jest szczególnie zauważalna, gdy Ssq1 nie jest związane z żadnym nukleotydem. Pokazano, że główną rolą białka Hep1 jest stabilizacja domeny ATPazowej białka Ssq1 i ochrona przed degradacją przez proteazy. W doświadczeniach *in vitro*, gdy mieszanina reakcyjna zawierała białko Hep1, to jego obecność zapobiegała agregacji mtHsp70, niemniej nie prowadziła do dezagregacji gdy agregacja mtHsp70 już nastąpiła. Białko Hep1 stabilizuje mtHsp70, ale nie stymuluje jego aktywności ATPazowej, ani tempa wymiany nukleotydów. Jednocześnie gdy mtHsp70 wiąże ATP, to nie zaobserwowano oddziaływania z białkiem Hep1, przy czym wiązanie ATP stabilizuje mtHsp70 niezależnie od białka Hep1. Dlatego proponuje się, że Hep1 pełni rolę w ochronie *de novo* syntezowanych cząsteczek mtHsp70 i jego pośrednich konformacji, szczególnie między reakcjami kiedy mtHsp70 nie jest związane z nukleotydem (Sichting i wsp., 2005).

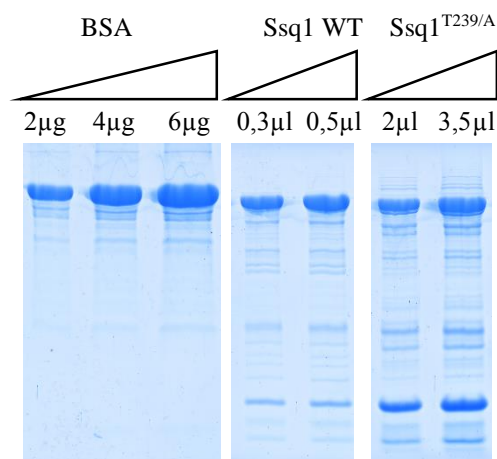
Nadprodukowane w bakteriach białko Ssq1 zawiera sześć reszt histydynowych, dołączonych do C-końca sekwencji białka, tak więc Ssq1 poprzez boczne pierścienie imidazolowe może wiązać koordynacyjnie jony niklu unieruchomione na złożu Ni-NTA, co umożliwiło specyficzne związanie białka do złoża. Gdy w buforze obecny jest imidazol, konkuruje on z białkiem o wiązanie do niklu (Hochuli i wsp., 1987). Stosując gradient imidazolu z wzrastającym liniowo jego stężeniem, eluowałem związane ze złożem Ni-NTA białka.

Białko Ssq1<sub>His</sub> typu dzikiego było obecne w największym stężeniu we frakcjach 15-36 (Ryc. 12). Tą samą procedurę wykorzystywałem także podczas oczyszczania zmutowanych wersji białka Ssq1 z pojedynczymi substytucjami. Podczas doświadczeń, których celem była analiza strukturalna kompleksu białka Ssq1 z białkiem współpracującym typu J – Hsc20 oraz substratem, białkiem Isu1, niezbędne było zastosowanie wersji Ssq1 z mutacją T239/A, która uniemożliwia hydrolizę ATP przez białko Hsp70. W przypadku oczyszczania mutantu Ssq1<sup>T239/A</sup> białko było obecne w największym stężeniu we frakcjach 21-40 (Ryc. 12).



**Ryc.12 Oczyszczanie białek Ssq1 WT i Ssq1<sup>T239/A</sup> na złożu Ni-NTA**

Białka A: Ssq1 WT i B: Ssq1<sup>T239/A</sup> związane ze złożem eluowałem liniowym gradientem imidazolu (20mM-250mM). Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie. M-wzorzec masowy, 0h i 4h+ próbki lizatu komórkowego pobrane w czasie 0 i po 4 godzinach po indukcji IPTG.



**Ryc.13 Ocena stężenia oczyszczonych białek Ssq1 WT i Ssq1<sup>T239/A</sup>**

Na analizowane żele na pierwsze trzy ścieżki naniosłem wzorcowy roztwór BSA, który zawierał odpowiednio 2μg, 4μg i 6μg. Następne dwie ścieżki zawierają odpowiednio 0,3μl oraz 0,5μl dzikiej wersji białka Ssq1 oraz kolejne dwie z mutacją T239/A, w tym przypadku na żel naniosłem 2μl i 3,5μl oczyszczonego białka. Wyznaczone metodą densytometryczną stężenie dla Ssq1 WT wyniosło 7,19 mg/ml, natomiast stężenie Ssq1 T239/A wyniosło 1,14 mg/ml. Białka w żelu zostały rozdzielane metodą SDS-PAGE, który następnie barwiłem Coomassie.

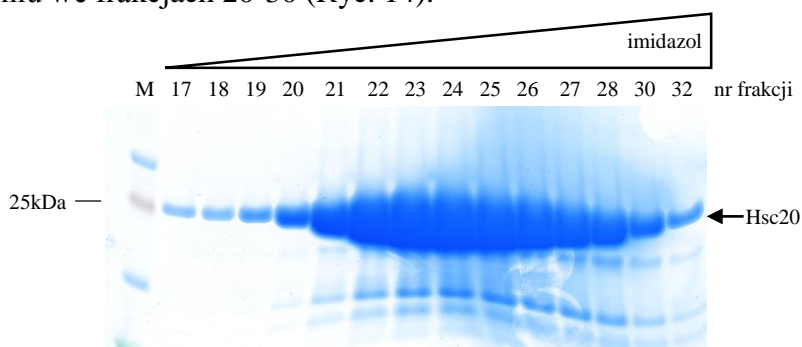
Poszczególne preparaty po oczyszczaniu na złożu Ni-NTA zagęszczałem i potem dializowałem. Analiza densytometryczna uzyskanych białek (Ryc. 13) pozwoliła mi na określenie stężeń preparatów Ssq1 WT oraz Ssq1<sup>T239/A</sup>, odpowiednio otrzymałem 6ml o stężeniu 7,19 mg/ml i 6ml o stężeniu 1,14 mg/ml.

Porównanie wydajności oczyszczania obu wariantów Ssq1, jednoznacznie wskazuje, że opracowana procedura oczyszczania funkcjonuje znacznie lepiej dla białka typu dzikiego. W przypadku wariantu z mutacją T239/A charakteryzuje się on dużo niższym stężeniem oraz wykazywał tendencję do precypitacji.

#### 4.1.2 Oczyszczanie białka Hsc20

Dotychczasowa literatura jednoznacznie wskazuje, że białkiem pomocniczym zawierającym domenę J, współpracującym z Ssq1 jest Hsc20 (Kampinga i Craig 2010). Dlatego w następnej kolejności oczyściłem to białko. Procedura oczyszczania została przeprowadzona na podstawie protokołu opracowanego przez dr Rafała Dutkiewicza (Dutkiewicz i wsp., 2003). W ten sam sposób oczyszczałem także zmutowane warianty białek Hsc20. Podczas oczyszczania wykorzystałem plazmid pET21d, w którym gen *HSC20* został wklonowany pod kontrolę promotora T7. W związku z tym białko izolowałem ze szczepu bakteryjnego *E. coli* C41 (DE3) niosącego gen polimerazy RNA faga T7. W stosowanym szczepie gen ten znajdował się pod kontrolą promotora lacUV5, silnie indukowanego IPTG. Poziom ekspresji genu *HSC20* był proporcjonalny do ilości cząsteczek polimerazy, której produkcja została zaindukowana przez IPTG. Aby ułatwić izolację białka z hodowli bakteryjnej, na C-końcu jego sekwencji wprowadzono ponownie znacznik histydynowy o długości sześciu aminokwasów. Po zaindukowaniu nadprodukcji białka 1mM IPTG, bakterie *E. coli* C41 (DE3) (Miroux i Walker 1996) hodowałem 3 godziny w optymalnej dla *Escherichia coli* temperaturze 37 °C. Po liczbie komórek i osadzeniu nierozpuszczalnych składników lizatu zawierający rozpuszczalne białka supernatant oczyszczałem metodą

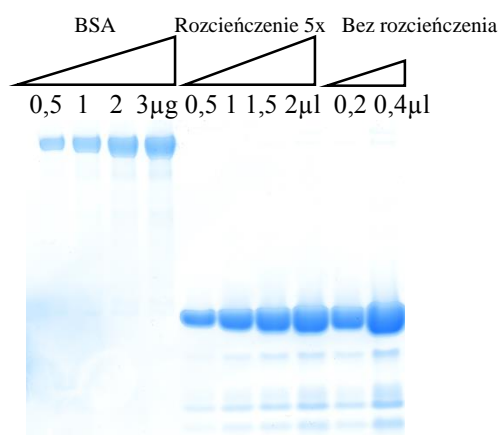
chromatografii powinowactwa na 2,5 ml złożu Ni-NTA. Niemniej przed chromatografią ze względu na wysoką stabilność białka Hsc20, w celu wstępnego oczyszczenia poddałem uzyskany lizat wysalaniu siarczanem amonu. W wyniku tej procedury białko Hsc20 wytrącało się w osadzie, a część zanieczyszczeń pozostała w formie rozpuszczalnej. Po wirowaniu osad zawierający białko Hsc20 ponownie rozpuszczałem i dializowałem do buforu, w którym był przeprowadzany kolejny etap oczyszczania. Ponieważ białko posiadało znacznik histydynowy na C-końcu sekwencji, mogłem oczyszczać je na złożu Ni-NTA. Białka eluowałem z kolumny liniowym, rosnącym gradientem imidazolu. Białko Hsc20 znajdowało się w znacznym stężeniu we frakcjach 20-30 (Ryc. 14).



**Ryc.14 Oczyszczanie białka Hsc20 na złożu Ni-NTA**

*Białko Hsc20 związane ze złożem eluowałem liniowym gradientem imidazolu (30mM-300mM). Na żel naniósłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy*

Uzyskane frakcje były czyste, w związku z tym połączyłem frakcje 20-30 i zagęściłem, stosując filtr Amicon® Ultra – 15 o MWCO=10kDa. Tak uzyskany preparat dializowałem wobec buforu końcowego (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 10% glicerol, 5mM β-merkaptotanol), rozporcjowałem, zamroziłem w ciekłym azocie i przechowywałem w temperaturze -80°C do czasu późniejszego wykorzystania. W następnej kolejności przeprowadziłem analizę densytometryczną, która wykazała, że uzyskany preparat Hsc20 charakteryzuje się stężeniem 19,78mg/ml. Łączna objętość uzyskanego preparatu wyniosła 3ml (Ryc.15).



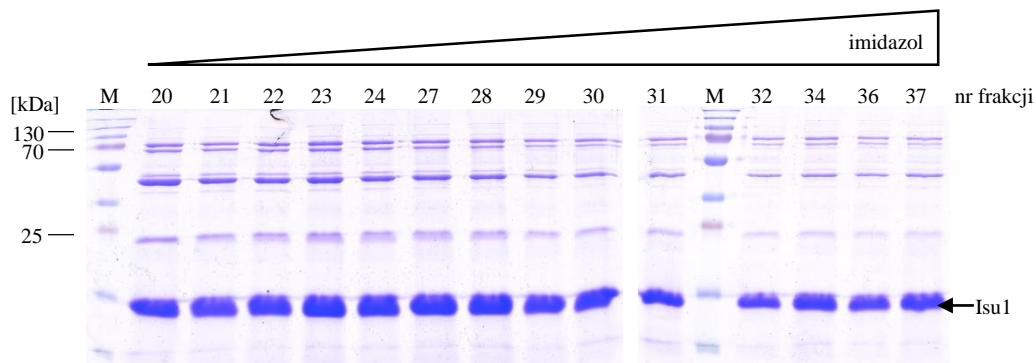
**Ryc.15 Ocena stężenia oczyszczonego białka Hsc20 WT**

*Na pierwsze cztery ścieżki naniósłem wzorcowy preparat BSA, odpowiednio 0,5µg, 1µg, 2µg oraz 3µg. Następnie opisane są ścieżki zawierające białko Hsc20, na żelu analizowane było jego 5-krotne rozcieńczenie. Na żel naniósłem odpowiednio 0,5µl, 1µl, 1,5µl oraz 2µl. Ostatnie dwie ścieżki zawierają 0,2µl i 0,4µl nierozcieńczonego preparatu Hsc20. Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała, że stężenie uzyskanego białka Hsc20 wynosi 19,78 mg/ml. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem następnie Coomassie.*

### 4.1.3 Oczyszczanie białka Isu1

Jedynym do tej pory zidentyfikowanym substratem dla systemu białek opiekuńczych Ssq1-Hsc20, który jest jednocześnie białkiem kluczowym do prawidłowego funkcjonowania procesu biogenezy centrów FeS, jest białko Isu1. Białko to pełni rolę molekularnego rusztowania w obrębie, którego syntezowane są centra FeS przed ich transferem do docelowych białek akceptorowych (Schilke i wsp., 2006).

Gen *ISU1* został wklonowany pod kontrolę promotora T7 w plazmidzie pET21d. Białko Isu1 nadprodukowałem w wykorzystywanym poprzednio do nadekspresji genu *HSC20* systemie bakteryjnym – szczepie *E. coli* C41(DE3). Białko izolowałem z 6 litrowej płynnej hodowli bakterii *E. coli* C41(DE3) transformowanych plazmidem pET21dISU1. Po dodaniu IPTG do stężenia końcowego 1 mM, bakterie inkubowałem kolejne 3 godz. w 30 °C. Białko Isu1 posiadało znacznik histydynowy na C-końcu sekwencji, tak więc mogłem je oczyszczać na złożu Ni-NTA. Isu1 zostało wyeluowane z kolumny w znacznym stężeniu we frakcjach 20-37 (Ryc. 16). Wszystkie te analizowane frakcje następnie połączyłem.



**Ryc.16 Oczyszczanie Isu1-His**

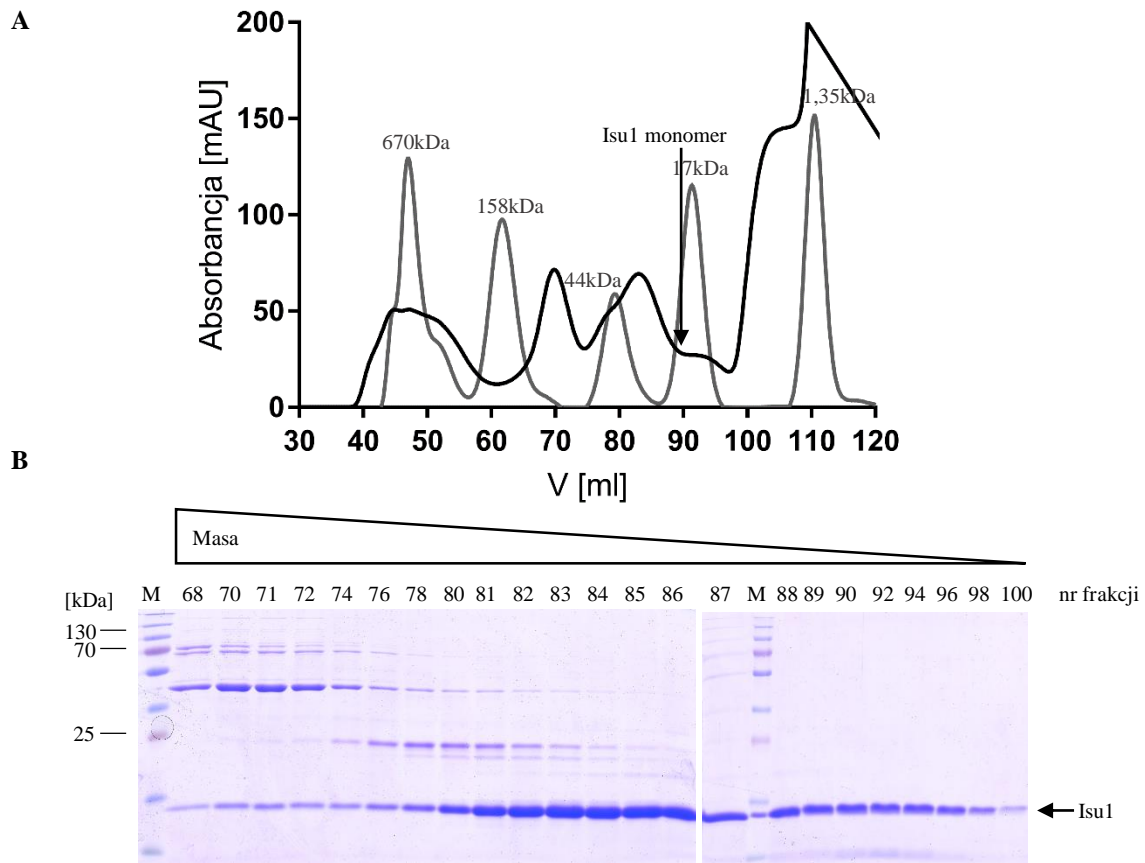
*Białko Isu1 związane ze złożem eluowałem liniowym gradientem imidazolu (50mM-500mM). Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie. M-wzorzec masowy.*

Uzyskanie dużej ilości prawidłowo ustrukturyzowanego Isu1 jest trudne do wykonania. Istnieje kilka powodów, które na to wpływają. Po pierwsze, Isu1 to białko charakteryzujące się niską stabilnością, co znacznie utrudnia jego nadprodukcję i oczyszczanie. Jednym z czynników stabilizującym strukturę Isu1 jest obecność centrum FeS co w przypadku homologów bakteryjnych wykazano w doświadczeniach w oparciu o pomiary dichroizmu kołowego (Iametti i wsp., 2015). Jednakże centra FeS wiązane są przez Isu1 jedynie przejściowo. Oznacza to, że w trakcie oczyszczania białka Isu1, centra oddysocjują, co powoduje jego destabilizację, a co za tym idzie, prowadzi do agregacji określonej puli uzyskanego Isu1. W związku z tym, w celu uzyskania ustrukturyzowanej formy białka Isu1 z *Saccharomyces cerevisiae* przeprowadziłem sączenie molekularne uzyskanego preparatu z wykorzystaniem złoża HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade. Głównym celem tego kroku była oddzielenie frakcji monomerycznej Isu1 od frakcji agregatów.

Najczystsze frakcje Isu1 uzyskane po chromatografii powinowactwa połączyłem i dializowałem do buforu GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM



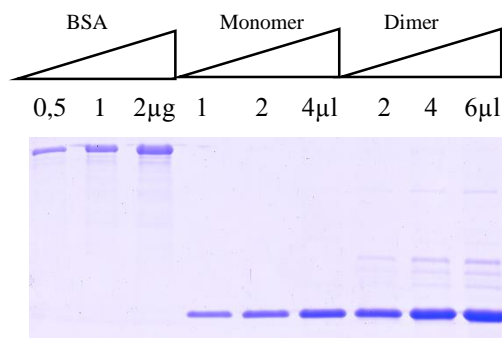
DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>). Po dializie preparat inkubowałem z DTT, ATP i MgCl<sub>2</sub>, a następnie zwirowałem w celu usunięcia makroskopowych agregatów. Tak przygotowany preparat poddałem sączeniu molekularnemu. Podczas rozdziału z użyciem kolumny HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, na bieżąco rejestrowałem krzywą absorbancji przy długości fali 280nm (Ryc. 17).



### Ryc.17 Sączenie molekularne białka Isu1-His

Sączenie molekularne białka Isu1-His na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, A: wykres absorbancji przy długości fali 280nm uzyskany podczas rozdziału chromatograficznego. Czarna linia przedstawia przebieg sączenia białka Isu1, a szara linia odpowiada przebiegowi sączenia wzorców masowych których szczyty zostały opisane odpowiadającą im masą. Szczyt obejmujący populację dimeru Isu1 przypada na frakcję 84 (dimer Isu1 obejmuje frakcje 82-87), natomiast monomer Isu1 przypadał na frakcje 88-100 sączenia molekularnego. B: analiza uzyskanych frakcji z sączenia molekularnego na żelach SDS-PAGE. Poszczególne ścieżki są podpisane numerami frakcji z rodzaju, których próbki były rozdzielane w żelu poliakrylamidowym. Na żel naniósłem 10 $\mu$ l frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy

Sączenie molekularne pozwoliło mi wyróżnić dwie populacje białka Isu1. Pierwsza o masie odpowiadającej masie monomeru Isu1 (frakcje 88-100) i o masie, która odpowiada dimerowi białka Isu1 (frakcje 82-87). Obie populacje zebrałem osobno i zagęściłem (ocena stężenia została przedstawiona na Ryc. 18).

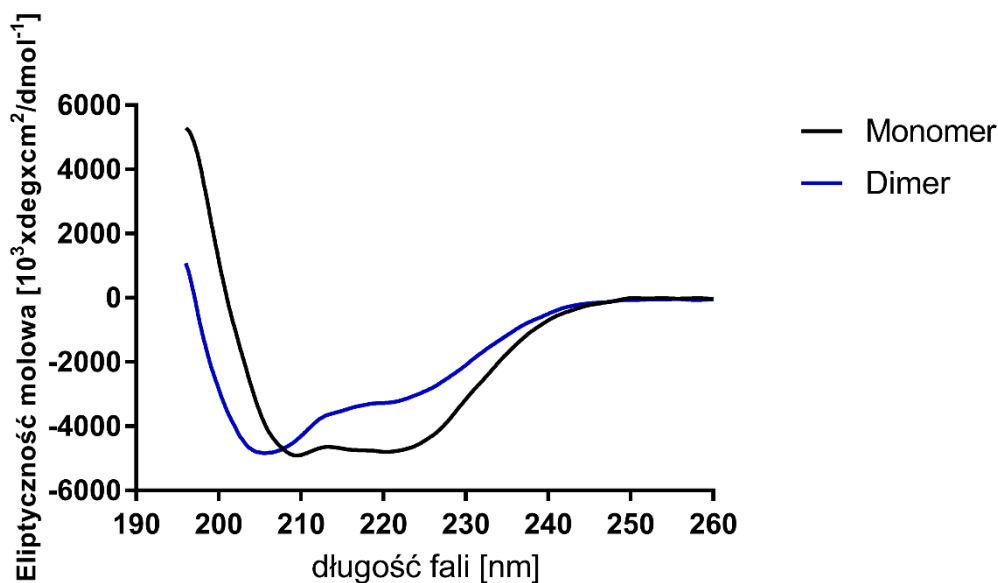


**Ryc.18 Ocena stężenia oczyszczonego białka Isu1-His**

Pierwsze trzy ścieżki przedstawiają wzorcowy preparat BSA, odpowiednio 0,5µg, 1µg, oraz 2µg. Następnie opisane są ścieżki zawierające białko Isu1. Pierwsze ścieżki przedstawiają monomer, na żelu analizowałem odpowiednio 1µl, 2µl, oraz 4µl preparatu. Z kolei ostatnie trzy ścieżki zawierają 2µl, 4µl oraz 6µl preparatu dimeru Isu1. Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała, że stężenie uzyskanego monomeru wynosi 1,11 mg/ml, natomiast stężenie dimeru wynosi 1,21mg/ml. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie.

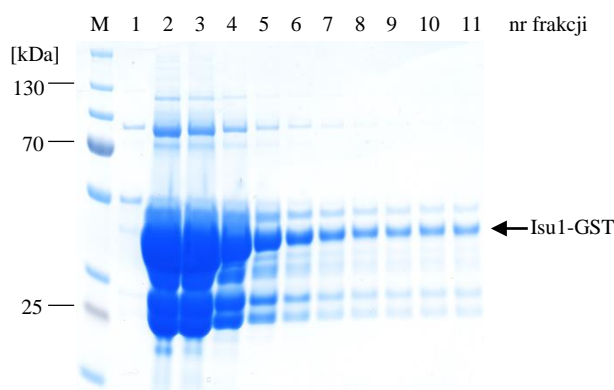
W przypadku obu populacji przeprowadziłem analizę ich struktury z wykorzystaniem spektrometru dichroizmu kołowego CD (*ang. circular dichroism*). W przypadku prawidłowo zwiniętego białka spodziewałem się zaobserwować kształt widma odpowiadający strukturze  $\alpha$  – helisy, gdyż jest to główna składowa struktury drugorzędowej Isu1. Uzyskany wynik analizy przedstawiony na rycinie 19 jednoznacznie wskazuje, że widmo monomeru Isu1 jest typowe dla widm białek znanych z literatury, w których  $\alpha$  – helisa stanowi dominującą strukturę (Kelly i wsp., 2005). Natomiast widmo Isu1, które migrowało jako dimer nie wykazuje już cech typowych dla widma  $\alpha$  heliakalnego białka. Te wyniki sugerują, że monomer Isu1 jest bardziej ustrukturyzowany w stosunku do dimeru białka. I ta forma białka była wykorzystywana podczas późniejszych analiz wymiany wodoru na deuter (HDX-MS) monitorowanej z zastosowaniem spektrometrii mas (MS).

Oprócz Isu1 ze znacznikiem histydynowym oczyściłem też wariant białka Isu1 z fragmentem S-transferazy glutationu (*ang. glutathione S transferase, GST*). Znacznik GST wykazuje zdolność do wiązania zredukowanego glutationu. W doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych użycie złoża opłaszczonego zredukowanym glutationem pozwala na specyficzne związanie białka fuzyjnego zawierającego znacznik GST i pozostałych oddziałujących ze znakowanym białkiem białek partnerskich. Ten sam mechanizm wiązania się do glutationu wykorzystałem do oczyszczenia białka Isu1-GST, stosując złożo CL-4B opłaszczone zredukowanym glutationem. Zastosowałem standardową procedurę nadprodukcji Isu1 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Lizat uzyskany z pojedynczej hodowli pozwalał na trzykrotny rozdział białek na złożu z wysoką powtarzalnością. Na rycinie 20 przedstawiłem żel poliakrylamidowy z przykładowego oczyszczenia.



**Ryc.19** Porównanie widm eliptyczności molowej monomerów i dimerów ScIsu1<sub>His</sub>

Wykres przedstawiający widmo CD wyrażone w jednostkach eliptyczności molowej uzyskane w ramach analizy przeprowadzonej z zastosowaniem spektrometru dichroizmu kołowego (ang. circular dichroism, CD) monomeru i dimeru Isu1. Stężenia obu form białka ScIsu1 w eksperymentach CD wynosiło 22,5 μM. Warunki doświadczenia zostały opisane w rozdziale Metody 3.10.

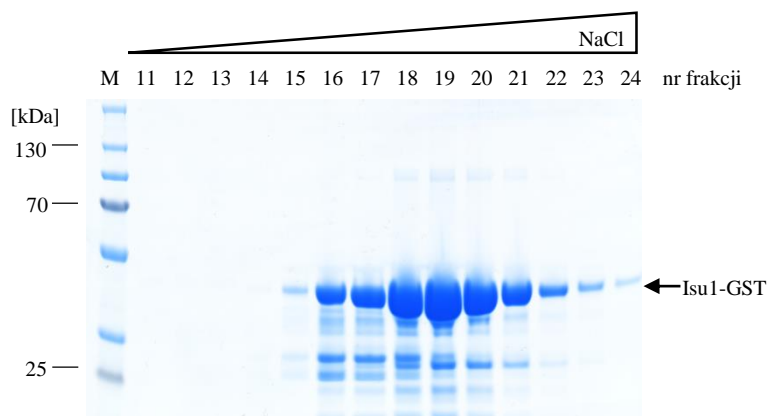


**Ryc.20** Oczyszczanie Isu1-GST z użyciem złoża CL-4B opłaszczonego zredukowanym glutationem

Białko Isu1-GST związane ze złożem eluowałem buforem zawierającym zredukowany glutation w stężeniu 50mM. Na żel naniósłem 5 μl z uzyskanych frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Ponieważ w tym przypadku preparat charakteryzował się znacznym stopniem zanieczyszczenia, po połączeniu najczystszych frakcji, białko Isu1-GST było w następnej kolejności oczyszczane na złożu CM-Sepharose (Ryc.21), które jest kationowymieniaczem.

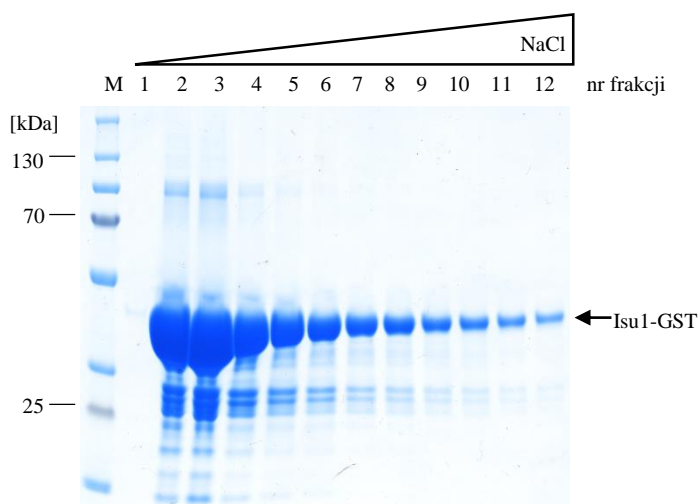




### Ryc.21 Oczyszczanie Isu1-GST z użyciem złoża CM-Sepharose

*Białko Isu1-GST związane ze złożem eluowałem liniowym gradientem NaCl (25mM-600mM). Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie. M-wzorzec masowy.*

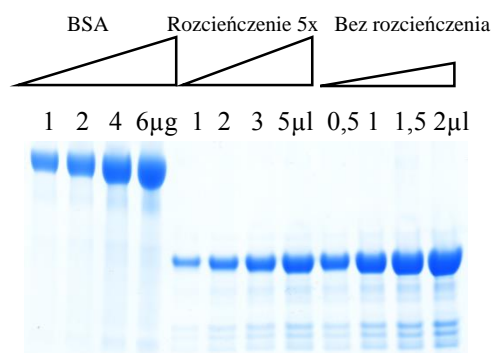
Po oczyszczeniu na kolumnie ze złożem CM-Sepharose ostatnim złożem, które wykorzystałem podczas oczyszczania było Q-Sepharose (Ryc. 22). Złoże Q-Sepharose to anionit, tak więc rozdział białek podczas elucji, podobnie jak w poprzednim kroku oczyszczania, z kolumny jest zależny od ich ładunku powierzchniowego.



### Ryc.22 Oczyszczanie Isu1-GST z użyciem złoża Q-Sepharose

*Białko Isu1-GST związane ze złożem eluowałem liniowym gradientem NaCl (50mM-600mM). Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie. M-wzorzec masowy.*

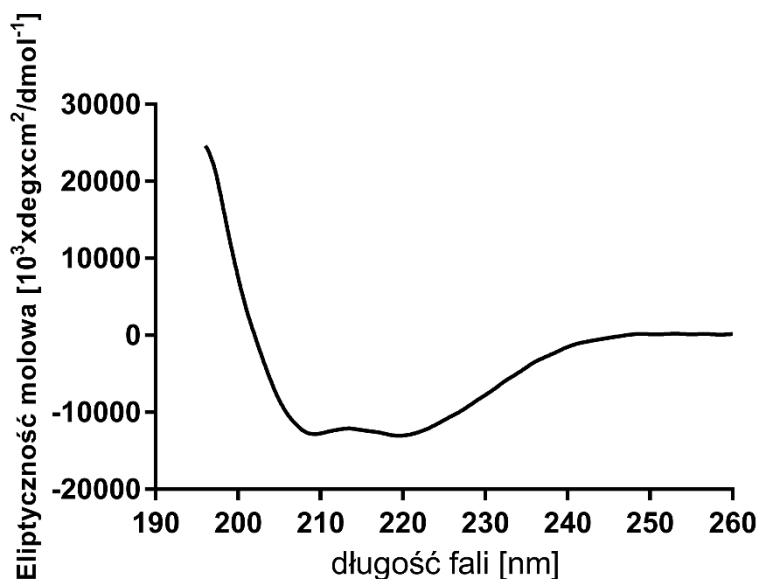
Po elucji rosnącym gradientem soli białko Isu1 w odpowiednim stężeniu otrzymałem we frakcjach 2-8. Frakcje połączyłem i przeprowadziłem ich dializę wobec buforu końcowego. Po dializie preparat Isu1-GST porcjaowałem, zamroziłem w ciekłym azocie i przechowywałem w -80°C.



### Ryc.23 Ocena stężenia oczyszczonego białka Isu1-GST

Pierwsze cztery ścieżki przedstawiają wzorcowy preparat BSA, odpowiednio 1µg, 2µg, 4µg oraz 6µg. Następnie opisane są ścieżki zawierające białko Isu1-GST. Na żelu było analizowane jego 5-krotne rozcieńczenie, odpowiednio na ścieżki naniosłem 1µl, 2µl, 3µl oraz 5µl rozcieńczonego preparatu. Ostatnie cztery ścieżki zawierają 0,5µl, 1µl, 1,5µl i 2µl nierozcieńczonego preparatu Isu1-GST. Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała, że stężenie uzyskanego białka Isu1-GST wynosi 3,07 mg/ml. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie.

Analiza densytometryczna (Ryc.23) wykazała, że stężenie uzyskanego preparatu wynosi 3,07mg/ml. Łącznie uzyskałem 3,5ml Isu1-GST. Białko z dużym znacznikiem GST charakteryzuje się mniejszą tendencją do agregacji, przeprowadzona analiza dichroizmu kołowego jednoznacznie wskazuje, że uzyskany preparat Isu1-GST charakteryzuje się widmem typowym dla białek, w których  $\alpha$ -helisa stanowi dominującą strukturę (Ryc.24).



### Ryc.24 Widmo dichroizmu kołowego białka ScIsu1-GST

Wykres przedstawiający widmo CD białka ScIsu1-GST wyrażone w jednostkach molowej eliptyczności. Stężenie białka podczas pomiaru wynosiło 2µM.

## 4.2 Treonina T239 pełni kluczową rolę w aktywności ATPazowej białka Hsp70

W Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej, w której realizowałem projekt badawczy, od wielu lat prowadzone są badania mające na celu poznanie roli mitochondrialnego systemu

Hsp70 w biogenezie FeS (Dutkiewicz i wsp., 2017). Dotychczas badania te prowadziliśmy z zastosowaniem drożdży *S. cerevisiae* jako modelowego organizmu pozwalającego na łączenie technik biochemicznych z badaniami *in vivo*. Opracowaliśmy system zrekonstruowany z oczyszczonych białek, który pozwolił nam na badanie oddziaływań pomiędzy Isu1, a Hsc20 oraz Ssq1 (Kleczewska i wsp., 2020). Wykazaliśmy również w jaki sposób Hsc20 umożliwia wydajne wiązanie Isu1 przez Ssq1 (Ciesielski i wsp., 2012). Uzyskane wyniki zweryfikowaliśmy *in vivo* pokazując, że zaburzenie oddziaływań pomiędzy Hsc20:Isu1:Ssq1 prowadzi do zahamowania syntezy FeS w komórkach drożdży (Ciesielski i wsp., 2012). Nasze dotychczasowe prace sugerują, że białka Hsc20/mtHsp70 zaangażowane w mitochondrialną biogenezę FeS funkcjonują zgodnie z mechanizmem typowym dla innych systemów Hsp70 pełniących różnorodne funkcje komórkowe, takie jak: fałdowanie polipeptydów, transport białek przez błony, reorganizacja kompleksów białkowych. Mechanizm ten opiera się na odwracalnym wiązaniu substratu białkowego przez Hsp70 w reakcji zależnej od hydrolizy ATP. Przy czym białko zawierające domenę J, w tym przypadku Hsc20, wiąże substrat (Isu1) niezależnie od mtHsp70 i dostarcza go do swojego partnera jednocześnie stymulując jego aktywność ATPazową. To skutkuje powstaniem kompleksu mtHsp70-Isu1, z którego oddysocjowuje białko Hsc20.

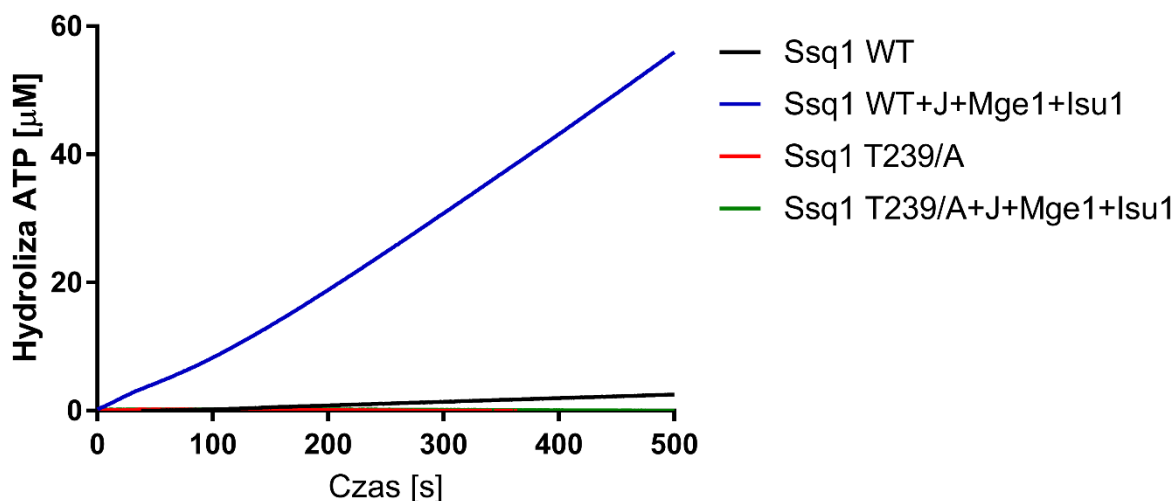
Wspomniane białka tworzą krótkotrwały kompleks potrójny, w którym dochodzi do stymulacji aktywności ATPazowej białka Ssq1. W wyniku hydrolizy ATP białko Ssq1 zmienia konformację i następuje dysocjacja białka Hsc20. Przy braku czynnika wymiany nukleotydów – białka Mge1 nie dochodzi do wymiany ADP na ATP, więc białko Ssq1 pozostaje w tej samej konformacji, związane z Isu1. „Przejęciowy” stan kompleksu potrójnego jest poważnym utrudnieniem w badaniach strukturalnych.

Niemniej badania dotyczące analogicznego bakteryjnego systemu Hsp70, który jest dedykowany do udziału w procesie biogenezy centrów FeS, wykazały, że treonina w pozycji 212 w obrębie białka HscA jest wysoce konserwowana ewolucyjnie. Lokalizacja tej treoniny obejmuje miejsce wiązania nukleotydu i zmiana tego aminokwasu obniża aktywność ATPazową względem białka typu dzikiego (Bonomi i wsp., 2008). Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla białka bakteryjnego postanowiłem wykorzystać w moich badaniach analogicznego mutantu białka drożdżowego.

Na podstawie analizy filogenetycznej została wytypowana reszta 239 białka Ssq1 i został przygotowany mutant w którym treonina została zamieniona na alaninę. Wersję białka Ssq1<sup>T239/A</sup> oczyściłem i analizę stężenia uzyskanego preparatu przedstawiłem na Ryc. 13 w rozdziale 4.1.

W następnej kolejności sprawdziłem aktywność ATPazową oczyszczonego białka Ssq1<sup>T239/A</sup>. W tym celu przeprowadziłem doświadczenia, w których badałem szybkość hydrolizy ATP przez Ssq1 w warunkach równowagi. W tych warunkach reakcja obejmuje cykl: wiązania ATP, hydrolizy ATP i dysocjacji produktów reakcji, czyli ADP i nieorganicznego fosforu. Aktywność ATPazy w warunkach równowagi była mierzona dla 1  $\mu$ M Ssq1 przy stężeniu ATP wynoszącym 1mM. W tych samych warunkach aktywność białka Ssq1<sup>T239/A</sup> była poniżej progu detekcji (Ryc. 25). Na kolejnym etapie został przeprowadzony pomiar szybkości ATPazy białka Ssq1 w obecności obu białek pomocniczych, białka Hsc20 i Mge1 oraz substratu Isu1. W tych warunkach dochodzi do znacznej stymulacji aktywności ATPazowej białka Ssq1 WT i szybkości hydrolizy ATP.

Natomiast w przypadku białka zmutowanego Ssq1<sup>T239/A</sup> mierzona wartość szybkości hydrolizy ATP w obecności kompletu białek pomocniczych i substratu była ponownie poniżej progu detekcji (Ryc. 25). Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie potwierdziły, że białko Ssq1 z mutacją T239/A nie wykazuje zdolności do hydrolizy ATP.

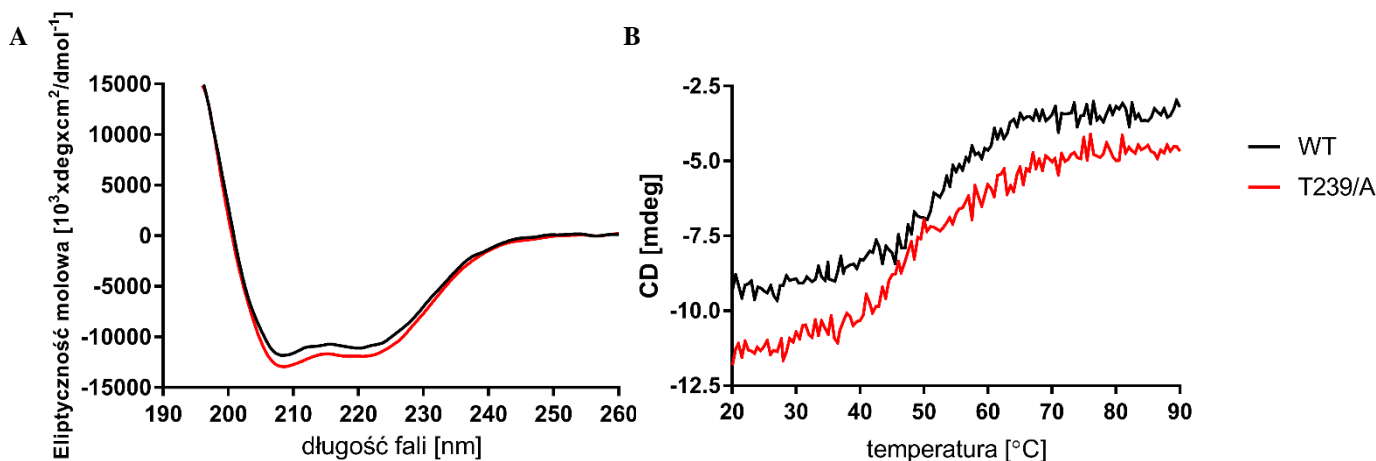


**Ryc.25 Wpływ mutacji T239/A na aktywność ATPazową białka Ssq1**

*Analiza hydrolizy ATP przez białko Ssq1 WT i Ssq1<sup>T239/A</sup>. Czarna linia oznacza hydrolizę przez 1 μM Ssq1 WT, niebieską, kiedy mieszanina zawierała dodatkowo równomolowe ilości obu białek pomocniczych – Hsc20 oraz Mge1, a także substrat Isu1. Natomiast czerwona linia przedstawia poziom hydrolizy ATP przez zmutowaną wersję białka Ssq1<sup>T239/A</sup>, a zielona kiedy były obecne dodatkowo białka pomocnicze oraz substrat. W przypadku zastosowania Ssq1<sup>T239/A</sup> nie obserwowalem hydrolizy ATP nawet gdy mieszanina reakcyjna zawierała komplet białek uczestniczących w cyklu ATPazowym białka Ssq1.*

Wyniki eksperymentalne potwierdziły, że mutacja T239/A w obrębie białka Ssq1 prowadzi do defektu jego aktywności ATPazowej, białko nie hydrolizuje ATP nawet w optymalnych warunkach, kiedy w mieszaninie reakcyjnej są obecne oba białka pomocnicze – Hsc20 i Mge1, oraz substrat – Isu1. W związku z tymi obserwacjami interesujące było zweryfikowanie hipotezy, czy mutacja T239/A prowadząca do braku hydrolizy ATP przez Ssq1 jednocześnie pozwoli na uchwycenie przejściowego stanu cyklu ATPazowego Ssq1, jakim jest kompleks mtHsp70:Hsc20:Isu1-GST.

Niemniej na wstępie zadałem pytanie czy zaobserwowany brak aktywności nie wynika z defektów w obrębie struktury białka Ssq1. Aby odpowiedzieć na to pytanie przeprowadziłem analizę widma dichroizmu kołowego zmutowanej wersji białka Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz porównałem uzyskane widmo z widmem białka typu dzikiego Ssq1 WT (Ryc. 26).



**Ryc.26** Analiza białek Ssq1 WT i Ssq1<sup>T239/A</sup> z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego

Rycina A przedstawia widmo CD białka ScSsq1 typu dzikiego i jego wariantu z mutacją T239/A wyrażone w jednostkach molowej eliptyczności. Stężenie białek we wszystkich doświadczeniach wynosiło 1,5μM.

Rycina B przedstawia przebiegi topnienia dwóch różnych wariantów Ssq1 przy długości fali 220nm. Dla Ssq1 WT temperatura topnienia wynosi 53,62°C, dla Ssq1<sup>T239/A</sup> temperatura topnienia wynosi 47,29°C.

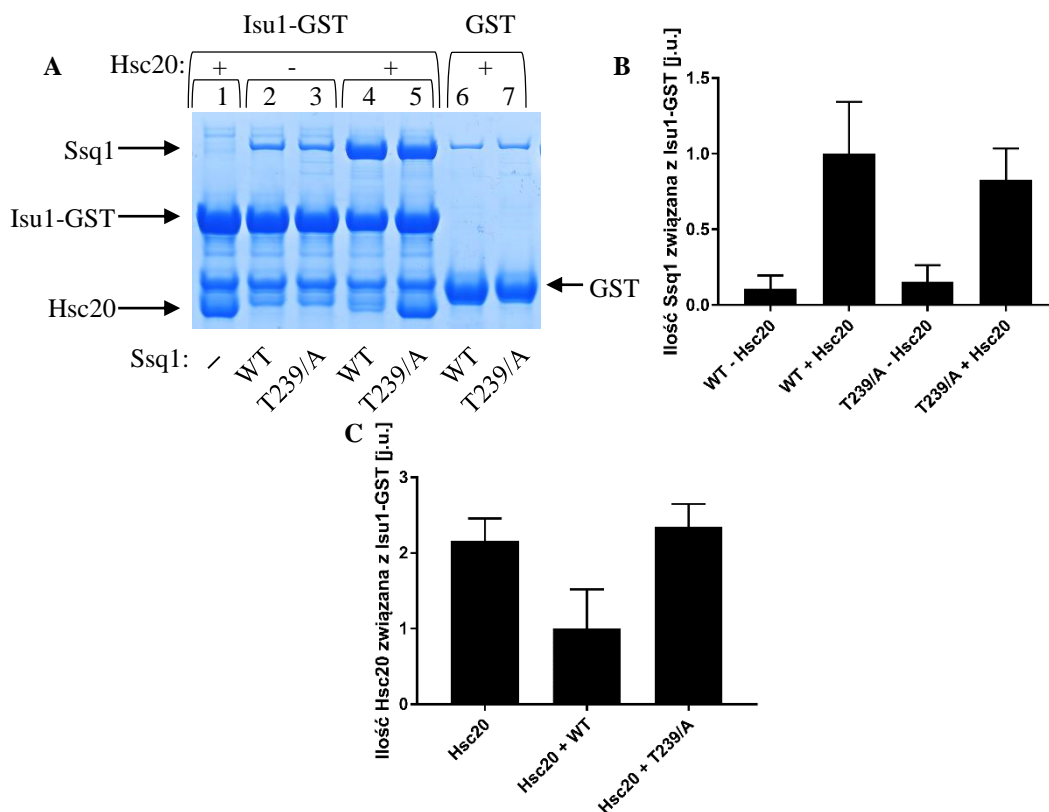
Przeprowadzona analiza nie wykazała istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi widmami dla badanych białek i potwierdziła że wprowadzenie substytucji T239/A nie zmienia struktury drugorzędowej białka Ssq1. Kształt obu widm, zarówno białka Ssq1 WT i Ssq1<sup>T239/A</sup>, jest typowy dla widm białek, w których α-helisa stanowi dominującą strukturę II-rzędową.

Drugą analizą przeprowadzoną z wykorzystaniem spektrometru dichroizmu kołowego był pomiar temperatury topnienia, czyli temperatury w której białko ulega denaturacji. Uzyskana wartość temperatury topnienia dla danego białka daje informację na temat stabilności białka. Temperatura topnienia białka Ssq1 WT wynosi 53,62°C, natomiast w przypadku zmutowanej wersji Ssq1<sup>T239/A</sup> 47,29°C. Tak więc wartość temperatury topnienia określona dla białka Ssq1<sup>T239/A</sup> jest jedynie nieznacznie mniejsza, niż ta zmierzona dla białka typu dzikiego i różnica ta nie powinna znacząco wpłynąć na stabilność białka w stosowanych warunkach eksperymentalnych w kolejnych doświadczeniach.

W następnej kolejności zadałem pytanie, czy zmutowana wersja białka Ssq1<sup>T239/A</sup> oddziałuje z białkiem pomocniczym zawierającym domenę J, Hsc20 oraz z substratem Isu1. Aby odpowiedzieć na to pytanie zaplanowałem eksperyment precypitacji kompleksów białkowych zgodnie z opisem procedury zamieszczone w rozdziale Metody 3.8. W tym celu wykorzystałem białko fuzyjne Isu1-GST, które poprzez dołączoną S-transferazę glutationu (GST) wiąże się do złoża agarozowego opłaszczanego zredukowanym glutationem. Białko fuzyjne Isu1-GST zostało wcześniej zbadane *in vivo* i jest w pełni funkcjonalne (Mühlenhoff i wsp., 2003).

Na wstępie przygotowywałem mieszaniny białek zawierające Isu1-GST (2,5μM), nadmiar Hsp70 (5μM Ssq1) oraz Hsc20 w stężeniu 2,5μM. Reakcję inicjowałem poprzez dodanie ATP, po czym inkubowałem mieszaniny w temperaturze 25°C przez 15 minut. Po tym czasie poprzez dodanie złoża do mieszaniny reakcyjnej precypitowałem Isu1-GST wraz ze związanymi białkami i analizowałem uzyskane kompleksy, przeprowadzając elektroforezę

w warunkach denaturujących i następnie barwienie Coomassie Brilliant Blue (Rycina 27). Powstanie odpowiedniego kompleksu białko:Isu1-GST potwierdzałem, analizując wynik rozdziału pod kątem obecności prążka na wysokości odpowiadającej oczyszczonemu białku Hsc20 lub Hsp70. Ponadto, w celu określenia ilości białek niespecyficznie związanych do złoża, wykonywałem doświadczenia kontrolne, w których preparaty Hsp70 i Hsc20 inkubowałem ze złożem opłaszczonym białkiem GST. Kiedy mieszanina reakcyjna zawierała białko Hsc20 obserwowałem jego efektywną precypitację z substratem Isu1-GST (Rycina 27, ścieżka 1). W obecności białka Hsc20 białko Ssq1 WT efektywnie oddziałuje z substratem Isu1-GST, niemniej białko Hsc20 oddysocjowuje od utworzonego kompleksu (Rycina 27, ścieżka 4). Gdy zastosowany został wariant Ssq1<sup>T239/A</sup> to precypitacji ulegają wszystkie trzy białka (Rycina 27, ścieżka 5). W doświadczeniach kontrolnych, które obejmowały mieszaniny reakcyjne bez Hsc20 obserwowałem niskie wiązanie Ssq1 niezależnie od zastosowanego wariantu Ssq1 (Rycina 27, ścieżka 2 i 3). Obserwacje te są w pełni zgodne z literaturą, zgodnie z którą mtHsp70 w obecności ATP przyjmuje konformację otwartą (Kampinga i Craig 2010). Przy dużej szybkości wiązania substratu i niskim powinowactwie, przy braku Hsc20 tylko niewielka część Ssq1 pozostała w kompleksie z substratem. Przeprowadzone eksperymenty jednoznacznie potwierdziły, że wykorzystanie wariantu Ssq1 z mutacją T239/A pozwala na uzyskanie kompleksu trzech białek w obrębie, którego znajduje się białko Hsp70, białko zawierające domenę J oraz substrat i jest efektem stabilizacji oddziaływań w obecności Hsc20.



**Ryc.27** Wpływ mutacji T239/A na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST

**A Analiza SDS-PAGE kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności białka Ssq1<sup>T239/A</sup>** Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdział techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5µM Isu1-GST, 2,5µM Hsc20 i 5µM Ssq1. Ścieżka nr 1 obrazuje ilość białka Hsc20, które precypitowało z białkiem Isu1-GST przy braku Ssq1. Natomiast odpowiednio ścieżki 2 i 3 prezentują ilość Ssq1 WT oraz Ssq1 z mutacją T239/A precypitowane z Isu1-GST, kiedy białko Hsc20 było pominięte w mieszaninach reakcyjnych. W końcu ścieżka nr 4 prezentuje kompleks uzyskany w wyniku inkubacji mieszaniny zawierającej Ssq1 WT, a ścieżka nr 5 wariantu Ssq1<sup>T239/A</sup> w obecności Hsc20. Ścieżki 6 i 7 pokazują poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 do złoża z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczna analiza ilości Ssq1WT i Ssq1<sup>T239/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST** Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1WT związanego w kompleksie z Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

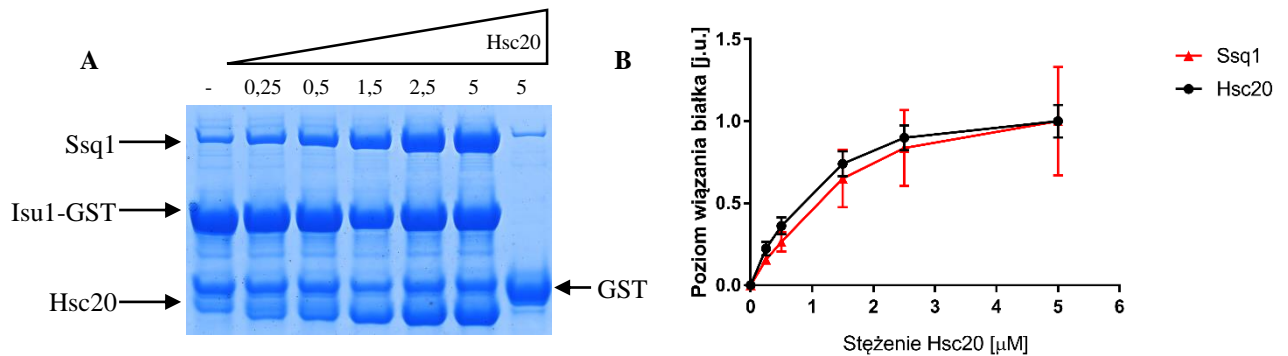
**C Densytometryczna analiza ilości Hsc20 w kompleksie z Isu1-GST** Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Hsc20, które precypitowało z Isu1-GST. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Hsc20 związanego w kompleksie z Isu1-GST w obecności Ssq1 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Opisany powyżej eksperyment został powtórzony trzykrotnie, uzyskiwane prążki na żelach SDS-PAGE odpowiadające masie Ssq1 były w następnej kolejności analizowane densytometrycznie. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie wykresu w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1 WT związanego w kompleksie z Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów. Wybierając jako punkt odniesienia pełną reakcję



z Ssq1 typu dzikiego, ilość Ssq1 w tym kompleksie wynosi 100%. Zatem w przypadku kompleksu zawierającego wariant Ssq1<sup>T239/A</sup>, ilość tego wariantu w kompleksie z Hsc20 i Isu1 stanowi 83% ilości Ssq1 WT w analogicznym kompleksie. Natomiast ilość Hsc20 w kompleksie z Ssq1<sup>T239/A</sup> jest ponad dwukrotnie wyższa niż ilość Hsc20 w kompleksie z Ssq1 WT i jest porównywalna z ilością Hsc20, która precypituje z Isu1-GST - w reakcji niezawierającej Ssq1.

Uzyskany wynik jest w pełni zgodny z danymi literaturowymi, zgodnie z którymi Hsc20 oddziałuje z Isu1 niezależnie od mtHsp70 (Dutkiewicz i wsp., 2003). W następnej kolejności zadałem pytanie jak wydajnie tworzony jest kompleks Ssq1:Hsc20:Isu1-GST. Aby odpowiedzieć na to pytanie przeprowadziłem serię precypitacji kompleksów białkowych w którym miareczkowałem białko Hsc20 przy stałym stężeniu Isu1-GST (2,5μM) i Ssq1<sup>T239/A</sup> (5μM).



### Ryc.28 Wpływ mutacji T239/A na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST

**A Analiza tworzenia kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w funkcji stężenia białka Hsc20** Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdzielanie techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5μM Isu1-GST, 5μM Ssq1 oraz zmienne stężenie białka Hsc20. Ścieżka 1 przedstawia precypitowane białka reakcji kontrolnej niezawierającej Hsc20. Ścieżka 2 przedstawia białka, które wiązały się do białka Isu1-GST w obecności białka Hsc20 w stężeniu 0,25μM, natomiast kolejne ścieżki obejmują reakcje, w których rosło stężenie Hsc20 zgodnie z opisem ryciny. Ścieżka 7 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 w stężeniu 5μM do złoza z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczne przedstawienie poziomu Hsc20 i Ssq1<sup>T239/A</sup>, które precypitowały wraz z Isu1-GST w funkcji stężenia Hsc20 obecnego w mieszaninie reakcyjnej** W jednostkach umownych [j.u.] przedstawiłem poziom białek Hsc20 i Ssq1 w kompleksie. Odpowiednio poziom Hsc20 jest oznaczony kolorem czarnym, a poziom Ssq1 jest oznaczony kolorem czerwonym.

Wraz ze wzrostem stężenia Hsc20 od 0,25μM do 5μM można zaobserwować wzrost sygnału Hsc20 i jednocześnie proporcjonalny wzrost sygnału Ssq1 (Ryc. 28). Przy 2,5μM Hsc20 obserwowałem maksymalną ilość Hsc20 oraz Ssq1, które precypitowały razem z Isu1-GST. Ten wynik sugerowałby że kompleks Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1-GST tworzony jest w stosunku 1:1:1. Uzyskane wyniki pozwoliły mi zaplanować kolejny eksperyment, którego głównym celem było uzyskanie kompleksów Hsc20:Isu1 oraz Ssq1:Hsc20:Isu1 do analiz strukturalnych.

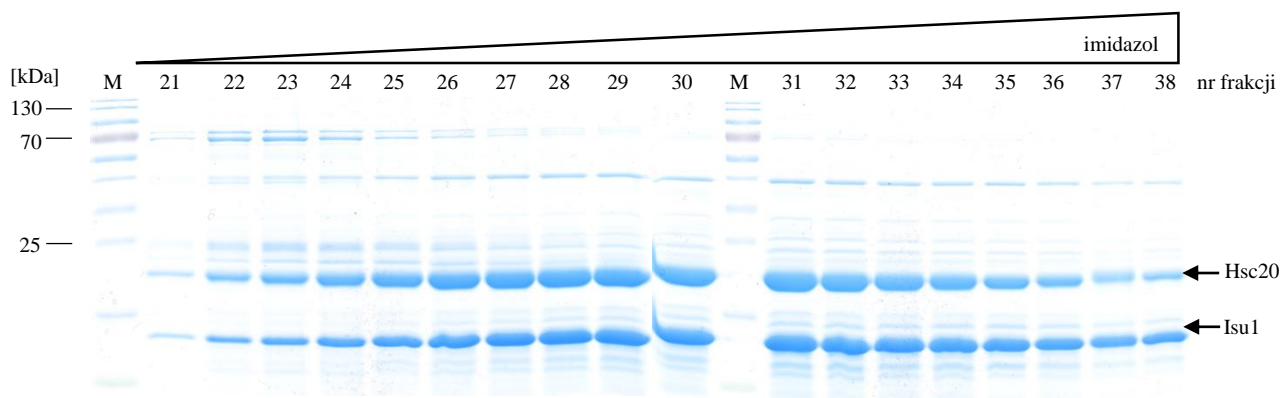


## 4.3 Wydajna metoda oczyszczania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 wymaga równoczesnej nadprodukcji jego składników w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

### 4.3.1 Oczyszczanie kompleksu Hsc20:Isu1

Cykl interakcji Hsp70/Hsc20–Isu1 rozpoczyna się od utworzenia kompleksu Hsc20–Isu1. Podobnie jak wiele innych białek zawierających domenę J, Hsc20 oddziałuje z białkiem substratowym niezależnie od jego partnera Hsp70. Jednak specyfika tej interakcji jest dość wyjątkowa, ponieważ w oddziaływanie pomiędzy białkami zaangażowane jest wiele aminokwasów znajdujących się na powierzchni obu białek. Do tej pory pokazano, że interakcja między Hsc20 i Isu1 są krytyczne *in vivo* (Schilke i wsp., 2006). Badania w oparciu o drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że kiedy w obrębie białka Hsc20 wprowadzono mutacje w rejonie wytypowanym w oddziaływanie z Isu1, komórki są niezdolne do życia, natomiast obecność wariantów Hsc20 w komórkach drożdży o zmniejszonym powinowactwie do Isu1 powoduje powolny wzrost i zmniejszoną aktywność enzymów mitochondrialnych (akonitazy i dehydrogenazy bursztynianowej), które wymagają do działania obecności funkcjonalnych centrów FeS (Ciesielski i wsp., 2012).

Dotychczasowa literatura wskazuje, że jedynym substratem białka Hsc20 jest białko pełniące funkcję molekularnego rusztowania - Isu1 i do interakcji Hsc20:Isu1 dochodzi przed oddziaływaniem z Ssq1 (Schilke i wsp., 2006). Ze względu na stabilność oddziaływania w eksperymentach *in vitro*, postanowiłem dokonać koekspresji genów kodujących oba białka z nadzieją, że produkty tych genów pozostaną w kompleksie w trakcie wszystkich etapów oczyszczania. Po uzyskaniu stabilnej nadprodukcji obu białek, w następnej kolejności przystąpiłem do opracowania protokołu oczyszczania Hsc20:Isu1. Podczas oczyszczania wykorzystałem plazmid pRSFDuet1-HSC20/ISU1His w którym geny *HSC20* oraz *ISU1* zostały wklonowane pod kontrolę dwóch niezależnych promotorów T7. Kompleks białkowy izolowałem ze szczepu bakteryjnego *E. coli* Rosetta 2 niosącego plazmid kodujący rzadkie kodony. Aby ułatwić izolację kompleksu z hodowli bakteryjnej, na C-końcu sekwencji białka Isu1 wprowadzono znacznik histydynowy o długości sześciu aminokwasów. Po zaindukowaniu nadprodukcji białek 1mM IPTG, bakterie *E. coli* Rosetta 2 hodowałem 3 godziny w optymalnej dla stabilności tych białek temperaturze 30°C. Frakcja supernatantu ze zwirowanego lizatu zawierała rozpuszczalne białka, które oczyszczałem metodą chromatografii powinowactwa na 2,5 ml złożu Ni-NTA. Białka eluowałem z kolumny liniowym, rosnącym gradientem imidazolu (Ryc.29).

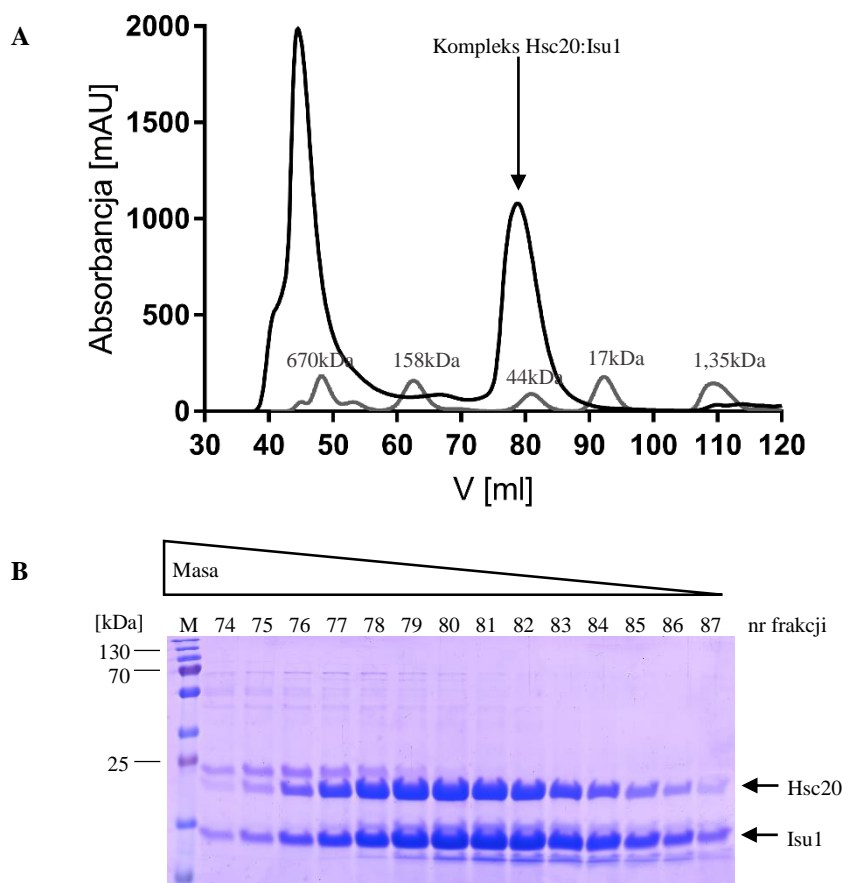


### Ryc.29 Oczyszczanie kompleksu Hsc20:Isu1 z użyciem złoża Ni-NTA

*Żel przedstawia rozdział elektroforetyczny frakcji zebranych z elucji kompleksu Hsc20:Isu1 liniowym gradientem imidazolu (30mM-500mM). Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.*

Na tym etapie uzyskane frakcje po rozdziale chromatograficznym zawierały dużą ilość obu białek, które wchodzi w skład kompleksu Hsc20:Isu1. Preparat z połączonych frakcji poddałem dializie wobec buforu GF i po dializie zagęściłem do objętości 2ml. Kolejny krok procedury polegał na przeprowadzeniu sączenia molekularnego uzyskanego preparatu z wykorzystaniem złoża HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade. Głównym celem tego kroku było oddzielenie frakcji kompleksu podwójnego Hsc20:Isu1 od frakcji białek, które nie tworzą kompleksu oraz frakcji zagregowanych białek.

Najczystsze frakcje zawierające kompleks Hsc20:Isu1 uzyskane po chromatografii powinowactwa połączyłem i dializowałem wobec buforu GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>). Po dializie preparat inkubowałem z DTT, ATP i MgCl<sub>2</sub>, a następnie zwirowałem w celu usunięcia makroskopowych agregatów. Tak przygotowany preparat poddałem sączeniu molekularnemu. Podczas rozdziału z użyciem kolumny HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, na bieżąco rejestrowałem krzywą absorbancji przy długości fali 280nm (Ryc. 30).



### Ryc.30 Sączenie molekularne kompleksu Hsc20:Isu1-His

Sączenie molekularne kompleksu białek Hsc20 oraz Isu1-His na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, A: wykres absorbancji przy długości fali 280nm uzyskany podczas rozdzielania chromatograficznego. Czarna linia przedstawia przebieg sączenia mieszaniny białek Hsc20 oraz Isu1, a szara linia odpowiada przebiegowi sączenia wzorców masowych których szczyty zostały opisane odpowiadającą im masą. Szczyt rozdzielania zawierający kompleks podwójny Hsc20:Isu1 przypada na frakcję 80 (kompleks obejmuje frakcje 74-86). B: analiza uzyskanych frakcji z sączenia molekularnego na żelach SDS-PAGE. Poszczególne ścieżki są podpisane numerami frakcji, których próbki były analizowane na żelu poliakrylamidowym. Na żel naniosłem 10 $\mu$ l frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Na wstępie przeprowadziłem rozdzielanie markerów masowych, aby uzyskać punkt odniesienia, który pozwoli mi później ustalić, które frakcje zawierają kompleks Hsc20:Isu1. Na wykresie absorbancji przedstawiającym przebieg sączenia molekularnego preparatu białkowego zawierającego kompleks Hsc20:Isu1 mogłem zaobserwować dwa szczyty, pierwszy o masie 739kDa przedstawiał zagregowaną pulę białek, drugi o masie 42kDa odpowiadał masie kompleksu Hsc20:Isu1-His. Następnie przeprowadziłem analizę SDS-PAGE próbek uzyskanych frakcji z sączenia molekularnego odpowiadających masie 42kDa. Zgodność teoretycznej masy kompleksu z obserwowaną podczas sączenia i obecność prążków obu białek na żelach wskazuje, że uzyskany preparat to czysty preparat zawierający heterodimer składający się z białek Hsc20 i Isu1. Po zagęszczeniu frakcji otrzymałem preparat kompleksu Hsc20:Isu1, który został poddany analizie densytometrycznej. Opracowana procedura oczyszczania pozwoliła uzyskać kompleks Hsc20:Isu1, w którym

stężenie białka Isu1 wynosi 1,39mg/ml, natomiast stężenie Hsc20 wynosi 1,24mg/ml. Łącznie otrzymałem 2,5ml preparatu Hsc20:Isu1.

#### 4.3.2 Oczyszczanie kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His z wykorzystaniem oczyszczonego białka Ssq1<sup>T239/A</sup>-His i kompleksu Hsc20:Isu1-His

Ważnymi biologicznie substratami Hsp70 są zazwyczaj polipeptydy, często mające znaczny defekt w obrębie struktury drugorzędowej lub/i trzeciorzędowej. Zrozumienie interakcji Hsp70 z takimi substratami jest dość ograniczone ze względu na praktyczne trudności pracy z częściowo zwiniętymi białkami. W związku z tym większość eksperymentów, których celem była analiza cyklu oddziaływania substrat-Hsp70 przeprowadzono *in vitro* z użyciem substratów peptydowych. W przypadku tych badań peptydy oddziałują z domeną wiążącą substrat (SBD) białka Hsp70. Subdomena SBD, która tworzy wieczko (SBD $\alpha$ ) zamyka się ściśle nad peptydem, który jest związany do kieszeni wiążącej substrat znajdującej się w obrębie subdomeny  $\beta$  (SBD $\beta$ ). W ten sposób wieczko zatrzymuje peptyd przez tworzenie interakcji z resztami otaczającymi szczelinę, ale nie oddziałując bezpośrednio z peptydem (Kampinga i Craig 2010). Uzyskany w oparciu o te badania model, w którym wieczko zaciska się ciasno nad szczeliną, nie jest w pełni kompatybilny z tym co się dzieje w komórce, gdzie białko Hsp70 często oddziałuje ze złożonymi białkami, które są częściowo lub całkowicie zwinięte lub agregatami białkowymi (Vickery i Cupp-Vickery 2007).

Co więcej w przypadku analiz z wykorzystaniem substratów peptydowych, nie zbadano, jak krytyczne są pierwsze etapy cyklu, czyli jak wspólne działanie domeny J i wiązanie substratu stymulują aktywność ATPazy Hsp70, stabilizując w ten sposób oddziaływanie substratu. Gdy ATP jest związany w obrębie białka Hsp70, wówczas domeny SBD $\alpha$ , SBD $\beta$  i łącznik są przyłączone do domeny wiążącej nukleotyd – NBD. W tej konformacji kieszeń wiążąca substrat SBD jest łatwo dostępna (Craig i Marszałek 2011). Po hydrolizie ATP następuje zamknięcie wieczka SBD $\alpha$  i brak swobodnego dostępu do kieszeni wiążącej substrat w obrębie domeny SBD $\beta$ . Badania białek Hsp70 w oparciu o techniki NMR i FRET ujawniły nieoczekiwaną złożoność, która dotyczy konformacji białek Hsp70: (1) stan otwarty i stan zamknięty białka Hsp70 (tj. odpowiednio stany, kiedy Hsp70 jest związane z ATP lub ADP) nie są statyczne, lecz Hsp70 prezentuje pewien „stan dominujący” odpowiadający konkretnemu nukleotydowi, który jest związany w obrębie domeny NBD, ponadto (2) zidentyfikowano konformacje pośrednie między tymi dominującymi stanami Hsp70 (Mapa i wsp., 2010). Te wyniki sugerują, że Hsp70 może być bardziej „elastyczny” niż wcześniej sądzono, to znaczy adaptować się lepiej do wiązania różnych substratów w zależności od ich wielkości i kształtu.

W związku z tym na kolejnym etapie moich badań zadałem pytanie jakie są czynniki, które decydują o biologicznie produktywnym oddziaływaniu systemu białek Hsp70 z substratem. Aby opowiedzieć na to pytanie, na wstępie podjąłem próbę oczyszczenia kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1.

Wybrany przeze mnie model badawczy, czyli wyspecjalizowany system białek Hsp70, który uczestniczy w biogenezie centrów FeS, jest obecny w mitochondriach wszystkich eukariontów i ma trzy ważne zalety, które zadecydowały o jego wyborze do dalszych badań:

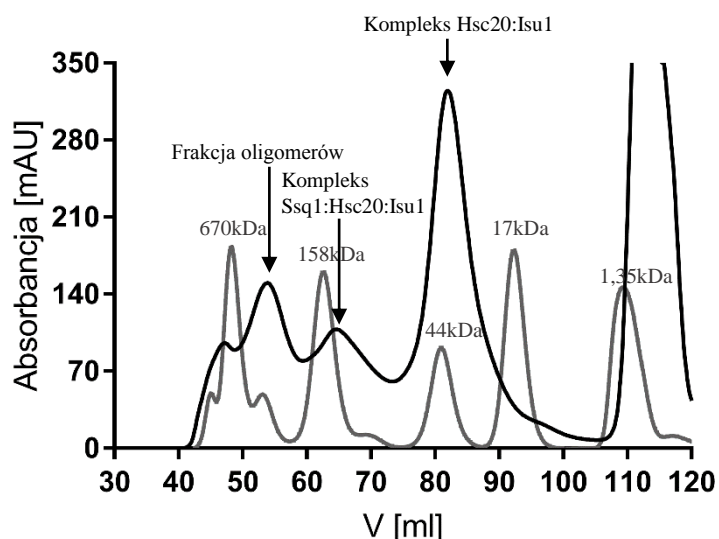
jest wysoce wyspecjalizowany, jest dobrze scharakteryzowany, a jego substrat jest natywnie sfałdowanym białkiem. Obecność funkcjonalnego systemu Ssq1-Hsc20 jest w komórce wymagana do przeniesienia nowo syntezowanych centrów FeS w obrębie białkowego rusztowania (Isu) do odpowiednich białek akceptorowych (Uzarska i wsp., 2013). Wszystkie eukarionty posiadają konserwowane białko zawierające domenę J - Hsc20. Jednak większość eukariontów, w tym ludzie, ma jedno wielofunkcyjne Hsp70, które oprócz Hsc20 działa z wieloma innymi białkami zawierającymi domenę J (Kampinga i Craig 2010). Z kolei drożdże *S. cerevisiae* i blisko spokrewnione grzyby mają dodatkowe paralogiczne Hsp70, Ssq1, wysoce wyspecjalizowane w wiązaniu Isu. Isu jest jedynym substratem rozpoznawanym przez Ssq1. Obecność wyspecjalizowanego białka Ssq1 jest dużym atutem, ponieważ umożliwia badania *in vivo* procesu biogenezy centrów FeS niezależnie od innych istotnych procesów biologicznych, w których działa wielofunkcyjna wersja Hsp70.

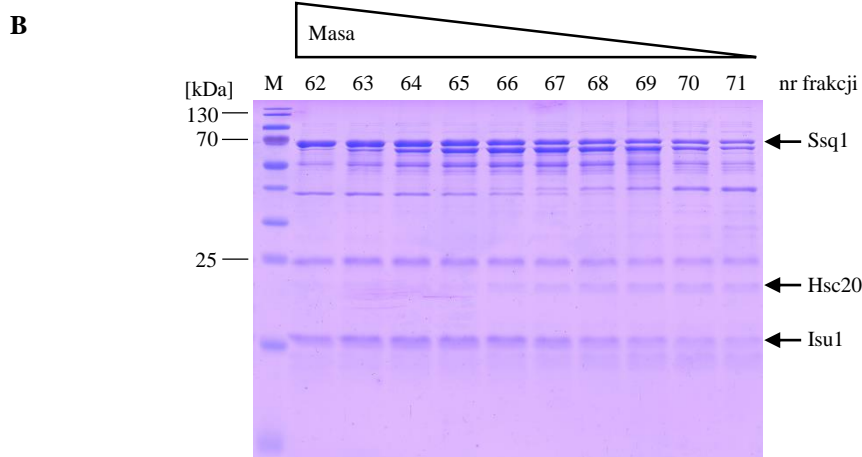
Aby uzyskać oczyszczony kompleks Ssq1:Hsc20:Isu1 do dalszych analiz, wykorzystałem wariant Ssq1<sup>T239/A</sup> z mutacją w obrębie domeny odpowiadającej za hydrolizę ATP. Zastosowanie tego wariantu Hsp70 pozwoliło mi uzyskać białko ze związanym ATP, które stabilnie oddziałuje z białkiem J (Ryc. 31)

W pierwszej kolejności, chcąc uzyskać kompleks Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1 wykorzystałem wcześniej otrzymany preparat Ssq1<sup>T239/A</sup>-His (Rozdział 4.1.1) oraz oczyszczony kompleks Hsc20:Isu1-His (Rozdział 4.3.1).

Na wstępie 1,92mg białka Ssq1<sup>T239/A</sup>-His inkubowałem z nadmiarem kompleksu Hsc20:Isu1-His w obecności 1mM DTT, 2mM ATP, 10mM MgCl<sub>2</sub>. Po etapie inkubacji usunąłem agregaty przez wirowanie i mieszaninę reakcyjną poddałem sączeniu molekularnemu, którego celem była izolacja kompleksu, który obejmowałby wszystkie trzy białka Ssq1:Hsc20:Isu1. W tym przypadku również użyłem kolumny HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade.

A





### Ryc.31 Sączenie molekularne kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His

Sączenie molekularne kompleksu białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1-His na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, A: wykres absorbancji przy długości fali 280nm uzyskany podczas rozdzielania chromatograficznego. Czarna linia przedstawia przebieg sączenia mieszaniny białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1, a szara linia odpowiada przebiegowi sączenia wzorców masowych których szczyty zostały opisane odpowiadającą im masą. Szczyt kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 przypada na frakcję 65 (kompleks obejmuje frakcje 60-70), natomiast kompleks podwójny Hsc20:Isu1 przypada na frakcje 70-80 sączenia molekularnego. B: analiza uzyskanych frakcji z sączenia molekularnego na żelach SDS-PAGE. Poszczególne ścieżki są podpisane numerami frakcji, których próbki były analizowane na żelu poliakrylamidowym. Na żel naniosłem 10μl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Po przeprowadzeniu kalibracji kolumny z zastosowaniem markerów masowych, przeprowadziłam właściwy rozdział mieszaniny reakcyjnej Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His. Następnie w oparciu o wyniki elektroforezy SDS – PAGE wybranych frakcji z rozdziału, oceniłem zawartość i czystość białka w analizowanych frakcjach.

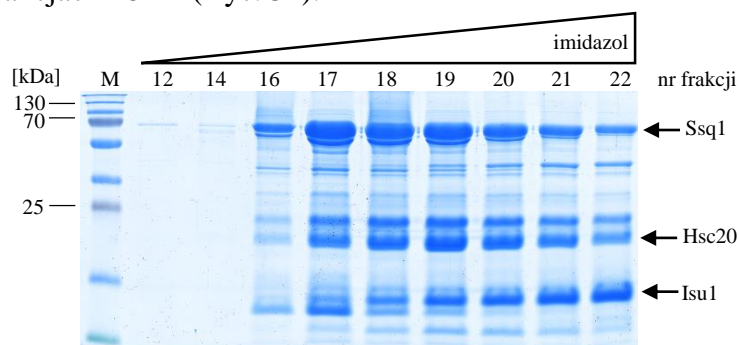
Porównując profile sączenia zauważyć można cztery główne szczyty absorbancji. Frakcje przypadające na 50 – 60ml rozdzielania chromatograficznego odpowiadają masie 370 kDa czyli oligomerom. Kiedy porównamy profil sączenia Hsc20:Isu1 (Ryc. 30) i Ssq1:Hsc20:Isu1 (Ryc. 31) widzimy, że szczyt ten jest mniej intensywny i przesunięty w kierunku frakcji o mniejszej masie w przypadku sączenia Ssq1:Hsc20:Isu1, co oznacza mniejszą zawartość agregatów charakteryzujących się mniejszą masą względem szczytu agregatów obserwowanych podczas sączenia kompleksu Hsc20:Isu1 przypadających na 40-50 ml sączenia molekularnego. Kolejny obserwowany szczyt absorbancji przypadający na 60-70ml rozdzielania odpowiada masie około 139kDa, czyli masie zbliżonej do sumy mas poszczególnych białek obecnych w mieszaninie reakcyjnej wynoszących odpowiednio 72,36kDa dla Ssq1, 21,78kDa dla Hsc20 i 17,9kDa dla Isu1 (masy wyliczone na bazie sekwencji z usuniętymi presekwencjami). Oznaczałoby to w związku z tym, że szczyt ten powinien zawierać heterotrimer Ssq1:Hsc20:Isu1. Trzeci szczyt na rycinie 31 odpowiada masie 42kDa i obejmuje 70-80 ml rozdzielania chromatograficznego. Ten szczyt jest wyższy od szczytu odpowiadającego masie 139kDa co może świadczyć o proporcjonalnie większym stężeniu tej formy kompleksu. Pozycja tego szczytu pokrywa się z pozycją wysokiego szczytu obserwowanego wcześniej na rycinie 30, co sugeruje, że na ten szczyt składa się kompleks podwójny Hsc20:Isu1. Proporcja wysokości szczytu 139kDa względem szczytu 42kDa w rycinie 31 wynosiła w przybliżeniu 1:3. Ostatni szczyt reprezentuje sygnał generowany przez wolne cząsteczki ATP. Niestety w podsumowaniu mogę stwierdzić, że wydajność procedury była niedostateczna, ponieważ tylko część kompleksu Hsc20:Isu1 była wiązana przez białko



Ssq1 i duża populacja kompleksu Hsc20:Isu1 nie tworzyła większego kompleksu z trzecim białkiem mieszaniny reakcyjnej. Ponadto uzyskany kompleks Ssq1:Hsc20:Isu1 charakteryzował się niskim stężeniem, niewystarczającym do dalszych analiz.

### 4.3.3 Oczyszczanie kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1-His w oparciu o bakteryjny system ekspresyjny, w którym była prowadzona jednoczesna nadprodukcja Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz Hsc20:Isu1-His

Niska wydajność procedury której celem było uzyskanie kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1, a którą szczegółowo opisałem w poprzednim rozdziale, stała się punktem wyjścia do rozważań nad udoskonaleniem metody. Potencjalnym rozwiązaniem była próba jednoczesnej nadprodukcji wszystkich trzech białek. W tym celu otrzymałem wektor plazmidowy pETDuet1-SSQ1<sup>T239/A</sup>/HEP1 kodujący białko Ssq1<sup>T239/A</sup> bez znacznika histydynowego. W poprzednim doświadczeniu wykorzystałem szczep ekspresyjny *Escherichia coli* zawierający plazmid kodujący rzadkie kodony oraz drugi plazmid pRSFDuet1-HSC20/ISU1His w którym geny *HSC20* oraz *ISU1* zostały wklonowane pod kontrolę dwóch niezależnych promotorów T7. Szczep z tymi dwoma plazmidami wprowadziłem w stan kompetencji i przeprowadziłem proces transformacji wektorem pETDuet1-SSQ1<sup>T239/A</sup>/HEP1. Uzyskałem w ten sposób szczep mogący nadprodukować wszystkie trzy białka kompleksu naraz. Dzięki obecności na C-końcu sekwencji białka Isu1 znacznika histydynowego o długości sześciu aminokwasów, ułatwiona była izolacja kompleksu białkowego z lizatu komórek bakteryjnych. Po zaindukowaniu nadprodukcji białek 1mM IPTG, bakterie *E. coli* Rosetta 2 hodowałem 3 godziny w temperaturze 30°C która była optymalna dla stabilności składników oczyszczanego kompleksu. Hodowlę poddałem lizie, a następnie wirowaniu w celu uzyskania supernatantu zawierającego rozpuszczalne białka, które dalej oczyszczałem metodą chromatografii powinowactwa na 2,5 ml złożu Ni-NTA. Oczyszczanie na złożu Ni-NTA umożliwił fakt obecności znacznika histydynowego na C-końcu sekwencji białka Isu1. Białka eluowałem z kolumny liniowym, rosnącym gradientem imidazolu. Kompleks trzech białek znajdował się we frakcjach 18-22 (Ryc. 32).

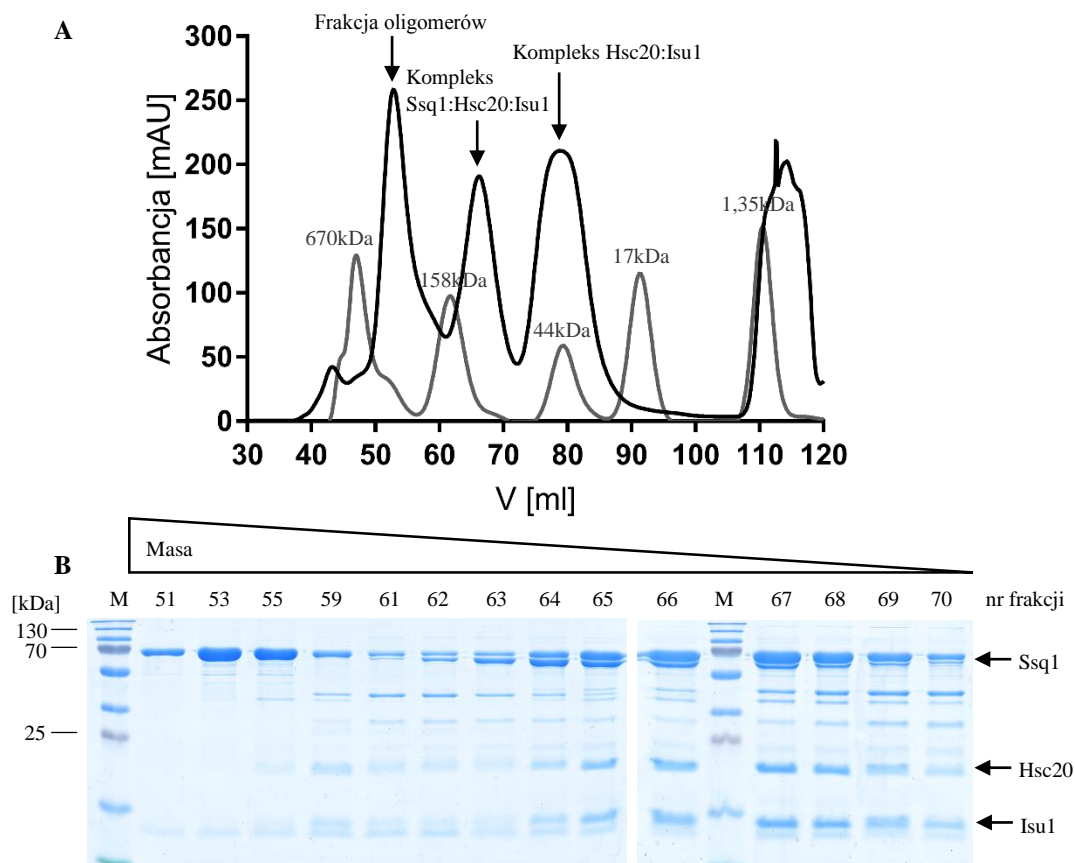


**Ryc.32 Oczyszczanie kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 z użyciem złoża Ni-NTA**

Żel przedstawia rozdział elektroforetyczny frakcji zebranych z elucji kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 liniowym gradientem imidazolu (30mM-500mM). Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Frakcje, które zawierały kompleks Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1-His w największym stężeniu po chromatografii powinowactwa, połączyłem i zagęściłem do objętości 2ml. Tak przygotowany preparat dializowałem wobec buforu GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0,

100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>). Po dializie preparat inkubowałem z DTT, ATP i MgCl<sub>2</sub>, a po 30 minutach inkubacji poddałem wirowaniu w celu usunięcia makroskopowych agregatów. Następnie mieszanina reakcyjna była poddana sączeniu molekularnemu z zastosowaniem kolumny HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Ryc. 33). W tym przypadku sączenia molekularne miało za zadanie oddzielić frakcje zawierające kompleks potrójny Ssq1:Hsc20:Isu1 od frakcji kompleksu podwójnego Hsc20:Isu1 i ewentualnie od frakcji białek zagregowanych. Prócz samego rozdziału, sączenie molekularne miało za zadanie dostarczenie informacji na temat ilości kompleksu potrójnego względem ilości kompleksu podwójnego oraz ich wzajemnych proporcji.



### Ryc.33 Sączenie molekularne kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1-His

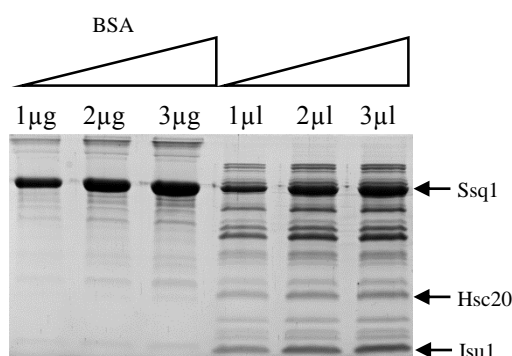
Sączenie molekularne kompleksu białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1-His na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, A: wykres absorbancji przy długości fali 280nm uzyskany podczas rozdziału chromatograficznego. Czarna linia przedstawia przebieg sączenia mieszaniny białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1, a szara linia odpowiada przebiegowi sączenia wzorców masowych których szczyty zostały opisane odpowiadającą im masą. Szczyt kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 przypada na frakcję 65 (kompleks obejmuje frakcje 60-70), natomiast kompleks podwójny Hsc20:Isu1 przypada na frakcje 70-80 sączenia molekularnego. B: analiza uzyskanych frakcji z sączenia molekularnego na żelach SDS-PAGE. Poszczególne ścieżki są podpisane numerami frakcji, których próbki były analizowane na żelu poliakrylamidowym. Na żel naniosłem 10µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Następnie frakcje zebrane po rozdziale chromatograficznym analizowałem za pomocą metody SDS-PAGE. Analizując profil sączenia najpierw obserwujemy duży szczyt przypadający na 50-60 ml rozdziału, który obejmował białka i ich kompleksy o masie większej niż 370kDa. Podobnie podczas wcześniejszych analiz (Hsc20:Isu1 (Ryc. 30) oraz



Ssq1:Hsc20:Isu1 (Ryc. 31)) obserwowałem frakcje, których frakcje odpowiadały masom większym niż 370kDa. Kolejny obserwowany szczyt absorbancji przypadający na 65 – 70ml rozdziału odpowiada masie około 139kDa, czyli masie kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1. W przypadku tego sączenia wartość absorbancji osiąga wartość 200mAU podczas gdy w poprzednim sączeniu analogiczny szczyt reprezentował wartość 65mAU. Wartości absorpcji obejmujące analizowany szczyt sugerowały, że wydajność tej procedury uzyskiwania kompleksu potrójnego uległa znacznej poprawie w stosunku do poprzedniego podejścia. Kolejny szczyt obejmujący frakcje przypadające na 74 – 84 ml rozdziału odpowiada masie 42kDa, czyli masie kompleksu Hsc20:Isu1.

Z połączonych frakcji obejmujących 65 – 70ml rozdziału został przygotowany zagęszczony preparat końcowy kompleksu potrójnego, który zawierał 1,09mg/ml Ssq1, 0,24mg/ml Hsc20 i 0,51mg/ml Isu1 (Ryc.34). Objętość uzyskanego w tym podejściu preparatu wynosiła 1ml.



#### Ryc.34 Ocena stężenia oczyszczonego kompleksu białkowego Ssq1:Hsc20:Isu1

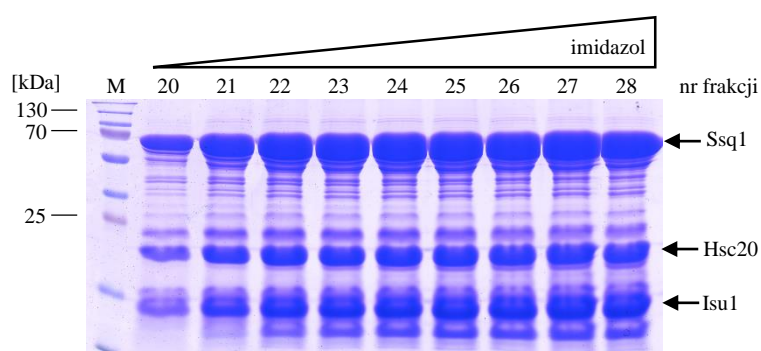
*Pierwsze trzy ścieżki przedstawiają wzorcowy preparat BSA, odpowiednio 1µg, 2µg, oraz 3µg. Następnie opisane są ścieżki zawierające kompleks białkowy Ssq1:Hsc20:Isu1. Na kolejne ścieżki naniosłem odpowiednio 1µl, 2µl, oraz 3µl otrzymanego preparatu. Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała, że stężenie uzyskanego białka Ssq1 znajdującego się w tym kompleksie wynosi 1,09 mg/ml, stężenie białka Hsc20 wynosi 0,24mg/ml, natomiast stężenie białka Isu1 wynosi 0,51mg/ml. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie.*

Ponieważ były obecne dodatkowe prążki w uzyskanym preparacie kompleksu potrójnego będące produktami degradacji, postanowiłem oczyścić preparat jeszcze raz, wprowadzając kolejne modyfikacje w metodzie nadprodukcji białek.

#### 4.3.4 Oczyszczanie kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His w oparciu o bakteryjny system ekspresyjny, w którym była prowadzona jednoczesna nadprodukcja Ssq1<sup>T239/A</sup>-His oraz Hsc20:Isu1-His

Mimo jednoznacznej przewagi procedury uzyskiwania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 opisanej w rozdziale 4.3.3 nad metodą z rozdziału 4.3.2, postanowiłem wprowadzić kolejną modyfikację metody w celu dalszego zwiększenia wydajności otrzymywania kompleksu potrójnego. Ze względu na to, że niestabilność białka Ssq1 jest czynnikiem powodującym utratę części białka w postaci agregatów, postanowiłem zweryfikować czy wprowadzenie znacznika histydynowego na C-końcu białka Ssq1 będzie stabilizować białko Ssq1 nadprodukowane w komórkach bakteryjnych i tym samym, czy zwiększy się wydajność otrzymywania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1.

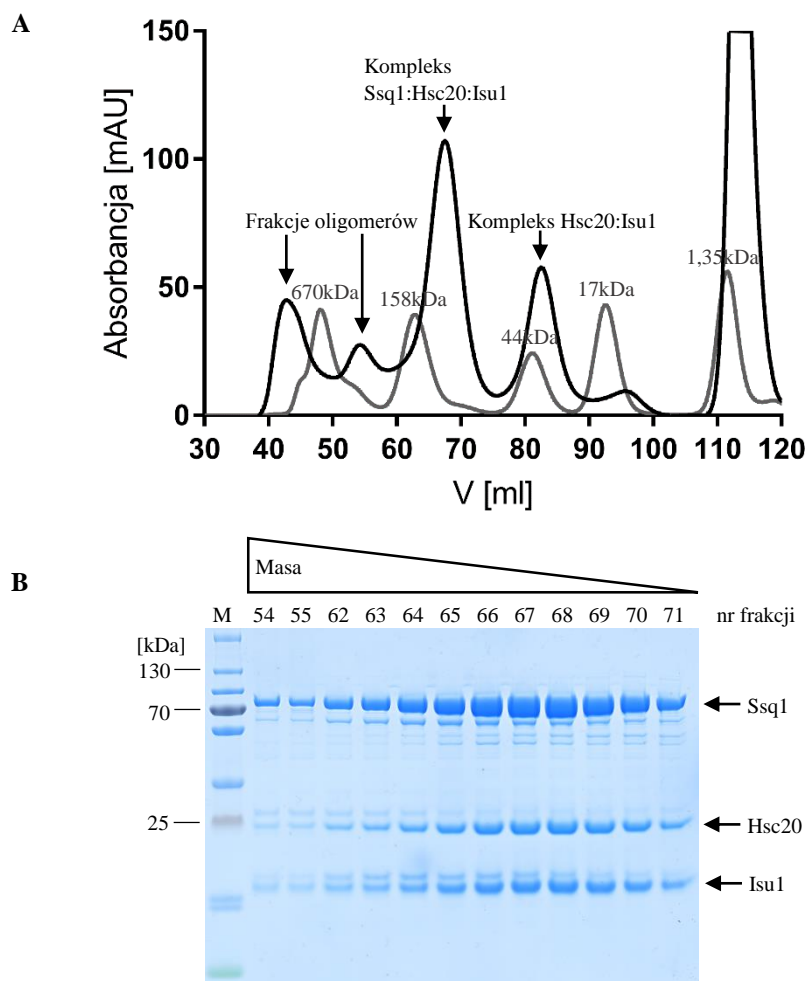
Analogicznie jak w poprzedniej procedurze wektor plazmidowy pETDuet1-SSQ1<sup>T239/A</sup>His/HEP1 kodujący białko Ssq1<sup>T239/A</sup>-His posłużył do transformacji szczepu ekspresyjnego *Escherichia coli* Rosetta 2. Szczep ten zawierał już wcześniej plazmid kodujący rzadkie kodony oraz plazmid pRSFDuet1-HSC20/ISU1His w którym geny *HSC20* oraz *ISU1* zostały wklonowane pod kontrolę dwóch niezależnych promotorów T7. Uzyskałem szczep nadprodukujący wszystkie trzy białka którego izolacja ułatwiona była obecnością dwóch znaczników, każdy składający się z sześciu histydyn. Analogicznie zaindukowałem nadprodukcję białek dodając IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1mM i następnie bakterie *E. coli* Rosetta 2 hodowałem przez kolejne 3 godziny w temperaturze 30°C. Po liczeniu komórek bakteryjnych przeprowadziłem wirowanie, a uzyskany supernatant zawierający rozpuszczalne białka oczyszczałem dalej metodą chromatografii powinowactwa na 2,5 ml złożu Ni-NTA. Białka eluowałem z kolumny liniowym gradientem imidazolu (Ryc. 35).



**Ryc.35 Oczyszczanie kompleksu Ssq1-His:Hsc20:Isu1-His z użyciem złoża Ni-NTA**

Żel przedstawia rozdział elektroforetyczny frakcji zebranych z elucji kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 liniowym gradientem imidazolu (30mM-500mM). Poszczególne ścieżki są podpisane numerami frakcji, których próbki analizowane na żelu poliakrylamidowym. Na żel naniosłem 5µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Prążki na żelu po chromatografii powinowactwa były znacznie bardziej intensywne w przypadku kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His porównując z wynikami elucji kompleksu w poprzednich eksperymentach. W związku z tym połączone frakcje zagęściłem do objętości 4ml. Zagęszczony preparat dializowałem do buforu GF (25mM HEPES-KOH pH 8.0, 100mM KCl, 5% glicerol, 1mM DTT i 10mM MgCl<sub>2</sub>). Po dializie preparat podzieliłem na dwie 2ml porcje, które były niezależnie poddane sączeniu molekularnemu. Na wstępie mieszaninę reakcyjną obejmującą kompleks Ssq1:Hsc20:Isu1 inkubowałem z DTT, ATP i MgCl<sub>2</sub>, a po 30 minutach inkubacji wirowałem w celu usunięcia makroskopowych agregatów.

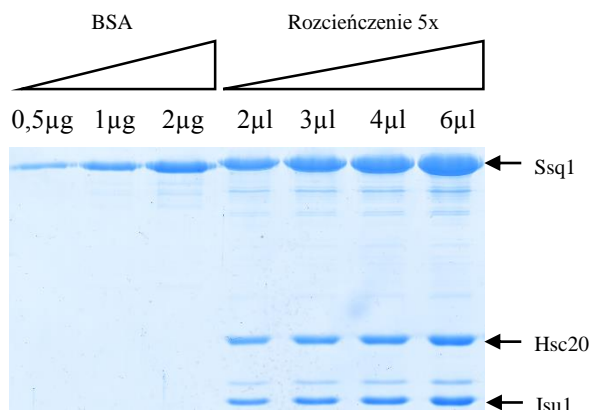


### Ryc.36 Sączenie molekularne kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>-His:Hsc20:Isu1-His

Sączenie molekularne kompleksu białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1-His na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, A: wykres absorbancji przy długości fali 280nm uzyskany podczas rozdzielania chromatograficznego. Czarna linia przedstawia przebieg sączenia mieszaniny białek Ssq1, Hsc20 oraz Isu1, a szara linia odpowiada przebiegowi sączenia wzorców masowych których szczyty zostały opisane odpowiadającą im masą. Szczyt kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 przypada na frakcję 65 (kompleks obejmuje frakcje 60-70), natomiast kompleks podwójny Hsc20:Isu1 przypada na frakcje 70-80 sączenia molekularnego. B: analiza uzyskanych frakcji z sączenia molekularnego na żelach SDS-PAGE. Poszczególne ścieżki są podpisane numerami frakcji, których próbki były analizowane na żelu poliakrylamidowym. Na żel naniosłem 10µl frakcji. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwiłem Coomassie. M-wzorzec masowy.

Ponownie i w tym przypadku podczas rozdzielania chromatograficznego (Ryc.36) w obrębie widma absorpcji możemy wyróżnić pulę białek przypadających na 51-57 ml rozdzielania, których masa molekularna jest większa niż 370kDa. Niemniej główna różnica w przebiegu tego eksperymentu w stosunku do poprzednich prób uzyskania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 polegała na tym, że szczyt przypadający na 65-70ml rozdzielania, a odpowiadający masie 139kDa, a więc masie kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 jest szczytem dominującym w widmie absorpcji w stosunku do pozostałych szczytów zarejestrowanego widma. Kolejny szczyt obejmuje frakcje zawierające kompleks podwójny Hsc20:Isu1 o masie 42kDa (frakcje przypadające na 77 – 88 ml rozdzielania). W podsumowaniu mogę stwierdzić, że uzyskane widmo absorpcji podczas rozdzielania chromatograficznego oraz analiza SDS-PAGE (Ryc. 36) potwierdzają znacznie większą wydajność tworzenia się

kompleksu potrójnego niż to obserwowałem w obu poprzednio opisanych metodach. Opisaną procedurę sączenia powtórzyłem także dla drugiej porcji białek uzyskanych po chromatografii powinowactwa i uzyskałem identyczny wynik. Z połączonych frakcji z obu sąceń uzyskałem zagęszczony preparat o objętości 1,4ml który zawierał 3,55mg/ml Ssq1, 1,46mg/ml Hsc20 oraz 1,22mg/ml Isu1 (Ryc. 37).

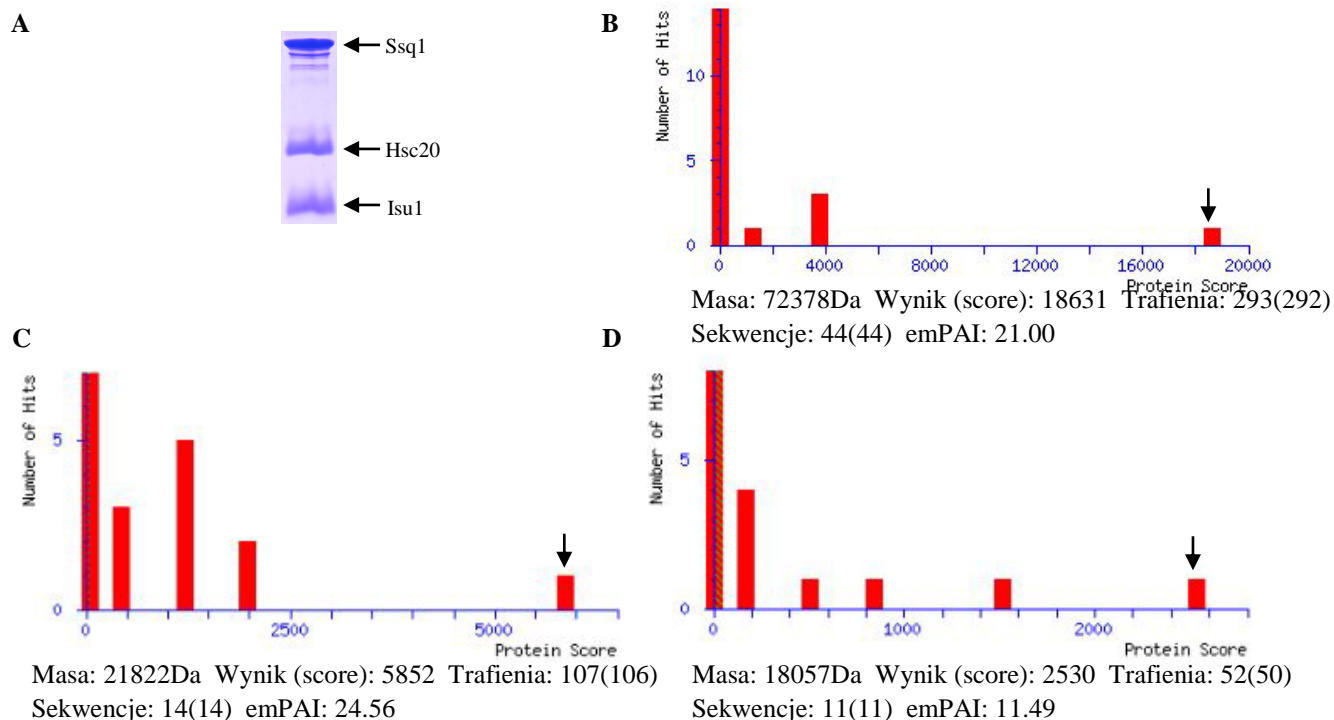


### Ryc.37 Ocena stężenia oczyszczonego kompleksu białkowego Ssq1:Hsc20:Isu1

*Pierwsze trzy ścieżki przedstawiają wzorcowy preparat BSA, odpowiednio 0,5µg, 1µg, oraz 2µg. Następnie opisane są ścieżki zawierające kompleks białkowy Ssq1:Hsc20:Isu1. Na kolejne ścieżki naniosłem odpowiednio 2µl, 3µl, 4µl oraz 6µl uzyskanego preparatu, który wcześniej rozcieńczyłem 5-krotnie. Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała, że stężenie uzyskanego białka Ssq1 znajdującego się w tym kompleksie wynosi 3,55 mg/ml, stężenie białka Hsc20 wynosi 1,46mg/ml, natomiast stężenie białka Isu1 wynosi 1,22mg/ml. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie.*

Dodatkowo została przeprowadzona analiza z wykorzystaniem spektrometrii masowej (Ryc.38), której celem było potwierdzenie, że prążki obserwowane na żelu zawierają wyłącznie białka analizowanego kompleksu. W związku z tym po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego uzyskanego preparatu kompleksu w żelu poliakrylamidowym, wyciąłem fragmenty żelu obejmujące poszczególne prążki o masach odpowiadających masie Ssq1, Hsc20 i Isu1 i następnie te fragmenty dalej były analizowane.

Spektrometria mas potwierdziła, że obserwowane prążki zawierają interesujące mnie białka i jednocześnie pośrednio potwierdziła wysoką wydajność formowania się kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1 w tym doświadczeniu. Na kolejnym etapie aby potwierdzić, że otrzymałem kompleks potrójny w obrębie którego znajdują się wszystkie trzy białka przeprowadziłem dwa eksperymenty. Pierwszym była elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach natywnych (Ryc. 39).



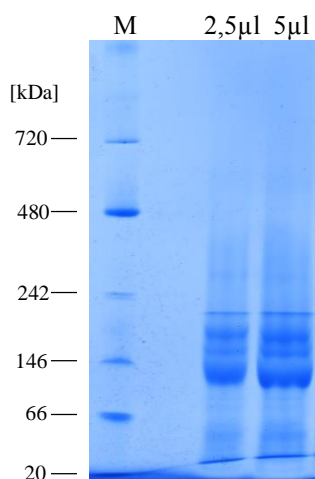
### Ryc.38 Analiza spektrometrii masowej prążków z żelu SDS-PAGE oczyszczonego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1

A. Rozdział elektroforetyczny białek kompleksu Ssq1T239/A-His:Hsc20:Isu1. Na żel zostało naniesione 4 $\mu$ l rozcieńczonego 5-krotnie preparatu kompleksu. Białka rozdzielane metodą SDS-PAGE barwilem Coomassie. Następnie wyciąłem fragmenty żelu zawierające białka odpowiadające masom molekularnym białek kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 i te były następnie analizowane z wykorzystaniem spektrometrii masowej.

B. Wynik identyfikacji peptydu w ramach wyszukiwania na serwerze MASCOT. Słupek o największej wartości Wyniku (Score) na osi X reprezentuje białko o największej pewności identyfikacji. Serwer zidentyfikował to białko jako Ssq1, podana masa w Da jest przypisana do słupka oznaczającego Ssq1. Duża przerwa między słupkiem Ssq1, a pozostałymi oznacza dużą czystość próbki peptydów.

C. Identyfikacja peptydu jako fragmentu białka Hsc20.

D. Identyfikacja peptydu jako fragmentu białka Isu1.



### Ryc.39 Elektroforeza natywna kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1

Rozdział w warunkach natywnych kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Pierwsza ścieżka przedstawia wzorzec masowy (M). Na następne dwie ścieżki naniosłem oczyszczony preparat kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 w objętości 2,5 $\mu$ l oraz 5 $\mu$ l. Białka po rozdziale elektroforetycznym barwilem Coomassie.

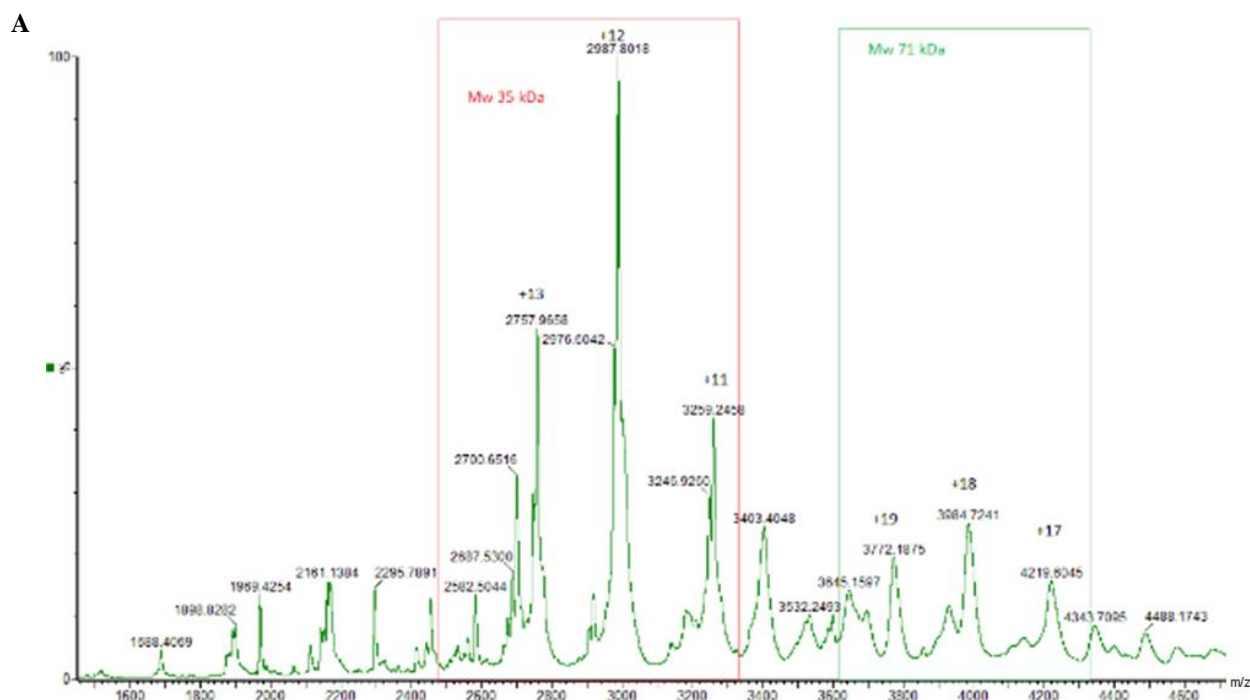
Natywna elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych (Native PAGE) odbywa się w warunkach niedenaturujących. Zarówno bufor do elektroforezy, jak i bufor w którym jest rozpuszczone białko nie zawierają substancji denaturujących (np. SDS, mocznik, chlorowodorek guanidyny). W związku z tym elektroforeza w warunkach natywnych pozwala na analizę kompleksów białkowych, które w warunkach denaturujących ulegają rozpadowi).

Tempo migracji białek podczas tej analizy zależy od licznych czynników, takich jak:

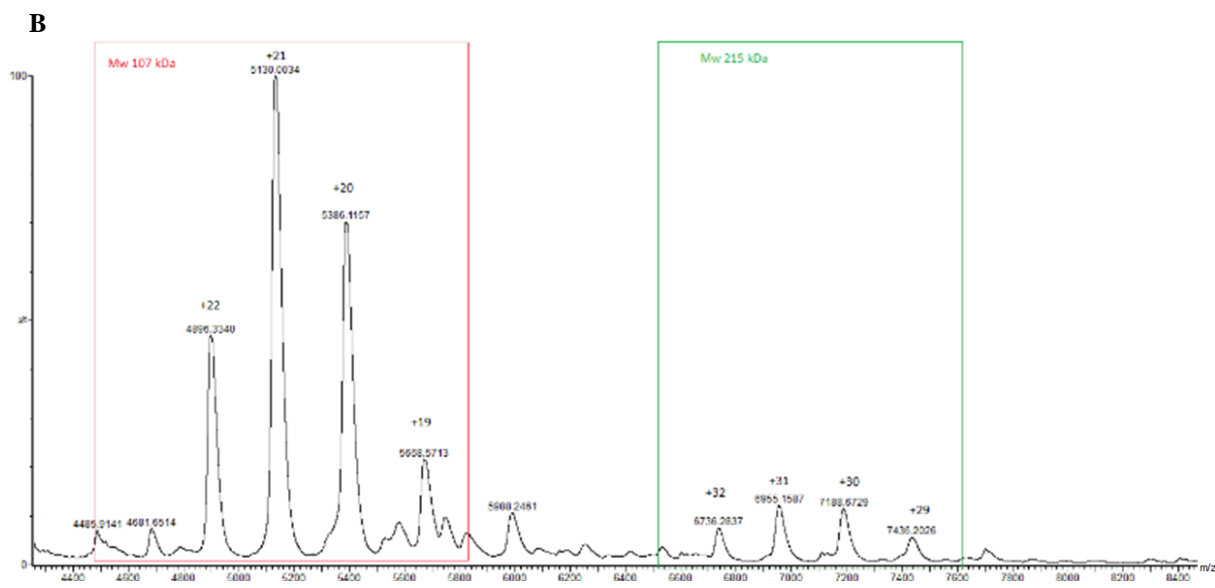
- wielkość białka;
- jego struktura przestrzenna;
- sumaryczny ładunek elektryczny;
- obecność związanych kofaktorów;
- obecność modyfikacji potranslacyjnych (Wittig i Schägger 2008, Yan i Forster 2009).

Uzyskany obraz po rozdiale elektroforetycznym wykazał, że dominującym prążkiem na żelu jest prążek odpowiadający masie około 139kDa, a więc masie kompleksu, w którym obecne są wszystkie trzy białka Ssq1, Hsc20 oraz Isu1.

Natomiast drugim eksperymentem, który pozwolił stwierdzić, że uzyskałem kompleks obejmujący trzy białka, była spektroskopia masowa w warunkach natywnych (Ryc. 40). Natywna spektrometria mas to technika, która umożliwia badanie topologicznie nienaruszonych kompleksów białkowych z wysoką czułością i teoretycznie nieograniczonym zakresem masy. W związku z tym opisane narzędzie może dostarczyć informacji uzupełniających do uznanych technik w biologii strukturalnej na temat dokładnego składu, struktury lub dynamiki kompleksu białkowego (Heck 2008).







#### Ryc.40 Natywna spektrometria masowa kompleksu Hsc20:Isu1 oraz Ssq1:Hsc20:Isu1

A. widmo analizy uzyskane w wyniku przeprowadzonej natywnej spektrometrii masowej preparatu kompleksu Hsc20:Isu1. Szczyty zaznaczone czerwonym prostokątem oznaczają heterodimer 35kDa, natomiast zielonym prostokątem heterotetramer 71kDa będący podwójnym dimerem.

B. widmo analizy uzyskane w wyniku przeprowadzonej natywnej spektrometrii masowej preparatu kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Szczyty zaznaczone czerwonym prostokątem oznaczają heterotrimer 107kDa, a zielonym prostokątem heteroheksamer 215kDa będący podwójnym trimerem.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły mi w przypadku analizy kompleksu podwójnego Hsc20:Isu1 wykazać, że analizowany preparat zawiera kompleks o masie 35kDa, a więc heterodimer czyli kompleks podwójny złożony z jednej kopii białka Hsc20 oraz białka Isu1. Ta analiza również wykazała, że obecna jest pula białka tworząca kompleks o masie 71kDa, będący tetramerem czyli podwójnym heterodimerem złożonym z dwóch połączonych kompleksów Hsc20:Isu1. Z kolei analiza preparatu kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 potwierdziła, że uzyskany preparat zawiera kompleks o masie 107kDa, a więc heterotrimer złożony odpowiednio z jednej kopii Ssq1, Hsc20 oraz Isu1. Ta analiza także wykazała, że badany preparat białkowy obejmuje również kompleks o masie 215kDa czyli heksamer. Ten heksamer odpowiada podwójnemu trimerowi czyli dwóm złączonym kompleksom potrójnym.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że zastosowane podejście eksperymentalne, w którym to dwa białka posiadały znacznik histydynowy, pozwoliło na uzyskanie wydajnej nadprodukcji białek kompleksu w komórkach bakteryjnych oraz na jego efektywną izolację do dalszych analiz strukturalnych w oparciu o metodę HDX-MS.

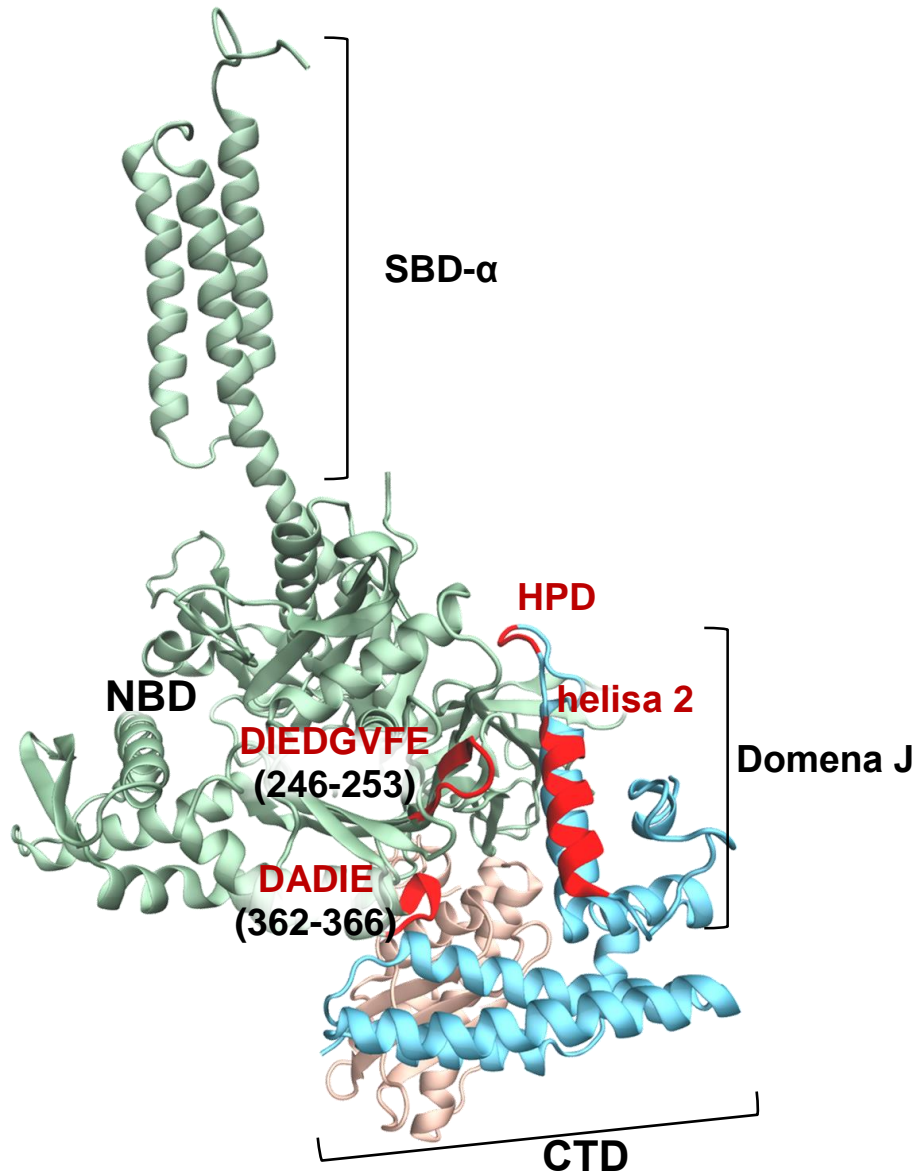
#### 4.4 Strukturalny model kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1 z naniesioną mapą oddziaływań pomiędzy białkami

Przystępując do analizy strukturalnej uzyskanego kompleksu białkowego na wstępie niezbędne było uzyskanie strukturalnego modelu kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Stosując metody bioinformatyczne dr inż. Bartłomiej Tomiczek, mgr Milena Stolarska, mgr Igor Grochowina (Zakład Biochemii Ewolucyjnej), mgr Łukasz Nierzwicki i dr inż. Jacek Czub

(Katedra Chemii Fizycznej Politechniki Gdańskiej) przygotowali model strukturalny kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Do przygotowania modelu strukturalnego została użyta struktura krystalograficzna (PDB ID: 3UO3) białka Jac1<sub>sc</sub> (aktualna nazwa białka Jac1<sub>sc</sub> to Hsc20) oraz model homologiczny białka Ssq1 uzyskany w oparciu o strukturę krystalograficzną jego bakteryjnego ortologa DnaK (PDB ID: 5NRO). Model Isu1 został przewidziany na podstawie struktury krystalograficznej bakteryjnego białka IscU (PDB ID: 3LVL). Model kompleksu uzyskano przy pomocy techniki dokowania molekularnego oraz symulacji dynamiki molekularnej w pełnoatomowym wariancie. Na ich podstawie zidentyfikowano sieć oddziaływań pomiędzy resztami domeny-J Jac1<sub>sc</sub>, a białkiem Ssq1. Celem tej analizy była identyfikacja reszt zlokalizowanych w miejscu oddziaływania białek oraz wyznaczenie sieci wiązań wodorowych i mostków solnych.

W przedstawionym modelu (Ryc. 41) białko Ssq1 znajduje się w konformacji otwartej, czyli w konformacji odpowiadającej sytuacji, kiedy białko Hsp70 związane jest z ATP. W tej konformacji domena SBD- $\alpha$  oraz SBD- $\beta$  są zadokowane na NBD, z miejscem wiązania substratu odsłoniętym. Helisa H2 obecna w domenie J białka Hsc20 wiąże się do fragmentu DIEDGFVE (246-253) w obrębie domeny NBD białka Ssq1. Helisa H3 domeny J jest zaś w pozycji bliskiej SBD- $\beta$ . Dodatkowo domena wiążąca substrat białka Hsc20 kontaktuje się z rejonem NBD białka Ssq1, obejmującym reszty D362 i D364. Widoczne jest też oddziaływanie między Hsc20 z Isu1, w obrębie białka Hsc20 zaangażowane są w to oddziaływanie reszty L105, L109, Y163, a w obrębie Isu1 reszty L63, V72 i F94 (Ryc. 42). Dochodzi też do oddziaływania między znanym z literatury silnie konserwowanym motywem P134V135K136 w białku Isu1 (Manicki i wsp., 2014), a pętlą w domenie SBD- $\beta$  białka Ssq1. Dokładny opis metodyki zastosowanej do uzyskania modelu kompleksu znajduje się w pracy magisterskiej mgr Igora Grochowiny (Grochowina, 2019).





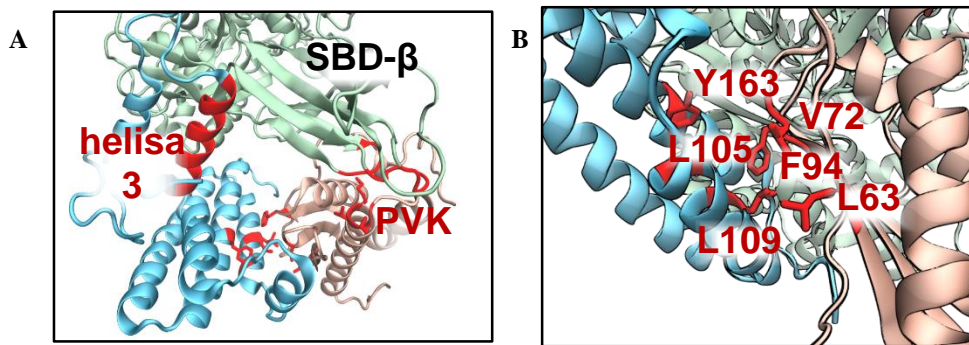
#### Ryc.41 Model strukturalny kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1

Struktura kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 z zaznaczonym motywem HPD i helisą 2 białka Hsc20, domena Hsc20 wiążącą substrat (CTD) tego białka. Analiza strukturalna uzyskanego modelu wykazała, że helisa 2 wiąże się do fragmentu DIEDGVFE w obrębie domeny NBD białka Ssq1, natomiast domena CTD białka Hsc20 oddziałuje z fragmentem DADIE w obrębie domeny NBD białka Ssq1.

Grafika została przygotowana przez mgr Igora Grochowinę z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed.

W celu dokładnej analizy interakcji w kompleksie potrójnym oczyściłem ten kompleks, który następnie został wykorzystany w przeprowadzonych przez mgr Katarzynę Dąbrowską doświadczeniach wymiany wodoru na deuter sprzężonej z spektrometrią masową (ang. *Hydrogen — Deuterium eXchange coupled with Mass Spectrometry*, HDX-MS). Próbką niedeuterowana służy do identyfikacji peptydów. Poziomą wymianę określa się przez porównanie centroidu masy całej obwiedni izotopowej białka w zerowym czasie inkubacji (białko rozcieńczone do buforu D<sub>2</sub>O z buforem STOP) do centroidów masy białek w

poszczególnych czasach inkubacji. Różnice w poziomie wymiany określają różnice w stabilności sieci wiązań wodorowych i w mniejszym stopniu dostępności wody. Porównania mogą być przeprowadzone na różne sposoby. Jednym podejściem jest porównanie stopnia wymiany wodoru-deuteru w obrębie białka, analizując proces w czasie zero i w wybranym innym czasie. Kolejne podejście to porównanie stopnia tej wymiany w obrębie białka inkubowanego osobno w stosunku do białka inkubowanego z białkiem tworzącym z nim kompleks. Wyznaczenie poziomów deuterowania poszczególnych peptydów po trawieniu pepsyną pozwala na uzyskanie informacji o profilu wymiany całego białka.



#### Ryc.42 Model oddziaływania Isu1 z pozostałymi białkami kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1

**A Zbliżenie na miejsce oddziaływania Ssq1 z Isu1** Model strukturalny z zaznaczonym motywem PVK białka Isu1 oddziałującym z pętlą w domenie SBD-β białka Ssq1.

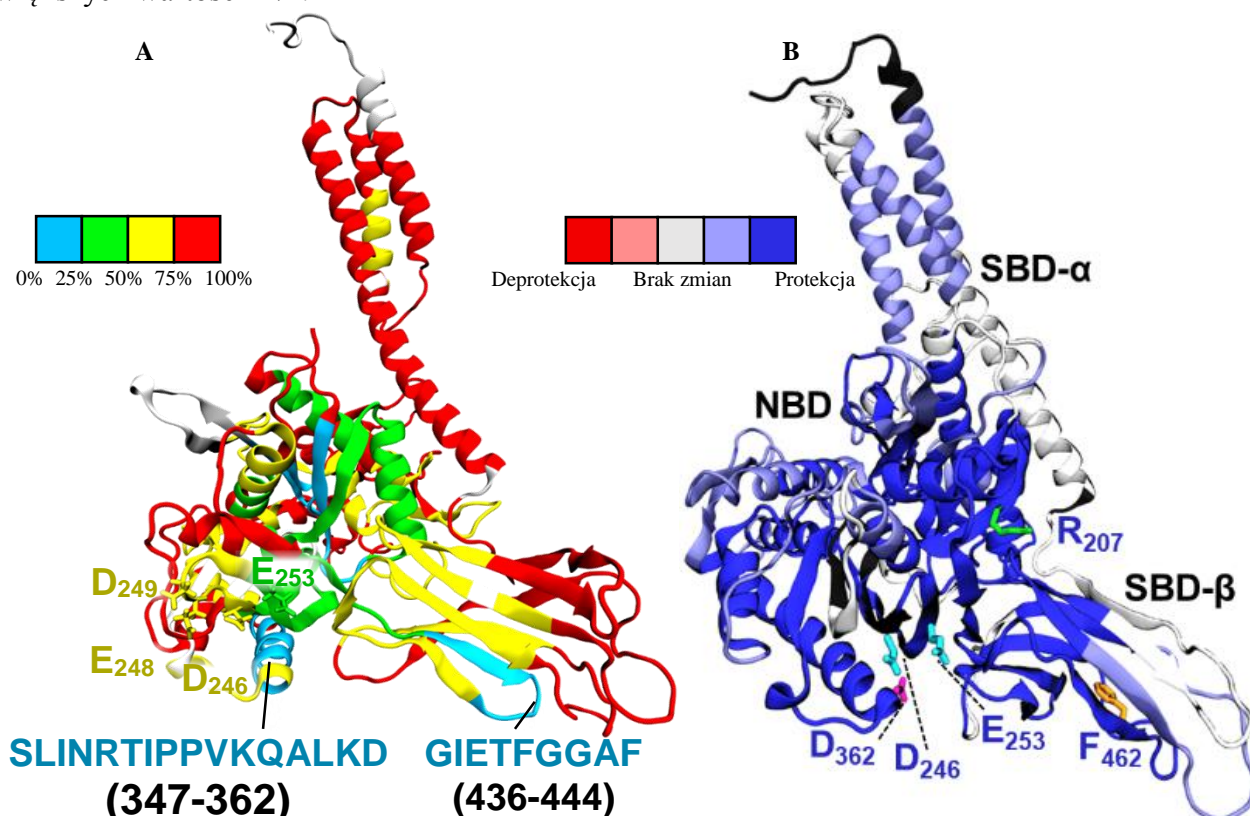
**B Zbliżenie na miejsce oddziaływania Hsc20 z Isu1** Zaznaczone reszty hydrofobowe odpowiedzialne za oddziaływanie białka Hsc20 z białkiem Isu1.

Grafika została przygotowana przez mgr Igora Grochowinę z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed.

Do analizy zostały wykorzystane oczyszczone preparaty pojedynczych białek Ssq1<sup>T239/A</sup>, Hsc20 oraz Isu1, kompleks podwójny Hsc20:Isu1 oraz kompleks potrójny Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1. Pomiary wymiany deuterowej poszczególnych białek i kompleksów były przeprowadzone we współpracy z mgr Katarzyną Dąbrowską z Laboratorium Spektrometrii Mas prowadzonym przez Prof. Michała Dadleza z Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Procedura polegała na inkubacji białek w buforze zawierającym D<sub>2</sub>O, a następnie trawieniu za pomocą pepsyny. W wyniku trawienia uzyskiwane były peptydy które następnie były rozdzielane i wykrywane w systemie ultrasprawnego chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas Synapt G2 HDMS firmy Waters. Lista peptydów była wspólna dla danego białka w każdym z badanych stanów. Każde z badanych białek charakteryzowało się znacznym stopniem pokrycia sekwencji białka uzyskanymi peptydami i wysokim poziomem redundancji, co należy rozumieć przez średnią ilość peptydów na aminokwas.

Dany peptyd nigdy nie będzie jednorodny w ilości związanych deuteronów w aminokwasowym łańcuchu głównym. Najliczniejszej głównej formie o danej wartości m/z zawsze będą towarzyszyć mniej liczne formy danego peptydu ze związanymi dodatkowymi deuteronami (o większej wartości m/z) lub bez dodatkowych deuteronów po ich oddysocjowaniu (o mniejszej wartości m/z). W związku z tym pojedynczy peptyd zamiast pojedynczego sygnału będzie generował kilka sygnałów, które pod względem intensywności będą się układać w rozkład normalny w danym punkcie czasowym. Zwie się to obwiednią

izotopową. Wraz z inkubacją białek w D<sub>2</sub>O następuje przesunięcie środka ciężkości obwiedni (zwanego centroidem masy) izotopowej peptydów. Jest to zjawisko do którego obserwacji potrzebny jest czas. O zmianach można mówić gdy w danej skali czasowej obserwuje się wymianę amidowych wodorów w łańcuchu głównym białka. Podczas analizy HDX-MS można porównywać poziom wymiany wodoru-deuter w czasie w obrębie danego białka w kompleksie względem białka inkubowane osobno w mieszaninie reakcyjnej. Podczas takiej analizy mówi się o protekcji, jest to termin używany w opisie wyników HDX-MS odnoszący się do sytuacji, gdy dochodzi do stabilizacji wiązań wodorowych, co przekłada się na zmniejszenie tempa wymiany wodoru na deuter. Najczęściej do stabilizacji wiązań wodorowych w fragmencie danego białka dochodzi w sytuacji, gdy ten fragment oddziałuje z innym białkiem. Pośrednio zatem protekcja informuje nas o zaangażowaniu poszczególnych regionów białka w interakcje z pozostałymi białkami. Jest też możliwa odwrotna sytuacja zwana deprotekcją, której mechanizm polega na destabilizacji sieci wiązań wodorowych, co prowadzi do zwiększonej inkorporacji deuteru i przesunięcie centroidu masy w kierunku większych wartości m/z.



**Ryc.43 Model białka Ssq1 z nałożonymi wynikami HDX-MS**

Model białka Ssq1 w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1 z zaznaczonymi kolorami poziomami deuteracji. Panel A ryciny przedstawia poziomy wymiany, czerwonym kolorem zaznaczone są regiony najszybciej ulegające deuteracji. W przypadku panelu B naniesione są na model dane z analizy różnicowej uzyskane dla białka Ssq1, które było analizowane osobno, nie znajdując się w kompleksie potrójnym, względem poziomów deuteracji uzyskanych dla białka Ssq1 znajdującego się w kompleksie Ssq:Hsc20:Isu1. W tym przypadku kolor niebieski oznacza protekcję czyli sytuację, w której poziom deuteracji tych regionów białka Ssq1 jest niższy, gdy znajduje się ono w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1 względem białka analizowanego osobno. Kolor czerwony oznacza deprotekcję, czyli sytuację w której regiony Ssq1 w kompleksie ulegają szybszej wymianie na deuter w stosunku do białka Ssq1 analizowanego osobno, czyli kiedy nie znajduje się w kompleksie.

Grafika została przygotowana przez mgr Igora Grochowinę z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed.

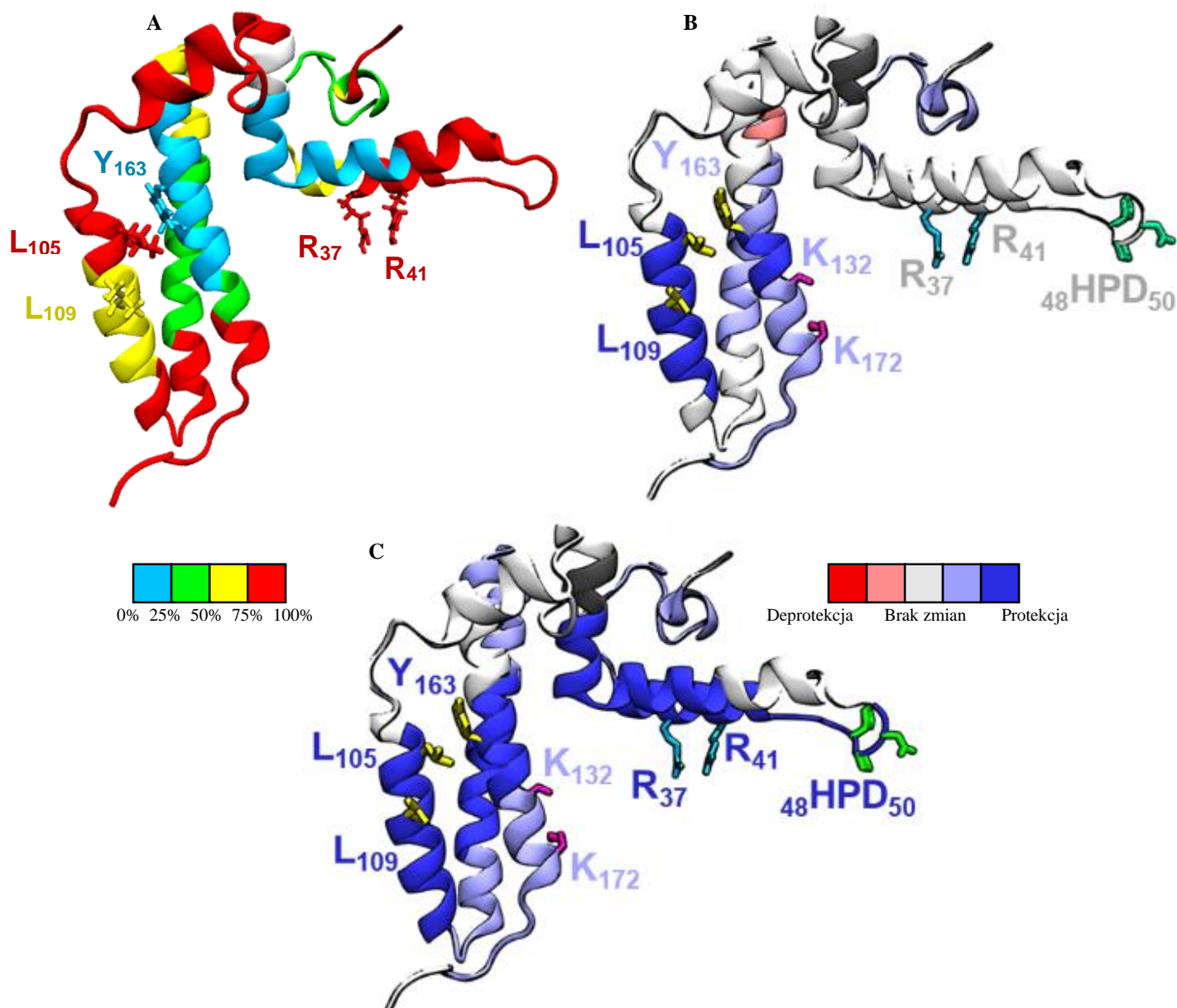
Uzyskane zostały rozkłady stopnia wymiany wodoru-deuter dla białka Ssq1 inkubowanego osobno w czasie 0 względem białka inkubowanego przez 5 minut oraz drugi rozkład dla białka Ssq1 inkubowanego osobno w czasie 25 minut względem kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 inkubowanego 25 minut. W przypadku Ssq1 znajdującego się w kompleksie potrójnym (Ryc.43A) obserwujemy największy stopień wymiany w obrębie SBD- $\alpha$ , pętli domeny SBD- $\beta$  oraz eksponowanych do roztworu fragmentach domeny NBD. Rdzeń białka Ssq1 ulega nikłej wymianie, gdyż nie jest eksponowany do roztworu. W przypadku zaś regionów zaangażowanych w oddziaływanie, widzimy, że ujemnie naładowane reszty aminokwasowe w obrębie rejonu DIEDGVFE (246-253) wymieniają się powoli, w szczególności reszta aminokwasowa E253, która nawet po 25 minutowym czasie inkubacji nie ulega wymianie w większym stopniu niż 50%. Te reszty są zaangażowane w oddziaływanie z domeną J białka Hsc20. Wśród innych przykładów powolnej wymiany należy wymienić rejon domeny NBD obejmujący peptyd SLINRTIPPVKQALKD (347-362) w modelu strukturalnym będący w kontakcie z domeną wiążącą substrat białka Hsc20 oraz zlokalizowany w obrębie SBD- $\beta$  peptyd GIETPGGAF (436-444) potencjalnie tworzący wiązania wodorowe z Isu1.

Na Ryc.44 są przedstawione wyniki wymiany deuterowej dla białka Hsc20. W obrębie białka inkubowanego osobno reszty L105 i L109 wymieniają się dynamicznie, niemniej poziom wymiany reszty Y163 po 5 minutach inkubacji nie przekracza 50% (Ryc.44A). Jednocześnie wcześniej przeprowadzona w naszym zespole analiza biochemiczna wykazała, że leucyna w pozycji 105 i 109 oraz tyrozyna w pozycji 163 białka Hsc20 są zaangażowanego w oddziaływanie tego białka z białkiem Isu1, a od strony Isu1 w wiązanie zaangażowane są reszty L63, V72 i F94 (Majewska i wsp., 2013).

Przeprowadzona analiza wymiany wodoru-deuter wskazuje, że rejon białka Hsc20 obejmujący reszty aminokwasowe L105 oraz L109 w kompleksie podwójnym z Isu1 oraz potrójnym z Isu1 i Ssq1, ulega znacznej protekcji (Ryc.44B). Wręcz rejon w którym te reszty się znajdują jest najsilniej chronionym spośród innych rejonów. Świadczy to o możliwym zaangażowaniu tych reszt w oddziaływanie z Isu1.

Z kolei porównanie poziomu wymiany wodoru-deuter po 5 minutach inkubacji w obrębie białka Hsc20, kiedy znajduje się ono w kompleksie z substratem względem białka znajdującego się w kompleksie z Ssq1<sup>T239/A</sup> i Isu1 można zaobserwować, że domena J białka Hsc20 jest bardziej stabilna, gdy jest związana z Ssq1 (Ryc.44C).

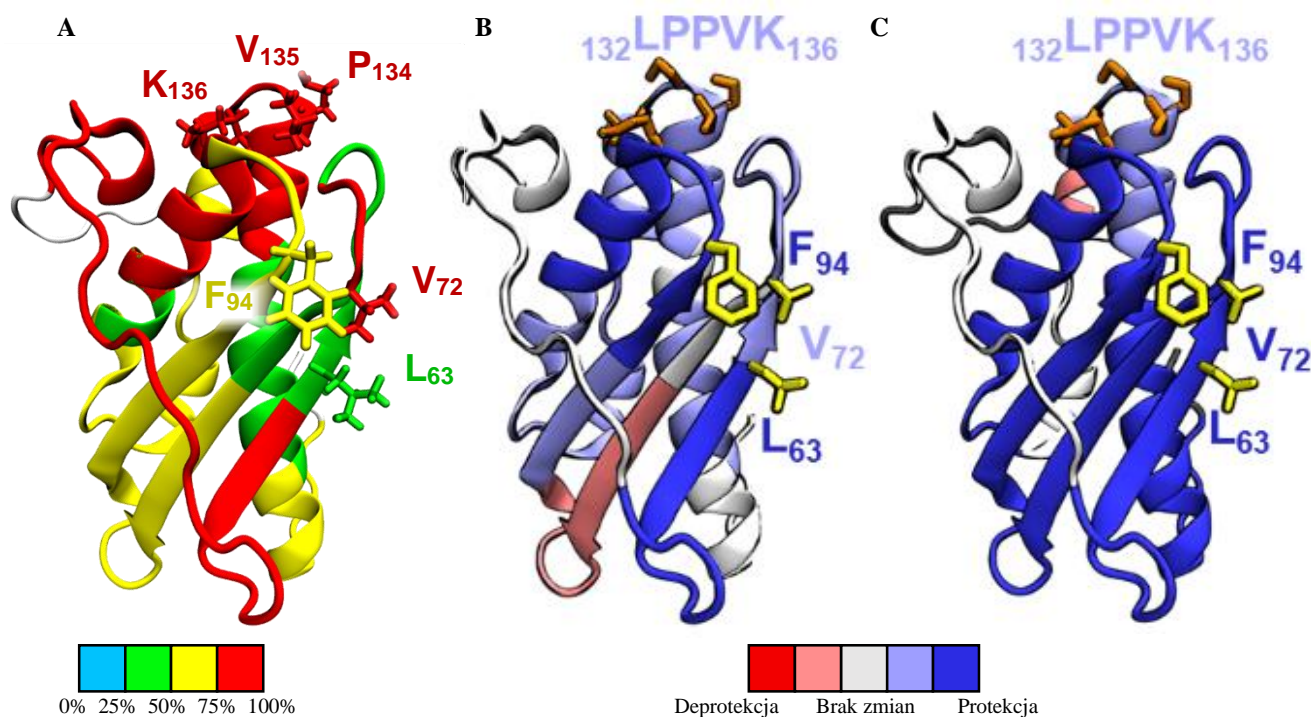




### Ryc.44 Model białka Hsc20 z nałożonymi wynikami HDX-MS

Model strukturalny białka Hsc20 z zaznaczonymi kolorami poziomami deuteracji. Panel A ryciny 44 przedstawia porównanie poziomów deuteracji między stanem w czasie 0, a stanem po 5 minutach inkubacji z  $D_2O$ , czerwonym kolorem zaznaczone są regiony najszybciej ulegające deuteracji. Na panelu B ryciny naniesione są na model Hsc20 dane uzyskane z analizy różnicowej białka Hsc20, które uwzględniają porównanie poziomów deuteracji białka Hsc20 analizowanego osobno, które nie znajdowało się w kompleksie, względem poziomów deuteracji uzyskanych dla białka Hsc20 znajdującego się w kompleksie Hsc20:Isu1. W tym przypadku kolor niebieski oznacza protekcję, czyli sytuację w której poziom deuteracji tych regionów białka Hsc20 analizowanego osobno jest niższy, niż w sytuacji gdy znajduje się ono w kompleksie Hsc20:Isu1. Kolor czerwony oznacza deprotekcję, czyli sytuację w której regiony Hsc20 w kompleksie ulegają szybszej wymianie na deuter w stosunku do eksperymentu w którym białko Hsc20 jest analizowane osobno. Kolor szary oznacza regiony ulegające wymianie w takim samym stopniu niezależnie czy białko jest analizowane w kompleksie czy osobno. Na panelu C przedstawiona jest różnicowa analiza uwzględniająca poziom deuteracji białka Hsc20 inkubowanego osobno, które nie znajdowało się w kompleksie, względem poziomów deuteracji uzyskanych dla białka Hsc20 znajdującego się w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1.

Grafika została przygotowana przez mgr Igora Grochowinę z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed.



#### Ryc.45 Model białka Isu1 z nalożonymi wynikami HDX-MS

Model strukturalny białka Isu1 z zaznaczonymi kolorami poziomami deuteracji. Panel A ryciny 45 przedstawia porównanie poziomu deuteracji między stanem w czasie 0, a stanem po 5 minutach inkubacji z  $D_2O$ , czerwonym kolorem zaznaczone są regiony najszybciej ulegające deuteracji. Panel B ryciny przedstawia naniesione na model dane z analizy różnicowej uzyskane dla białka Isu1, które uwzględniają porównanie poziomów deuteracji białka Isu1 inkubowanego osobno, które nie znajdowało się w kompleksie względem poziomów deuteracji białka Isu1 znajdującego się w kompleksie Hsc20:Isu1. W tym przypadku kolor niebieski oznacza protekcję, czyli sytuację w której poziom deuteracji tych regionów białka Isu1 jest niższy dla sytuacji gdy znajduje się ono w kompleksie Hsc20:Isu1 względem białka analizowanego osobno. Kolor czerwony oznacza deprotekcję, czyli sytuację w której regiony Isu1 w kompleksie ulegają szybszej wymianie na deuter, niż gdy białko Isu1 jest analizowane osobno. Kolor szary oznacza regiony ulegające wymianie w takim samym stopniu niezależnie czy białko jest analizowane w kompleksie czy osobno. Na panelu C jest przedstawiona różnicowa analiza, która obejmuje porównanie poziomów wymiany wodór-deuter w obrębie Isu1 znajdującego się w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1 względem Isu1 inkubowanego osobno.

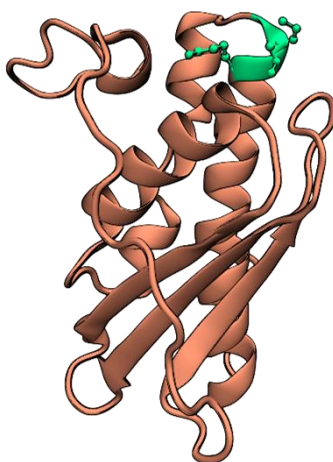
Grafika została przygotowana przez mgr Igora Grochowinę z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed.

Porównanie poziomów wymiany białek Ssq1, Hsc20 i Isu1 poza kompleksami pokazuje, że Isu1 wymienia się najszybciej, co może świadczyć o niewielkiej stabilności struktury (Ryc.45). Dla wszystkich preparatów wszystkich białek zbadano różne czasy inkubacji i zależnie od danego białka wybierano do dalszej analizy taki czas inkubacji, który dostarczał najwięcej informacji w danym przypadku. W przypadku eksperymentów dotyczących białek Hsc20 oraz Ssq1 najwięcej informacji dostarczały analizy poziomu wymiany po 5 minutowej inkubacji. W przypadku Isu1 ze względu na szybką wymianę najbardziej optymalne było wybranie do dalszych analiz sygnałów uzyskanych po 10s inkubacji. Reszty aminokwasowe znajdujące się w obrębie rdzenia  $\alpha$ -helisy oraz  $\beta$ -kartki wymieniają się w mniejszym stopniu, niż rejony eksponowane do rozpuszczalnika. Reszty L63, V72 i F94 odpowiedzialne za oddziaływanie z Hsc20 (Majewska i wsp., 2013) wymieniają się w mniejszym stopniu, niż pętla zawierająca motyw LPPVK, która

odpowiedzialna jest za oddziaływanie z Ssq1. W podwójnym kompleksie większość rejonów Isu1 jest chroniona przed wymianą wodoru-deuteru. Po związaniu Hsc20 można zaobserwować zmniejszenie stopnia wymiany w obrębie reszt L63, V72 i w mniejszym stopniu F94, a także rejonu zawierającego motyw PVK. Tak więc związanie Isu1 przez Hsc20 powoduje stabilizację białka Isu1, co sugeruje obserwowaną protekcję wielu miejsc białka. Co więcej dołączenie Ssq1 jako trzeciego białka powoduje jeszcze większą stabilizację Isu1, co podkreśla jeszcze głębszy błękit analizowanych rejonów białka Isu1 podlegających protekcji. W przypadku kompleksu potrójnego także reszta F94 i motyw PVK ulegają silnej protekcji (Ryc.45).

#### 4.5 Motyw PVK w obrębie substratu Isu1 determinuje wiązanie przez białko Ssq1

Analiza HDX-MS wykazała, że motyw LPPVK w obrębie białka Isu1 ulega w pewnym stopniu protekcji, gdy Isu1 jest w kompleksie z Hsc20 i Ssq1, lecz ta protekcja nie jest specyficzna tylko dla tego regionu, gdyż protekcji ulegają też otaczające peptydy. Ponadto protekcja jest już obserwowana, gdy białko Isu1 znajduje się w kompleksie z Hsc20, kiedy Hsp70 nie jest obecne w analizowanym kompleksie białkowym, co było dla mnie dość zaskakującym wynikiem. Dlatego wyniki HDX-MS choć sugerują, to nie mówią jednoznacznie o zaangażowaniu motywu LPPVK białka Isu1 w oddziaływanie z Ssq1. W związku z tym zadałem pytanie, czy zmutowana wersja Isu1, w którym motyw PVK został zamieniony na alaniny wykazuje defekt w tworzeniu kompleksu Ssq1<sup>T239/A</sup>:Hsc20:Isu1. Aby odpowiedzieć na to pytanie, przeprowadziłem doświadczenie typu precypitacja kompleksów białkowych, w którym wykorzystałem zmutowane białko fuzyjne Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST. Ryc.46 przedstawia zaznaczony na zielono motyw PVK w obrębie białka Isu1.

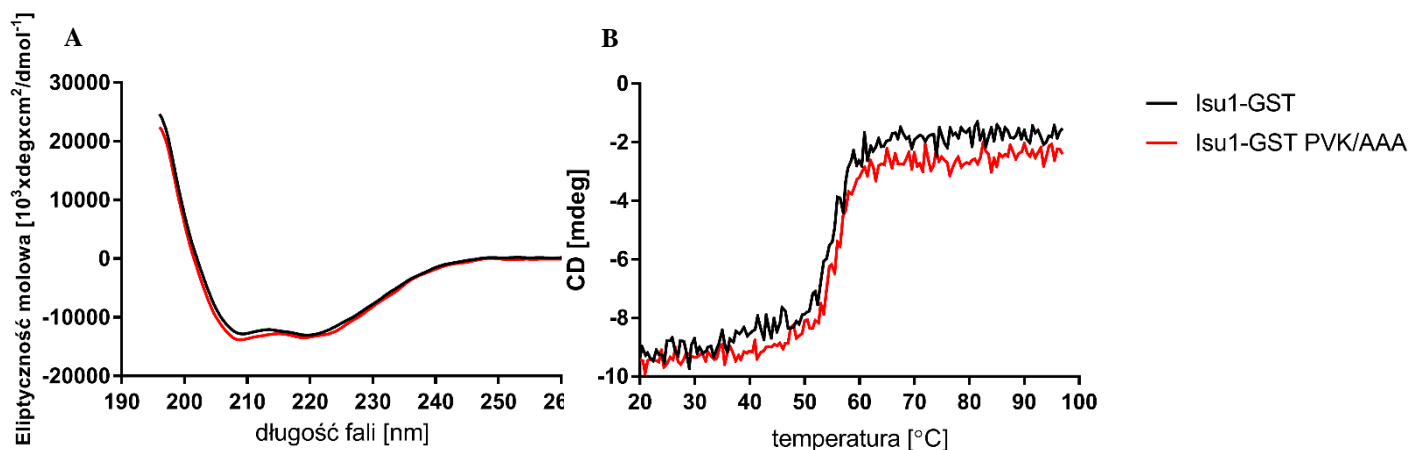


#### **Ryc.46 Model białka Isu1 z zaznaczonym motywem PVK**

*Model strukturalny białka Isu1 z zaznaczonym na zielono motywem PVK.*

*Model strukturalny został opracowany przez mgr Igora Grochowinę, mgr Łukasza Nierzwickiego i dr Bartłomieja Tomiczka.*

Na wstępie po oczyszczeniu zmutowanego wariantu Isu1, zweryfikowałem czy nie jest zaburzona struktura lub stabilność zmutowanej wersji białka Isu1. W tym celu przeprowadziłem analizę widm dichroizmu kołowego (Ryc.47A).



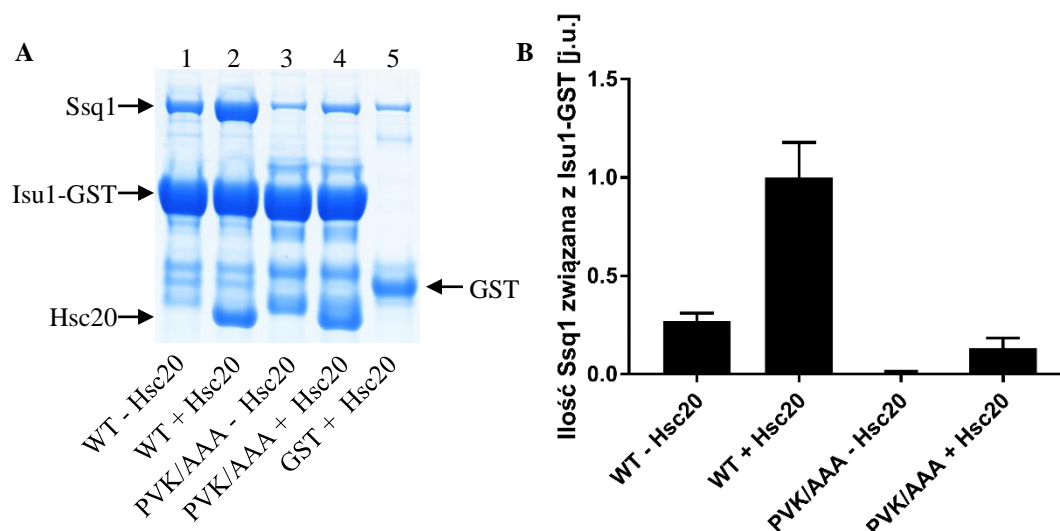
**Ryc.47 Analiza struktury i stabilności białka Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego**

Rycina A przedstawia widmo CD białka Isu1-GST i jego wariantu z mutacjami PVK/AAA wyrażone w jednostkach eliptyczności molowej. Stężenia obu wariantów białka podczas eksperymentu wynosiły 2 $\mu$ M. Rycina B przedstawia przebiegi topnienia obu wariantów Isu1 przy długości fali 220nm. Dla Isu1-GST temperatura topnienia wynosi 55,34°C, dla Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST temperatura topnienia wynosi 55,73°C.

Wyniki przeprowadzonej analizy wskazują, że wprowadzone mutacje w obrębie motywu PVK białka Isu1 nie wpływają na strukturę drugorzędową białka. Widmo tego wariantu jest bardzo zbliżone do widma białka fuzyjnego Isu1-GST, które zawiera dziką formę białka Isu1. Oba widma charakteryzują się obecnością szczytu przy długości fali 220nm która jest charakterystyczna dla struktury  $\alpha$ -helikalnej. Dodatkowo przeprowadziłem pomiar topnienia obu wersji białka fuzyjnego. Uzyskane krzywe topnienia jednoznacznie pokazują, że oba warianty charakteryzują się zbliżonym profilem topnienia i podobną temperaturą topnienia, odpowiednio Tm dla wariantu niezmutowanego wyniosła 55,34°C, a dla mutantu 55,73°C.

W następnej kolejności przeprowadziłem doświadczenie, którego celem było sprawdzenie jak wymiana reszt o dużych łańcuchach bocznych w motywie PVK na alifatyczną alaninę z prostym łańcuchem bocznym wpłynie na formowanie się kompleksu Ssq1 z Isu1 w obecności Hsc20 w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych (Ryc.48).





**Ryc.48 Wpływ mutacji PVK/AAA na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST**

**A Analiza SDS-PAGE kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności białka Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST**  
Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdzielanie techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5μM Isu1-GST, 2,5μM Hsc20 i 5μM Ssq1. Ścieżka nr 1 przedstawia ilość białka Ssq1<sup>T239A</sup>, które precypitowało z białkiem Isu1-GST typu dzikiego przy braku Hsc20. Ścieżka nr 2 przedstawia analogiczną reakcję w obecności Hsc20, co prowadzi do wydajnego wiązania Ssq1<sup>T239A</sup> do precypitowanego kompleksu. Ścieżka nr 3 prezentuje białko Isu1-GST w wersji z mutacją PVK/AAA, precypitowane z Ssq1<sup>T239A</sup> przy braku Hsc20 w mieszaninie reakcyjnej. Natomiast ścieżka nr 4 przedstawia podobną reakcję w obecności Hsc20. Ścieżka nr 5 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 do złoża z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczna analiza ilości Ssq1<sup>T239A</sup> w kompleksie z Isu1-GST oraz Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST**  
Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST typu dzikiego lub z wariantem z mutacją PVK/AAA. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1<sup>T239A</sup> związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Wariant Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST tworzył kompleks z Ssq1 w obecności Hsc20 ze znacznie zmniejszoną wydajnością. Ilość Ssq1 związanego do Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST spadła do poziomu 13% w stosunku do doświadczenia kontrolnego, w którym wykorzystałem dziką wersję Isu1-GST. W przypadku braku białka Hsc20 w mieszaninie reakcyjnej, ilość Ssq1 związanego do dzikiego wariantu Isu1-GST spadła do poziomu 27% w stosunku do eksperymentu, w którym białko Hsc20 było obecne. Natomiast w przypadku Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST ilość precypitowanego Ssq1 wraz z białkiem fuzyjnym, którą obserwowałem była na poziomie tła reakcji. Uzyskane przeze mnie wyniki są w pełni zgodne z danymi literaturowymi, w których wykorzystano do analiz białko Ssq1 typu dzikiego (Dutkiewicz i wsp., 2004) i jednoznacznie potwierdzają, że motyw PVK ma istotny wpływ na oddziaływanie białka Isu1 z białkiem Ssq1, jednocześnie jego zmutowanie nie zaburza oddziaływania z białkiem Isu1. Podsumowując mogę stwierdzić, że moje eksperymenty potwierdziły, że mutacje w obrębie motywu PVK prowadzą do zaburzenia formowania potrójnego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1.

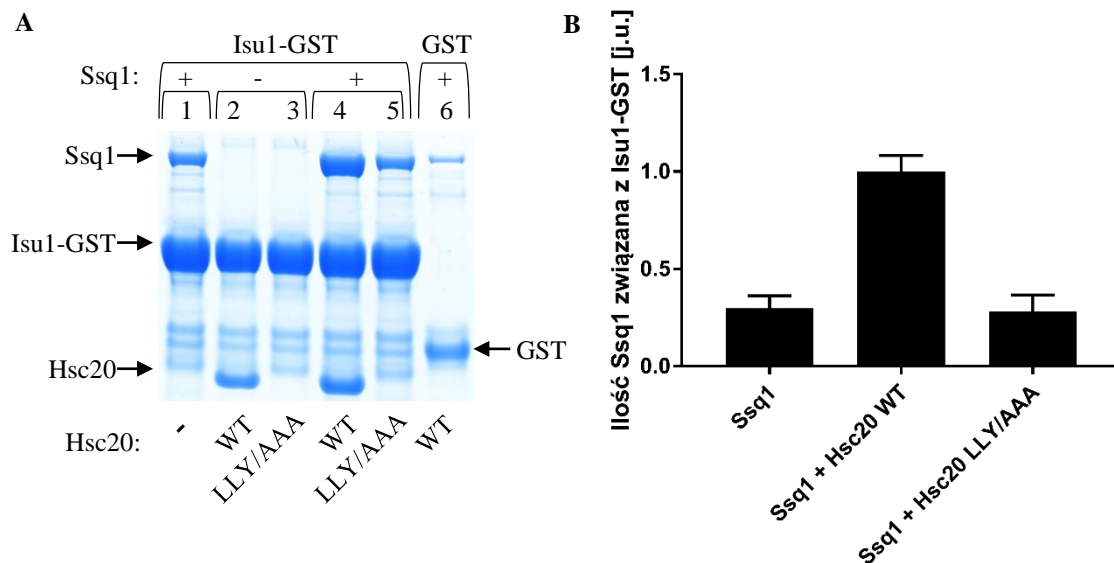
Dotychczasowa literatura, wskazuje że motyw PVK w obrębie homologów białka Isu1 jest silnie konserwowany ewolucyjnie. Ponadto wykazano, że motyw PVK drożdżowego białka Isu1 jest zaangażowany w wiązanie zarówno mtHsp70 Ssq1 oraz drożdżowej

frataksyny – białka Yfh1 (Manicki i wsp., 2014). Zbadano także wpływ mutacji w obrębie motywu PVK na wzrost komórek drożdży *S. cerevisiae*. W doświadczeniach *in vivo* wykorzystano szczep drożdży, u których usunięto natywną kopię genu kodującego Isu1 WT, a które to posiadały wersję genu z mutacjami w motywie PVK. Szczepy posiadające jako jedyną kopię genu *ISU1* jego zmutowaną wersję *Isu1*<sup>K136/A</sup> i *Isu1*<sup>P134,V135,K136/AAA</sup> wykazywały fenotyp letalny. Natomiast drożdże z mutacją *Isu1*<sup>P134/A</sup> charakteryzowały się spowolnionym wzrostem, a z mutacjami *Isu1*<sup>P133/A</sup> i *Isu1*<sup>V135/A</sup> rosły jak szczep z dziką wersją genu (Dutkiewicz i wsp., 2004). Doświadczenia, w których analizowano formowanie kompleksu białka Isu1 z białkiem Ssq1 w obecności białka J poprzez wirowanie w gradiencie glicerolu pokazały, że mutanty *Isu1*<sup>L132/A</sup> i *Isu1*<sup>P133/A</sup> tworzyły kompleks Ssq1:Isu1 podobnie jak białko typu dzikiego *Isu1* WT. Natomiast mutanty *Isu1*<sup>P134/A</sup>, *Isu1*<sup>V135/A</sup>, *Isu1*<sup>K136/A</sup> i *Isu1*<sup>P134,V135,K136/AAA</sup> nie oddziaływały z Ssq1. W końcu eksperymenty, w których weryfikowano stymulację aktywności ATPazowej Ssq1 przez substrat Isu1 w obecności nadmiaru białka Hsc20 pokazały, że warianty z mutacjami L132/A i P133/A stymulowały aktywność ATPazową białka Ssq1 w sposób zbliżony do *Isu1* typu dzikiego. Z kolei *Isu1*<sup>P134/A</sup>, *Isu1*<sup>K136/A</sup> oraz *Isu1*<sup>V135/A</sup> w obecności białka J charakteryzowały się znacznie obniżoną zdolnością do stymulacji aktywności białka Ssq1. Tylko w przypadku mutantu *Isu1*<sup>V135/A</sup> zaobserwowano, że defekt może zostać skompensowany jego nadmiarem w mieszaninie reakcyjnej. Natomiast potrójny mutant nie był zdolny do symulacji aktywności ATPazowej mtHsp70. Jednocześnie doświadczenia polegające na wirowaniu w gradiencie glicerolu jednoznacznie pokazały, że mutacje w obrębie motywu LPPVK nie wpływają na oddziaływanie z Hsc20 (Dutkiewicz i wsp., 2004).

Podobną analizę przeprowadzono także dla bakteryjnego białka IscU, które stanowi element bakteryjnego systemu ISC. Również te badania pokazały, że analogiczny motyw LPPVK ze szczególnym naciskiem na trzy aminokwasy PVK jest kluczowy dla oddziaływania z białkiem opiekuńczym HscA (Hoff i wsp., 2003). W toku badań, najpierw przeprowadzono analizę, której celem był pomiar stymulacji aktywności ATPazowej białka HscA przez peptyd ELPPVKIHC zawierający wspomniany motyw. Stymulacja aktywności przez ten peptyd była bardzo zbliżona do stymulacji przez białko IscU. Udział poszczególnych reszt w stymulacji aktywności HscA zbadano w doświadczeniach, w których wykorzystano peptydy, w których poszczególne reszty aminokwasowe motywu LPPVK zamieniono na alaninę. Wszystkie mutanty alaninowe wykazywały mniejszą zdolność do stymulacji aktywności ATPazowej białka HscA przy czym największy defekt obserwowano w przypadku mutacji P101/A. Następnie przygotowano mutanty alaninowe w obrębie białka IscU. Pomiar stymulacji aktywności ATPazowej HscA wykazały, że mutanty IscU w obrębie motywu LPPVK charakteryzują się także obniżoną zdolnością do stymulacji ATPazy HscA, przy czym największy defekt zaobserwowano w doświadczeniach, w których wykorzystano mutanty *IscU*<sup>P101/A</sup> i *IscU*<sup>K103/A</sup>. Jednocześnie pokazano, że w przypadku zmutowanej wersji białka *IscU*<sup>P101/A</sup> można było kompensować defekt poprzez zastosowanie wyższych stężeń białka w eksperymentach. Tak więc uzyskane wyniki dla systemu bakteryjnego wskazują, że mutacje w motywie LPPVK obniżają zdolność IscU do wiązania się do HscA i pośrednio wpływają na obniżenie zdolności stymulacji aktywności ATPazowej w warunkach niskiego stężenia IscU.

## 4.6 Hydrofobowe reszty aminokwasowe L105, L109, Y163 w obrębie białka Hsc20 są zaangażowane w interakcję z substratem Isu1

W rozdziale 4.4 opisałem doświadczenie HDX, które pozwoliło wytypować reszty aminokwasowe L105, L109, Y163 w obrębie białka Hsc20 jako reszty zaangażowane w oddziaływanie z Isu1 w obrębie potrójnego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. W związku z obserwowaną protekcją tych reszt Hsc20 w doświadczeniach HDX-MS postanowiłem oczyścić wariant Hsc20 zawierający substytucje alaninowe tych trzech reszt. Wcześniejsze dane literaturowe pokazały, że wprowadzone mutacje w obrębie tego motywu nie zaburzą struktury i stabilności białka Hsc20 (Ciesielski i wsp., 2012). Widmo dichroizmu zmutowanego wariantu Hsc20 było identyczne z widmem Hsc20 typu dzikiego.



**Ryc.49** Wpływ mutacji LLY/AAA na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST

### **A** Analiza SDS-PAGE kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności białka Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup>

Rozdział techniką SDS-PAGE precypitowanych kompleksów Isu1-GST z białkami, uzyskanych w wyniku inkubacji mieszanin reakcyjnych zawierających 2,5 μM Isu1-GST, 2,5 μM Hsc20 i 5 μM Ssq1. Ścieżka nr 1 przedstawia ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> precypitowanego z Isu1-GST przy braku Hsc20. Ścieżka nr 2 przedstawia uzyskany kompleks, kiedy w reakcji obecne było białko Hsc20 WT, bez Ssq1, a ścieżka nr 3 reakcję w obecności Hsc20<sup>LLY/AAA</sup>. Z kolei ścieżka nr 4 przedstawia kompleks z Isu1-GST, kiedy mieszanina reakcyjna zawierała Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz białko Hsc20 WT, analogicznie ścieżka nr 5 Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz Hsc20<sup>LLY/AAA</sup>. Ścieżka nr 6 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 WT do złoza z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B** Densytometryczna analiza ilości Ssq1<sup>T239/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1 precypitującego z Isu1-GST zależnie od wariantu białka Hsc20. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> związanego w kompleksie z Isu1-GST WT w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Tak więc oczyściłem wariant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> i zbadałem jego zdolność do tworzenia kompleksu potrójnego z białkiem Ssq1 i Isu1 (Ryc.49).

Wariant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> wykazał znacznie obniżone powinowactwo do Isu1-GST. Przy wysycającym stężeniu Hsc20 nie był zdolny do oddziaływania z Isu1. Natomiast ilość Ssq1, które precypitowała wraz z Isu1-GST w obecności Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> była

równa ilości Ssq1, którą obserwowałem w doświadczeniu, w którym białko Hsc20 nie było obecne w mieszaninie reakcyjnej i stanowiło 37% ilości Ssq1, którą obserwowałem w kontroli pozytywnej, czyli w eksperymencie, w którym było obecne białko Hsc20 typu dzikiego. Tak więc wynik przeprowadzonego eksperymentu jednoznacznie pokazał, że substytucje alaninowe trzech reszt aminokwasowych L105, L109, Y163 prowadzą do zaburzenia oddziaływania między Hsc20, a Isu1, co przekłada się na brak możliwości efektywnego formowania kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1.

Uzyskane przeze mnie wyniki są w pełni zgodne z wcześniejszą literaturą. W pracy Ciesielski i wsp., 2012, w doświadczeniach, w których badano stymulację aktywności ATPazowej białka Ssq1, zaobserwowano całkowity brak stymulacji aktywności, gdy w mieszaninie reakcyjnej był obecny wariant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup>. Natomiast analiza wiązania Isu1 do Ssq1 w obecności Hsc20 i ATP z użyciem techniki wirowania w gradiencie glicerolu pokazała, że wariant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> nie jest zdolny do ukierunkowania białka Isu1 do wiązania przez Ssq1 w przeciwieństwie do białka Hsc20 typu dzikiego, którego obecność w mieszaninie reakcyjnej stymulowała efektywne formowanie kompleksu Ssq1:Isu1.

W doświadczeniach *in vivo*, w których wykorzystano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* z delecją chromosomalnego genu *HSC20*, zbadano efekt fenotypowy mutacji w obrębie motywu LLY genu *HSC20*. Na wstępie przygotowano szczep, który posiadał gen *HSC20* typu dzikiego pod kontrolą promotora GAL-10. Hodowla takiego szczepu na pożywce zawierającej glukozę prowadziła do zahamowania ekspresji genu *HSC20*, natomiast dodanie galaktozy do pożywki prowadziło do efektywnej indukcji ekspresji analizowanego genu. Skonstruowany szczep został transformowany plazmidem zawierającym gen *HSC20* pod kontrolą natywnego promotora – szczep ten stanowił kontrolę pozytywną. Równoległe przygotowano szczep GAL-*HSC20*, który był transformowany plazmidem, który zawierał zmutowaną wersję genu *hsc20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> także pod kontrolą natywnego promotora. Hodowla obu szczepów na pożywce z glukozą prowadziła do sytuacji, w której jedyną kopią genu *HSC20*, która ulegała ekspresji była kopia obecna na plazmidzie. Ten eksperyment jednoznacznie pokazał, że komórki drożdżowe, w których ma miejsce ekspresja genu *hsc20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup>, charakteryzowały się silnie spowolnionym wzrostem na podłożu z glukozą w stosunku do kontroli pozytywnej, czyli do szczepu, który posiadał na plazmidzie dziką kopię genu *HSC20*. Na kolejnym etapie wyizolowano mitochondria z opisanych szczepów i przeprowadzono analizę aktywności mitochondrialnych enzymów zawierających centra Fe/S - akonitazy oraz dehydrogenazy bursztynianowej. W przypadku mitochondrii ze szczepu z mutacją *hsc20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> aktywność akonitazy wynosiła 15%, natomiast aktywność dehydrogenazy bursztynianowej 10% aktywności, która była obserwowana dla tych enzymów w przypadku mitochondrii wyizolowanych ze szczepu z dziką kopią genu *HSC20*. Tak więc w podsumowaniu mogę stwierdzić, że mutacje trzech reszt aminokwasowych L105, L109 i Y163 w obrębie Hsc20 uniemożliwia utworzenie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1, co z kolei na poziomie komórkowym przekłada się na upośledzenie biosyntezy centrów Fe/S, a to ma swoje odzwierciedlenie w fenotypie komórek drożdżowych.

Podobnie jak w przypadku motywu LPPVK, badania nad oddziaływaniem bakteryjnego białka zawierającego domenę J, białka HscB, z molekularnym rusztowaniem IscU stanowiły podstawę do badań nad systemem drożdżowym. W domenie C-terminalnej białka HscB zidentyfikowano hydrofobowe reszty L92, M93, F153 jako potencjalnie

zaangażowane w oddziaływanie z IscU. Na wstępie przygotowano mutanty z wprowadzonymi substytucjami alaninowymi i sprawdzono poziom oddziaływania mutantów HscB z IscU, wykorzystując pomiary kalorymetryczne. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie powinowactwa białka HscB do IscU. I tak powinowactwo HscB typu dzikiego, do IscU wynosiło 9 $\mu$ M. Natomiast wszystkie trzy mutacje w obrębie HscB prowadziły do zmiany powinowactwa i obniżenia do poziomu 200 $\mu$ M czyli do 20-krotnej różnicy w stosunku do białka typu dzikiego (Füzéry i wsp., 2011).

## 4.7 Sieć oddziaływań kluczowych dla oddziaływania białka Hsc20 z białkiem Ssq1

Uzyskane wyniki z analizy HDX-MS potwierdziły, że domena J jest mocno zaangażowana w interakcję Hsc20 z Ssq1. Obecność domeny J jest elementem definiującym przynależność białka do klasy białek współpracujących z Hsp70 (Kampinga i Craig 2010), umożliwiającym stymulację aktywności Hsp70. Ta silnie konserwowana domena zawiera cztery  $\alpha$ -helisy, z których dwie formują strukturę w kształcie palca połączoną pętlą. W domenie J białka Hsc20 najbardziej istotny jest motyw H48P49D50 i R37K38R41K70, jak również uzyskane nowe dane sugerują istotną rolę dwóch kolejnych aminokwasów K132 oraz K172.

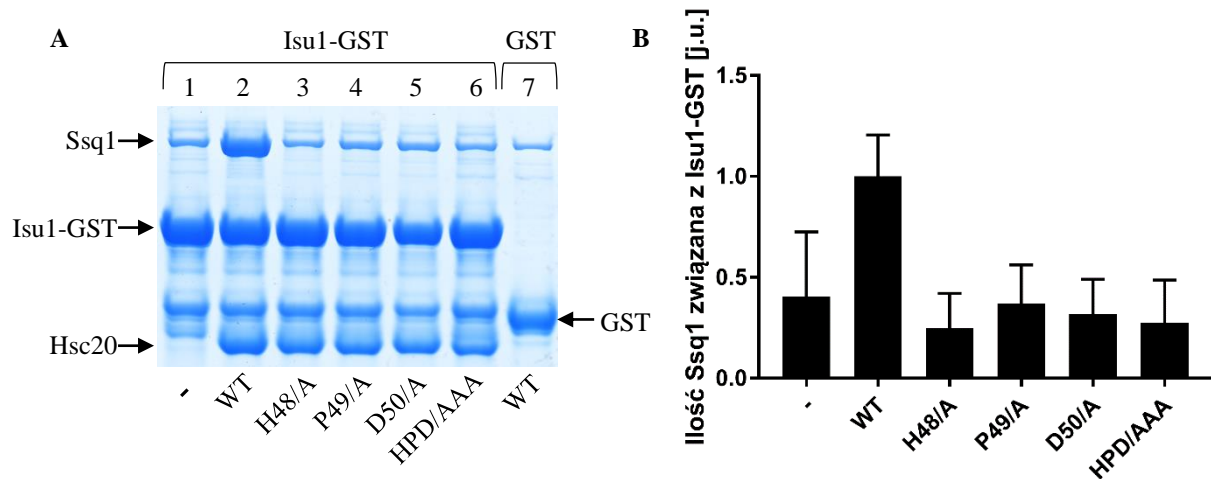
### 4.7.1 Reszty aminokwasowe motywu HPD białka Hsc20 pełnią kluczową rolę w oddziaływaniu z Ssq1

Pętla w domenie J zawiera silnie konserwowany motyw HPD (Dutkiewicz i wsp., 2017). Domena J oddziałuje z Hsp70 ze związanym ATP i stymuluje aktywność ATPazową tego białka. Dotychczasowa literatura wskazuje, że do interakcji domeny J z domeną NBD białka Hsp70 dochodzi w stanie otwartej konformacji Hsp70, gdy domena SBD Hsp70 oraz elastyczny łącznik są połączone z domeną NBD związana z ATP (Mayer 2013). Tak więc obecność białka zawierającego domenę J jest niezbędna, niemniej samo stymuluje aktywność ATPazową białka Hsp70 dość łagodnie. Dopiero interakcja z substratem w połączeniu ze związanym białkiem J wpływa na zmianę konformacyjną NBD. Cały obraz jest jeszcze bardziej skomplikowany, jeżeli przeprowadzimy analizę co się dzieje w przypadku oddziaływania białek Ssq1-Hsc20. Reszta R207 białka Ssq1 tworzy wewnątrzcząsteczkowe wiązanie z resztą D517 w SBD- $\beta$  i D429 znajdująca się w obrębie łącznika. Związanie domeny J wywołuje stan w którym SBD- $\beta$  oddysocjowuje od NBD, lecz łącznik pozostaje związany z NBD. Jest to stan niezbędny do wywołania aktywacji ATPazy, co zaś dalej wywołuje kolejne zmiany konformacji NBD niezbędne do związania substratu (Tomiczek i wsp., 2020). Zmiana konformacyjna NBD, zsynchronizowana z wiązaniem domeny J powoduje drastyczny wzrost poziomu hydrolizy ATP.

Gdy białko Hsc20 znajdzie się w kompleksie podwójnym - z Isu1 obserwowałem lekką destabilizację helisy H2, pętli z motywem HPD i helisy H3. Natomiast gdy Hsc20 jest w kompleksie potrójnym - z Isu1 i Ssq1, wówczas obserwowałem znaczne usztywnienie domeny J wraz ze znacznym zwiększeniem protekcji zarówno helisy H2, pętli z motywem HPD oraz helisy H3 (Ryc.44).

W związku z tym postanowiłem określić udział poszczególnych reszt aminokwasowych motywu HPD w tworzeniu potrójnego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Na

wstępnie oczyściłem preparaty zmutowanych wariantów białka Hsc20, które zawierały pojedyncze substytucje alaninowe oraz wariant z potrójną mutacją w obrębie motywu HPD. Z danych literaturowych wiedziałem, że wprowadzenie tych mutacji nie zaburza struktury poszczególnych wariantów (Delewski i wsp., 2016). W związku z tym na kolejnym etapie zbadałem zdolność tych wariantów do tworzenia kompleksu potrójnego z białkiem Ssq1<sup>T239/A</sup> i Isu1-GST z wykorzystaniem techniki precypitacji kompleksów białkowych (Ryc. 50).



**Ryc.50 Wpływ mutacji w motywie HPD na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST**

**A Analiza SDS-PAGE kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności wariantów białka Hsc20 zmutowanych w motywie HPD** Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdział techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5μM Isu1-GST, 2,5μM Hsc20 i 5μM Ssq1. Ścieżka nr 1 przedstawia ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> precypitowanego z białkiem Isu1-GST, kiedy Hsc20 było pominięte w mieszaninie reakcyjnej. Ścieżka nr 2 przedstawia wynik doświadczenia, kiedy mieszanina reakcyjna zawierała Hsc20 typu dzikiego, ścieżka nr 3 analogiczną reakcję z wariantem Hsc20 z mutacją H48/A, ścieżka nr 4 z mutacją P49/A, ścieżka nr 5 z mutacją D50/A, natomiast ścieżka nr 6 przedstawia kompleks uzyskany w obecności potrójnego mutantu Hsc20<sup>H48,P49,D50/AAA</sup>. Zaburzenie bezpośredniego oddziaływania między Ssq1, a wariantem Hsc20, ma wpływ na niski poziom wiązania się Ssq1<sup>T239/A</sup>. Ścieżka nr 7 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 WT do złoza z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczna analiza ilości Ssq1<sup>T239/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST** Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST zależnie od wariantu białka Hsc20 obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędu przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Otrzymane wyniki przeprowadzonej analizy pokazały, że wszystkie warianty alaninowe wykazywały znacznie obniżoną zdolność formowania kompleksu potrójnego, jednocześnie mutacje te nie zaburzały oddziaływania z substratem Isu1. Ilość Ssq1, która precypitowała wraz z Isu1-GST w obecności mutantów Hsc20 stanowiła od 22 do 37% ilości Ssq1, które obserwowałem w doświadczeniu kontrolnym, w którym było obecne dzikie białko Hsc20 WT. Wariant Hsc20<sup>H48/A</sup> wykazywał największy defekt, kiedy mieszanina reakcyjna zawierała ten wariant Hsc20, ilość Ssq1 stanowiła 22% ilości Ssq1 obserwowanym w doświadczeniu z Hsc20 WT. W przypadku pozostałych mutantów obserwowałem porównywalnie znaczny defekt i tak kiedy mutant Hsc20<sup>P49/A</sup> był obecny w mieszaninie ilość precypitowanego Ssq1 stanowiła 37% kontroli pozytywnej, kiedy Hsc20<sup>D50/A</sup> obserwowałem 31% Ssq1, a kiedy Hsc20<sup>H48,P49,D50/AAA</sup> 29%. We wszystkich przypadkach poziom ten był



zbliżony do poziomu kontroli negatywnej, czyli reakcji w której białko Hsc20 nie było obecne w mieszaninie reakcyjnej (obserwowałem wówczas 32% ilości Ssq1 w stosunku do reakcji, która zawierała Hsc20 WT). Podsumowując w oparciu o uzyskane wyniki mogę stwierdzić, że motyw HPD jest niezbędny żeby białko Hsc20 mogło skutecznie oddziaływać z Ssq1 i tym samym uczestniczyć w formowaniu kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1.

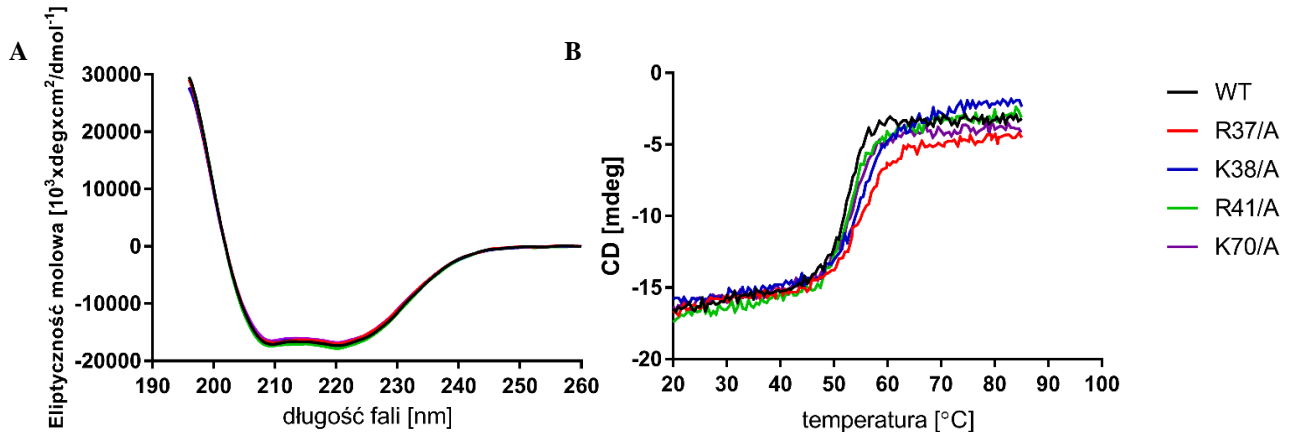
Otrzymane przeze mnie wyniki są w pełni zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. Doświadczenia, których celem było zbadanie stymulacji aktywności ATPazowej białka Ssq1 przez zmutowanie wersji białka Hsc20 w motywie HPD w obecności nadmiaru substratu pokazały, że wprowadzone mutacje prowadzą do defektu stymulacji aktywności mtHsp70, która wynika z niższego powinowactwa mutantów do białka Ssq1. Określono wartości  $K_m$  dla kolejnych mutantów w motywie HPD, które to odpowiednio wynoszą dla mutantu H48/A -  $1,4\mu M$ , P49/A -  $1,2\mu M$  i D50/A -  $1,1\mu M$  i są znacząco wyższe w odniesieniu do białka typu dzikiego dla którego wartość ta wynosi  $0,04\mu M$  (Delewski i wsp., 2016). Ponadto przeprowadzono doświadczenia *in vivo*, które również wykazały znaczenie motywu HPD dla prawidłowego wzrostu drożdży. W eksperymentach tych wykorzystano szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, który zawierał gen *hsc20* z mutacjami w motywie HPD jako jedyną kopię tego genu. Tak przygotowane szczepy z mutacjami w motywie HPD rosły wolniej w temperaturze  $30^\circ C$  w porównaniu do szczepu, w którym była obecna dzika wersja genu *HSC20* i nie były zdolne do wzrostu w podwyższonej temperaturze  $37^\circ C$ . Jednocześnie analiza poziomu białka Hsc20 wykazała, że dochodzi do nadprodukcji mutantów Hsc20 w porównaniu do białka typu dzikiego. Ten wynik jednoznacznie potwierdził, że motyw HPD jest kluczowy dla oddziaływania z mtHsp70 zarówno na poziomie *in vitro*, jak i *in vivo* (Delewski i wsp., 2016).

#### 4.7.2 Reszty R37, K38, R41 i K70 znajdujące się w obrębie helisy H2 i H3 domeny J białka Hsc20 są zaangażowane w oddziaływanie z Ssq1

Przeprowadzone doświadczenia HDX-MS wykazały różnice w protekcji domeny J zależnie od tego, czy Hsc20 znajduje się wyłącznie w kompleksie z Isu1, czy znajduje się w większym kompleksie jednocześnie z Ssq1 i Isu1 (Ryc. 44). W obrębie helisy H2 białka Hsc20 dochodzi do wymiany wodoru na deuter w większym stopniu, niż w przypadku helisy H3. Co więcej dochodzi do dynamicznej wymiany  $H \rightarrow D$  w obrębie reszt aminokwasowych R37 i R41. Zidentyfikowane reszty R37 i R41 na helisie H2 są homologiczne do reszt R22 i R26, które to są obecne w bakteryjnym białku DnaK. W przypadku białka bakteryjnego główną rolą tych reszt jest wiązanie domeny J białka DnaJ przez domenę NBD białka DnaK (Kityk i wsp., 2018).

Wyniki analizy HDX-MS wykazały protekcję domeny J, w tym wspomnianych wyżej reszt R37, i R41, a także reszt sąsiadujących K38 i K70, które były znane z wcześniejszej literatury (Delewski i wsp., 2016). W związku z tym postanowiłem oczyścić cztery warianty białka Hsc20, które zawierały pojedyncze substytucje alaninowe tych reszt. Struktura oraz stabilność poszczególnych mutantów została zbadana w doświadczeniach, w których analizowałem odpowiednio widma dichroizmu kołowego oraz topnienie oczyszczonych wariantów Hsc20 (Ryc. 51). Wyniki uzyskane w oparciu o analizę widm dichroizmu kołowego oraz z pomiarów topnienia zmutowanych wersji białek pokazały, że otrzymane

preparaty białkowe mają strukturę identyczną do struktury białka typu dzikiego oraz, że charakteryzują się podobną stabilnością. W związku z tym postanowiłem sprawdzić ich aktywność w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych (Ryc.52).

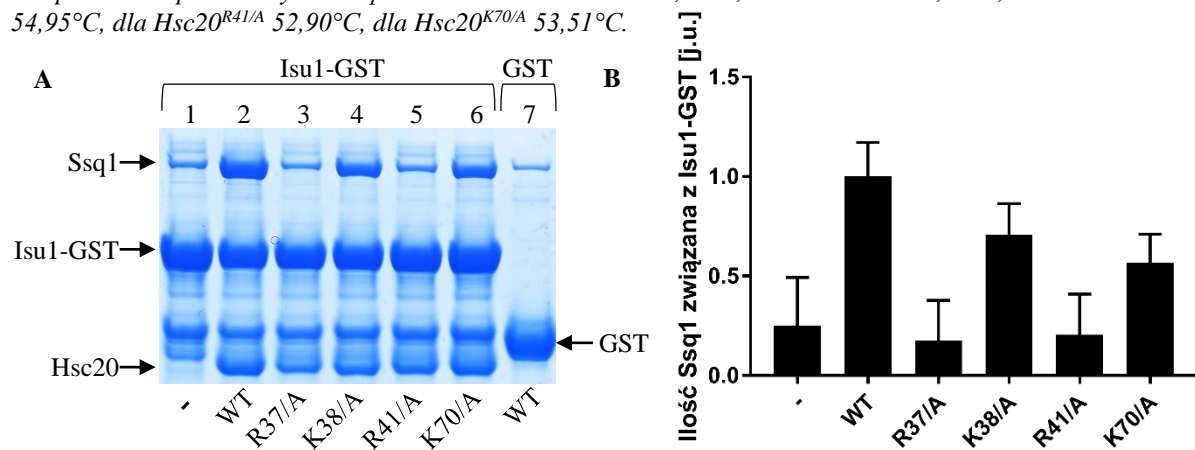


**Ryc.51 Analiza mutantów RKRK białka Hsc20 z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego**

Rycina A przedstawia widmo CD białka ScHsc20 typu dzikiego i widma wariantów zawierających mutacje w motywie RKRK wyrażone w jednostkach molowej eliptyczności. Stężenia białek we wszystkich doświadczeniach wynosiło  $5 \mu\text{M}$ .

Rycina B przedstawia przebiegi topnienia analizowanych wariantów Hsc20 przy długości fali 220nm.

Temperatura topnienia wynosi odpowiednio dla Hsc20 WT  $52,62^\circ\text{C}$ , dla Hsc20<sup>R37/A</sup>  $55,25^\circ\text{C}$ , dla Hsc20<sup>K38/A</sup>  $54,95^\circ\text{C}$ , dla Hsc20<sup>R41/A</sup>  $52,90^\circ\text{C}$ , dla Hsc20<sup>K70/A</sup>  $53,51^\circ\text{C}$ .



**Ryc.52 Wpływ mutacji w motywie RKRK na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST**

**A Analiza SDS-PAGE kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności różnych wariantów białka Hsc20**  
Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdzielanie techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających  $2,5 \mu\text{M}$  Isu1-GST,  $2,5 \mu\text{M}$  Hsc20 i  $5 \mu\text{M}$  Ssq1. Ścieżka nr 1 obrazuje ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> przy braku Hsc20. Ścieżka nr 2 przedstawia wynik doświadczenia, kiedy reakcja zawierała Hsc20 typu dzikiego, ścieżka nr 3 analogiczną reakcję z wariantem Hsc20 z mutacją R37/A, ścieżka nr 4 z mutacją K38/A, ścieżka nr 5 z mutacją R41/A, ścieżka nr 6 z mutacją K70/A. Zaburzenie bezpośredniego oddziaływania między Ssq1, a zmutowanym wariantem Hsc20, ma wpływ na niski poziom wiązania się Ssq1<sup>T239/A</sup> w szczególności w przypadkach analizowanych wariantów białka Hsc20 z mutacją R37/A oraz R41/A. Ścieżka nr 7 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 WT do złoża z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczna analiza ilości Ssq1<sup>T239/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST**  
Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST zależnie od wariantu białka Hsc20 obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

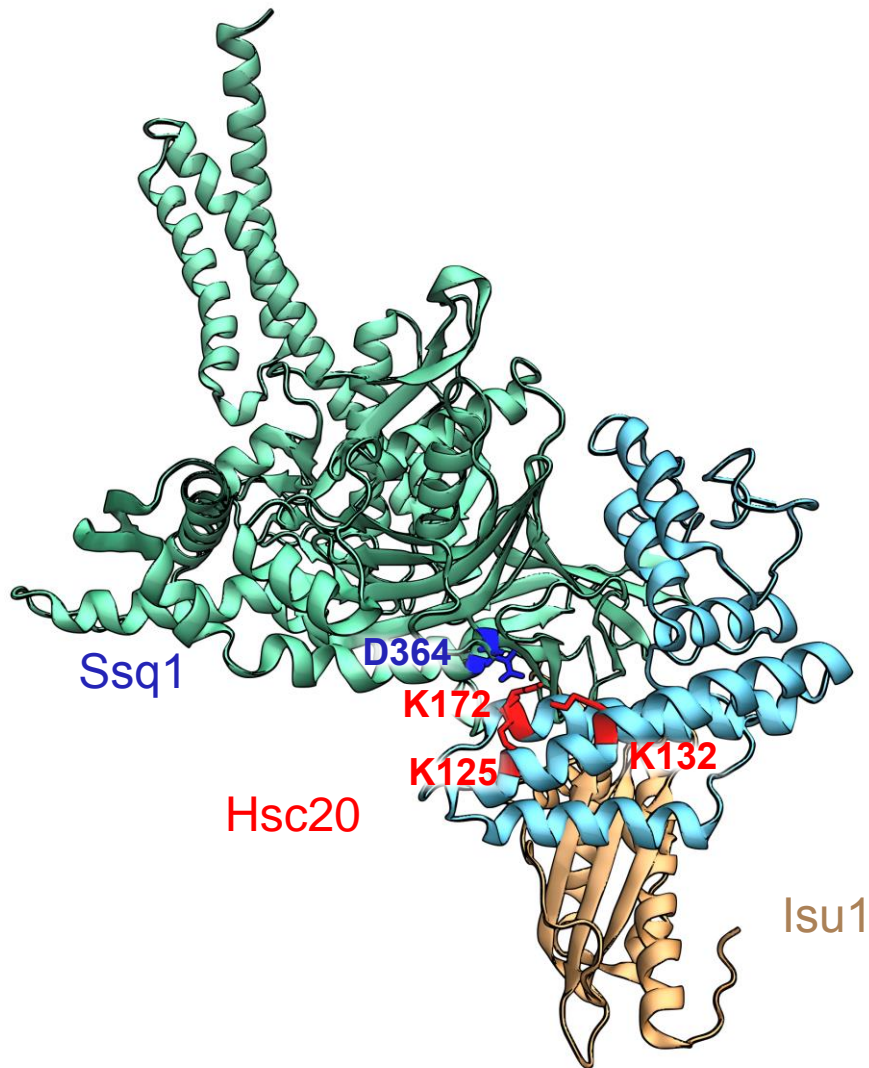


Wykorzystane warianty alaninowe białka Hsc20 charakteryzowały się defektem w stymulacji formowania się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Obserwowałem przede wszystkim spadek ilości białka Ssq1, które było precypitowane w ilości równej lub niższej jak w próbie kontrolnej, która nie zawierała białka Hsc20. Poziom Ssq1, które precypitowało wraz z Isu1-GST, kiedy mieszanina reakcyjna nie zawierała Hsc20, stanowił 25% ilości Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST, kiedy Hsc20 WT było obecne. Odpowiednio obecność mutantów Hsc20R37/A i Hsc20R41/A powodowała spadek ilości Ssq1 do 18% i 20% w stosunku do kontroli pozytywnej. Są to zbliżone spadki do tych wywoływanych przez substytucje alaninowe HPD. Z kolei następane analizowane mutacje K38/A oraz K70/A w obrębie Hsc20 powodowały spadek ilości Ssq1 w kompleksie potrójnym odpowiednio do poziomu 71% oraz 57% w stosunku do kontroli pozytywnej. W przypadku tych dwóch reszt wnioskuję, że również one odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu między Hsc20, a Ssq1, lecz ich udział jest mniejszy niż w przypadku dwóch wcześniej analizowanych reszt. Motyw RKRK jest zatem równie niezbędny, jak motyw HPD podczas oddziaływania białka Hsc20 z Ssq1.

Uzyskane przeze mnie dane są zgodne z dotychczasową literaturą. Wcześniejsze doniesienia literaturowe pozwoliły na identyfikację obszaru dodatnio naładowanego elektrostatycznie wokół domeny J i w obrębie fragmentu helisy H2 (Delewski i wsp., 2016). Wśród reszt helisy H2 wykazujących największy dodatni potencjał elektrostatyczny zidentyfikowano następujące reszty aminokwasowe K20, R35, R37, K38, R41. W związku z tym postawiono hipotezę, że ten obszar może być istotny w oddziaływaniu z Ssq1. Aby sprawdzić jaki wpływ będzie miało zmutowanie tych reszt w obrębie Hsc20, skonstruowano i oczyszczono mutanty, w których podmieniono dodatnio naładowane reszty aminokwasowe. W doświadczeniu, w którym analizowano stymulację aktywności ATPazy Ssq1 w obecności nadmiaru substratu Isu1 mutant Hsc20<sup>K20,R35,K38,R41/AASL</sup> charakteryzował się znacznie obniżonym powinowactwem do białka Ssq1 w stosunku do kontroli pozytywnej, w której wykorzystano dziką formę białka Hsc20 WT. Wyznaczona wartość  $K_m$  dla białka Hsc20<sup>K20,R35,K38,R41/AASL</sup> wynosiła 0,4 $\mu$ M, natomiast dla białka typu dzikiego była 10 razy mniejsza i wynosiła 0,04 $\mu$ M. W tym samym doświadczeniu mutant w motywie HPD - Hsc20<sup>H48/A</sup> charakteryzował się wartością  $K_m=2,6\mu$ M. Warto jednocześnie zaznaczyć, że mutant zawierający pięć substytucji, odpowiednio wcześniej wskazane reszty w obrębie helisy H2 i jednocześnie mutację H48/A, był całkowicie niezdolny do stymulacji aktywności ATPazowej białka Ssq1. Te doświadczenia potwierdzają znaczenie zidentyfikowanego regionu helisy H2 białka Hsc20 w interakcji z Ssq1.

### 4.7.3 Reszty K132, K172 domeny C-terminalnej Hsc20 są zaangażowane w tworzenie kompleksu z Ssq1

Wyniki HDX wykazały, że wewnątrz domeny C-terminalnej białka Hsc20 obecne są reszty aminokwasowe, które potencjalnie mogą mieć wpływ na oddziaływanie z domeną NBD białka Ssq1 (Ryc.53).

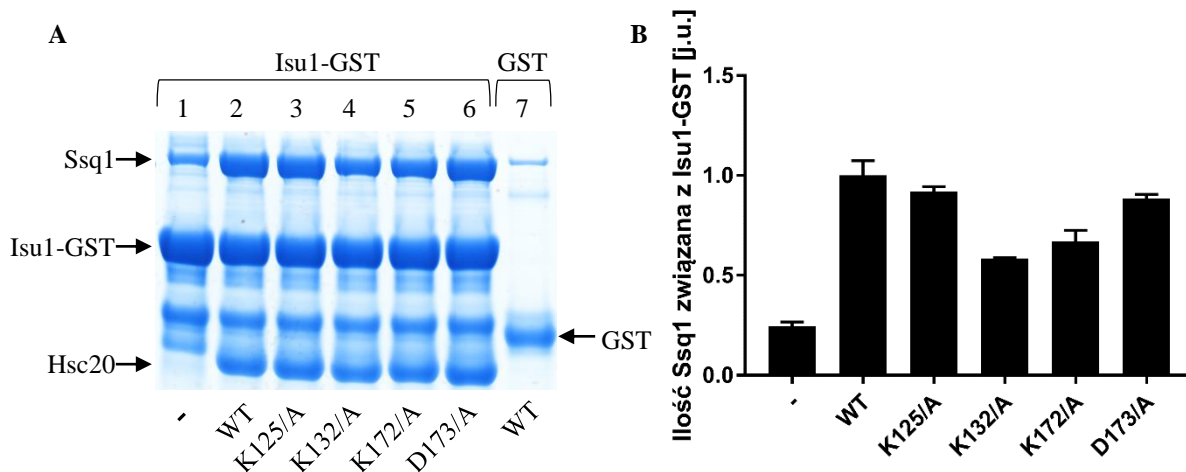


**Ryc.53 Model kompleksu białek Ssq1:Hsc20:Isu1 z zaznaczonymi resztami domeny C-terminalnej białka Hsc20 i domeny NBD białka Ssq1**

Model strukturalny kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 z zaznaczonymi na czerwono resztami aminokwasowymi białka Hsc20 zlokalizowanymi w domenie C-terminalnej tego białka, które potencjalnie mogą być odpowiedzialne za oddziaływanie z domeną NBD białka Ssq1. Na niebiesko zaznaczona jest reszta D364 w obrębie białka Ssq1, która może potencjalnie być zaangażowana w oddziaływanie z resztami K125, K132 oraz K172 w obrębie domeny C-końcowej białka Hsc20.

Grafika została przygotowana przez mgr Igora Grochowinę z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed.

Zaobserwowano regiony podlegające protekcji, lecz rozdzielczość wyników HDX-MS jest zbyt niska by wskazać konkretne reszty aminokwasowe. Niemniej analiza dostępnej literatury dotyczącej badań białka DnaK zasugerowała, że wytypowane reszty aminokwasowe mogą być zaangażowane w oddziaływanie z D362 w domenie NBD białka Ssq1 (Kityk i wsp., 2012). Bazując na modelu strukturalnym postanowiłem biochemicznie scharakteryzować reszty K125, K132, K172 i D173. W tym celu oczyściłem warianty Hsc20 zawierające pojedyncze substytucje alaninowe wskazanych reszt aminokwasowych.

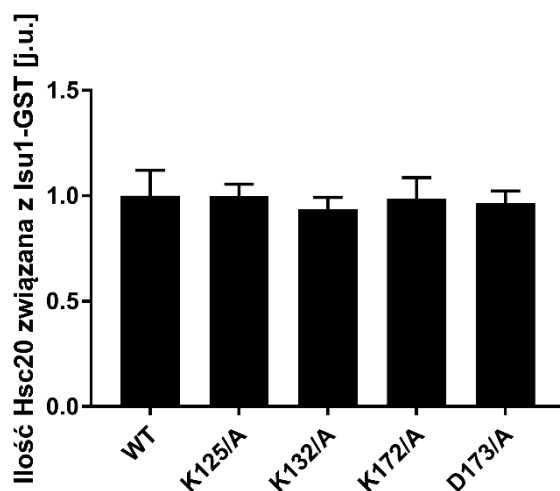


### Ryc.54 Wpływ mutacji w motywie KK na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST

**A Analiza SDS-PAGE kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności różnych wariantów białka Hsc20**  
 Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdzielanie techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5μM Isu1-GST, 2,5μM Hsc20 i 5μM Ssq1. Ścieżka nr 1 przedstawia ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> precypitowanego z Isu1-GST, kiedy w mieszaninie reakcyjnej nie było białka Hsc20. Ścieżka nr 2 przedstawia reakcję w obecności Hsc20 typu dzikiego, ścieżka nr 3 analogiczną reakcję z wariantem Hsc20 z mutacją K125/A, ścieżka nr 4 z mutacją K132/A, ścieżka nr 5 z mutacją K172/A, ścieżka nr 6 z mutacją D173/A. Zaburzenie bezpośredniego oddziaływania między Ssq1, a wariantem Hsc20, ma wpływ na niski poziom wiązania się Ssq1<sup>T239/A</sup> w szczególności w przypadkach wariantów białka Hsc20 z mutacją K132/A oraz K172/A. Ścieżka nr 7 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 WT do złoża z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczna analiza ilości Ssq1<sup>T239/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST** Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST zależnie od wariantu białka Hsc20 obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

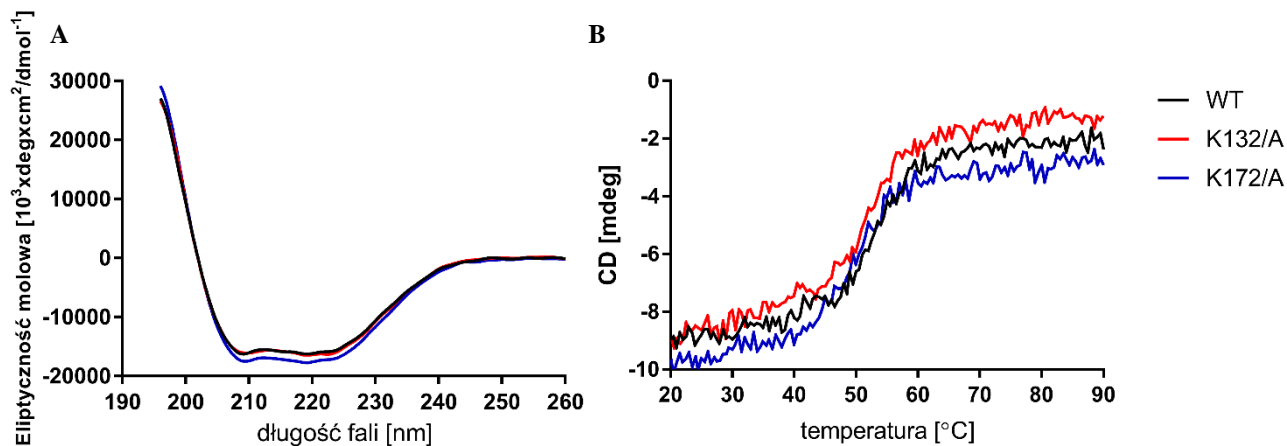
Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych w kontroli niezawierającej białka Hsc20 ilość białka Ssq1, która precypitowała wraz z Isu1-GST stanowiła 24% ilości białka Ssq1, które precypitowało wraz z Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. W obecności mutantu Hsc20<sup>K125/A</sup> ilość precypitowanego Ssq1 stanowiła 92% kontroli pozytywnej, w obecności Hsc20<sup>K132/A</sup> 58%, Hsc20<sup>K172/A</sup> 67%, a w obecności Hsc20<sup>D173/A</sup> 85% (Ryc.54). Wpływ mutacji K125/A i D173/A okazał się być znikomy. Jednakże spadek ilości Ssq1 w obecności wariantów Hsc20 z mutacjami K132/A i K172/A stanowił ważną wskazówkę na temat potencjalnej roli jaką mogą mieć te reszty na oddziaływanie z Ssq1. Jednocześnie zweryfikowałem, czy dochodzi do defektu w oddziaływaniu z substratem Isu1, ta analiza wykazała, że wszystkie analizowane mutanty Hsc20 równie skutecznie precypitują z białkiem Isu1-GST, jak białko Hsc20 typu dzikiego (Ryc.55).



**Ryc.55** Wpływ mutacji w motywie KK na oddziaływanie między Hsc20, a Isu1-GST

*Densytometryczna analiza ilości Hsc20 w kompleksie z Isu1-GST* Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Hsc20, które precypitowało z Isu1-GST w obecności białka Ssq1<sup>T239/A</sup> w mieszaninie reakcyjnej w doświadczeniu przedstawionym na Ryc.55A. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Hsc20 związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Wiedząc, że mutacje K132/A i K172/A w obrębie Hsc20 mają istotny wpływ na formowanie kompleksu, przeprowadziłem pomiar widm dichroizmu kołowego zmutowanych wersji Hsc20<sup>K132/A</sup> oraz Hsc20<sup>K172/A</sup>, jak również zbadałem jakie są krzywe topnienia w obu przypadkach (Ryc.56).



**Ryc.56** Analiza struktury i stabilności wariantów białka Hsc20 z mutacjami K132/A i K172/A

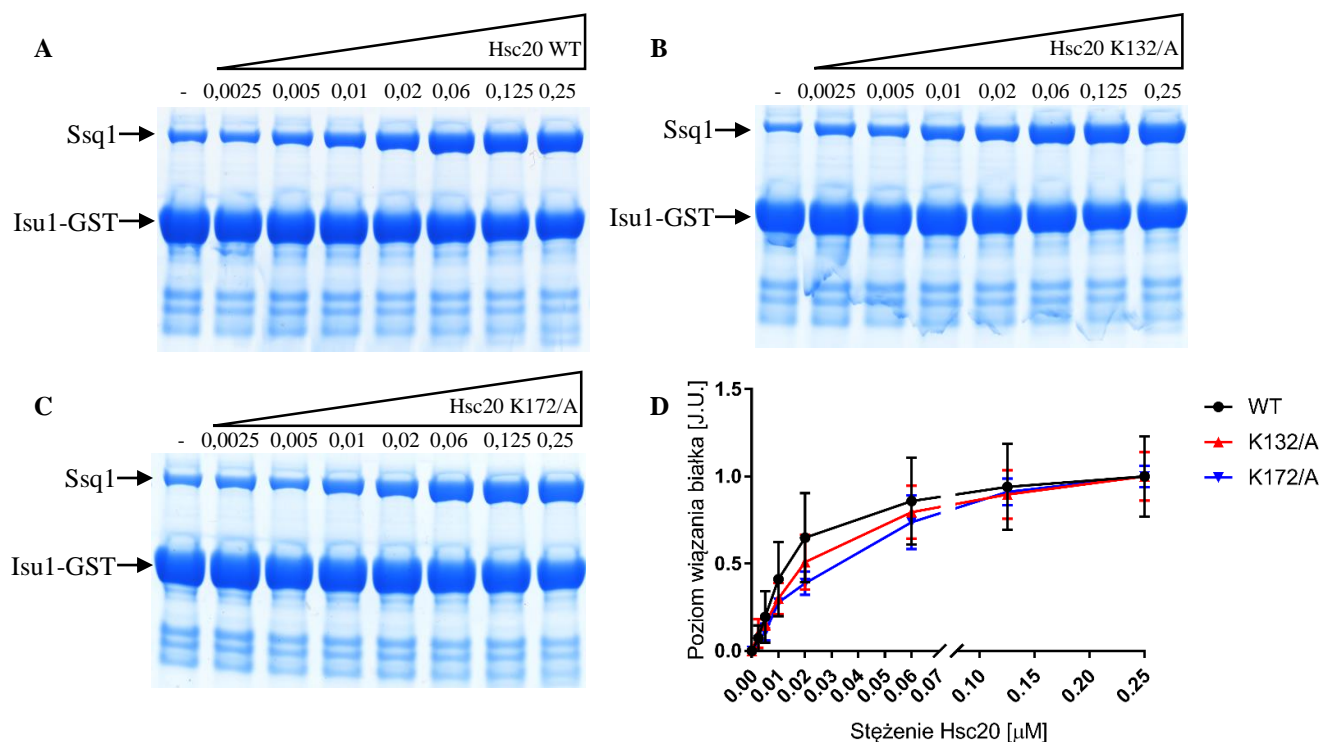
Rycina 56A przedstawia widmo CD białka ScHsc20 typu dzikiego i widma wariantów zawierających mutacje K132/A oraz K172/A wyrażone w jednostkach molowej eliptyczności. Stężenia białek we wszystkich doświadczeniach wynosiło  $3 \mu\text{M}$ .

Panel B przedstawia przebiegi topnienia analizowanych wariantów Hsc20 przy długości fali 220nm. Dla Hsc20 WT temperatura topnienia wynosi  $53,54^\circ\text{C}$ , w przypadku pozostałych mutantów temperatura topnienia wynosi odpowiednio dla Hsc20<sup>K132/A</sup>  $52,71^\circ\text{C}$ , dla Hsc20<sup>K172/A</sup>  $50,20^\circ\text{C}$ .

Zarówno mutacja K132/A, jak i K172/A nie wpływa na strukturę drugorzędową białka (Ryc.56A). Widma obu wariantów są zbliżone do widma białka Hsc20 typu dzikiego. Uzyskane widma zawierają charakterystyczny szczyt przy długości fali 220nm, który jest

typowy dla białek, w przypadku których  $\alpha$ -helisa stanowi dominującą strukturę. Podobnie otrzymane krzywe topnienia dla obu mutantów białka Hsc20 mają przebieg bardzo podobny do przebiegu topnienia dzikiej kontroli (Ryc.56B). W następnej kolejności postanowiłem zbadać jakie jest powinowactwo zmutowanych wersji białka Hsc20 do Ssq1. W związku z tym przeprowadziłem miareczkowania poszczególnych wariantów białka Hsc20 w zakresie od 2,5nM do 250nM w obecności stałego stężenia Ssq1 (5uM) i Isu1-GST (2,5uM), a następnie przeprowadziłem precypitację kompleksów białkowych w oparciu o białko fuzyjne Isu1-GST, wykorzystując złożę agarozowe z przyłączonym glutationem. W związku z tym, że w tym eksperymencie użyłem Ssq1 WT zamiast Ssq1<sup>T239/A</sup>, podczas cyklu ATPazowego po związaniu Isu1 przez Ssq1, białko Hsc20 ulega dysocjacji. Tak więc w przypadku tych doświadczeń białko Hsc20 jest nieobecne na analizowanych żelach poliakrylamidowych. Analiza densytometryczna sygnału dla precypitowanego białka Ssq1 pozwoliła mi przygotować wykres obrazujący przebieg wiązania Ssq1 w funkcji stężenia analizowanego białka Hsc20. Tak uzyskane dane dopasowałem do równania Michaelis-Menten, co z kolei pozwoliło mi wyznaczyć wartości  $K_m$  dla poszczególnych wariantów białka Hsc20 (Ryc.57).

Dla trzech uśrednionych analiz wartości  $K_m$  wyniosły odpowiednio 1,676 $\mu$ M dla białka Hsc20 typu dzikiego, 2,487 $\mu$ M dla mutantu K132/A oraz 3,674 $\mu$ M dla mutantu K172/A. Tak więc uzyskane wartości  $K_m$  jednoznacznie świadczą o mniejszym powinowactwie obu zmutowanych wersji Hsc20 do Ssq1, co przekłada się na mniejszą efektywność z jaką formuje się kompleks Ssq1:Isu1-GST.



**Ryc.57** Badanie efektywności tworzenia kompleksu Ssq1 WT:Isu1-GST w funkcji stężenia różnych wariantów białka Hsc20

**A Analiza efektywności tworzenia kompleksu Ssq1 WT:Isu1-GST w funkcji stężenia białka Hsc20 typu dzikiego** Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdziel techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5 μM Isu1-GST, 5 μM Ssq1 w obecności zmiennej stężenia białka Hsc20 typu dzikiego. Ścieżka 1 przedstawia wynik doświadczenia kontrolnego, w którym mieszanina reakcyjna nie zawierała Hsc20. Kolejne ścieżki przedstawiają kompleksy białkowe, które zostały uzyskane w obecności białka Hsc20 wraz ze wzrostem jego stężenia zgodnie z opisem figury.

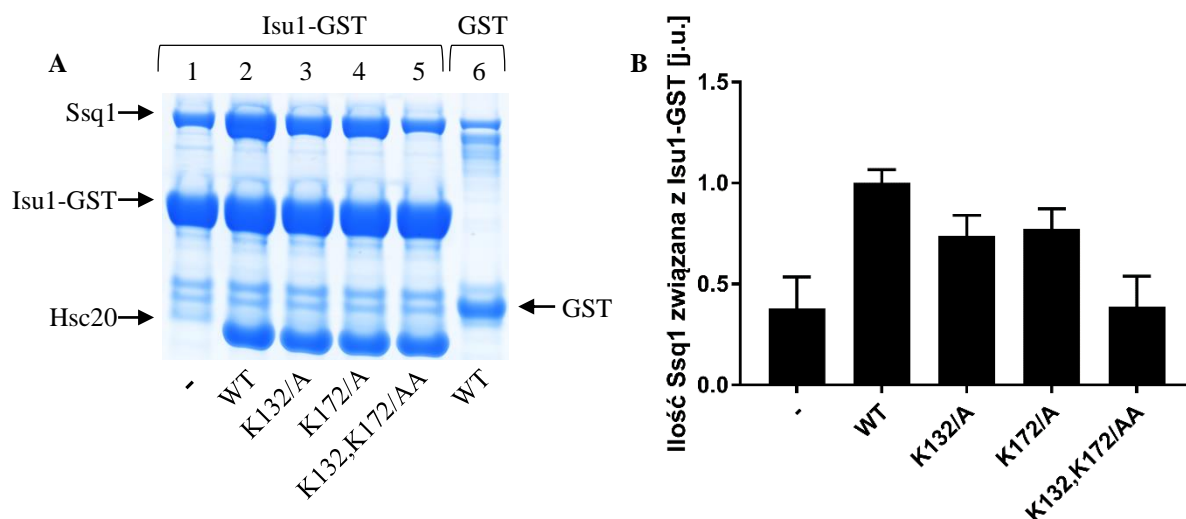
**B Analiza efektywności tworzenia kompleksu Ssq1 WT:Isu1-GST w funkcji stężenia białka Hsc20 z mutacją K132/A** Rozdział techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz białek mieszaniny reakcyjnej zawierającej 5 μM Ssq1 i zmienne stężenie białka Hsc20 z mutacją K132/A.

**C Analiza efektywności tworzenia kompleksu Ssq1 WT:Isu1-GST w funkcji stężenia białka Hsc20 z mutacją K172/A** Rozdział techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz białek mieszaniny reakcyjnej zawierającej 5 μM Ssq1 i zmienne stężenie białka Hsc20 z mutacją K172/A.

**D Densytometryczne przedstawienie poziomu Ssq1 WT które precypitowało wraz z Isu1-GST w funkcji stężenia Hsc20 obecnego w mieszaninie reakcyjnej** Poziom białka Ssq1 WT w kompleksie z Isu1-GST przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.]. Czarna linia przedstawia ilość Ssq1 w kompleksie z Isu1-GST w obecności Hsc20 WT, czerwona linia – w obecności Hsc20<sup>K132/A</sup>, niebieska linia – w obecności Hsc20<sup>K172/A</sup>.

Na kolejnym etapie postanowiłem sprawdzić, czy podwójna mutacja K132,K172/AA w obrębie Hsc20 spowoduje znacznie silniejszy defekt w oddziaływaniu z Ssq1 i tym samym w formowaniu potrójnego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Tak więc na wstępie oczyściłem podwójnego mutantu Hsc20<sup>K132,K172/AA</sup>. Po oczyszczeniu przeprowadziłem doświadczenia precypitacji kompleksów białkowych w którym porównywałem ilość precypitowanego Ssq1 w odniesieniu do reakcji, w których były obecne warianty Hsc20 z pojedynczymi mutacjami (Ryc. 58).





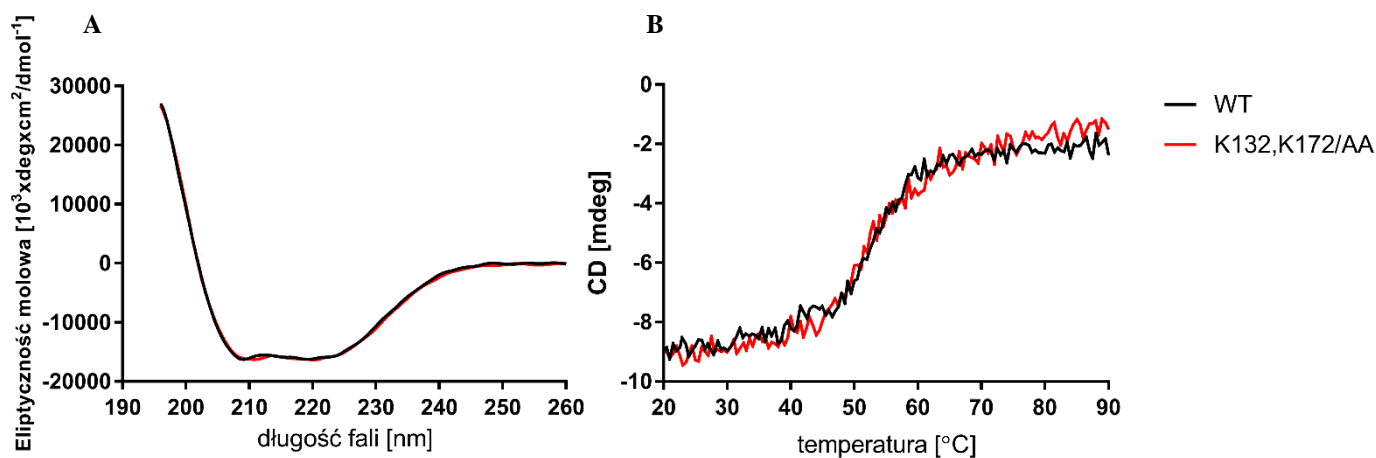
**Ryc.58** Wpływ podwójnej mutacji K132,K172/AA w obrębie Hsc20 na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST

**A** Analiza SDS-PAGE formowanego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST w obecności wariantów białka Hsc20 ze zmutowanymi resztami K132 i K172 Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdzielanie technika SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5µM Isu1-GST, 2,5µM Hsc20 i 5µM Ssq1. Ścieżka nr 1 przedstawia ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> precypitowanego wraz z Isu1-GST, kiedy mieszanina reakcyjna nie zawierała białka Hsc20. Ścieżka nr 2 przedstawia kompleks otrzymany w obecności Hsc20 typu dzikiego, ścieżka nr 3 wynik analogicznej reakcji z wariantem Hsc20 z mutacją K132/A, ścieżka nr 4 z mutacją K172/A. Ścieżka nr 5 zaś przedstawia kompleks uzyskany w wyniku inkubacji reakcji zawierającej podwójnego mutantu Hsc20<sup>K132,K172/AA</sup>. Największy defekt w formowaniu kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1-GST zaobserwowałem w przypadku podwójnego mutantu. Ścieżka nr 6 pokazuje poziom niespecyficznego wiązania się białka Ssq1 oraz Hsc20 WT do złoza z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B** Densytometryczna analiza ilości Ssq1<sup>T239/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST zależnie od wariantu białka Hsc20 obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1<sup>T239/A</sup> związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Hsc20 WT. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

W tej serii doświadczeń w przypadku reakcji kontrolnej bez Hsc20 ilość Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST stanowiło 38% ilość Ssq1 precypitowanego w pozytywnej reakcji kontrolnej, która zawierała dzikie białko Hsc20 WT. Natomiast, kiedy mieszanina reakcyjna zawierała białko Hsc20 z pojedynczymi mutacjami - Hsc20<sup>K132/A</sup> i Hsc20<sup>K172/A</sup> uzyskałem podobne ilości Ssq1 w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1 jak w poprzednim doświadczeniu czyli odpowiednio 73% i 77% w odniesieniu do kontroli pozytywnej. Z kolei w przypadku gdy w mieszaninie reakcyjnej był obecny podwójny mutant Hsc20<sup>K132,K172/AA</sup> ilość Ssq1 stanowiła zaledwie 39% ilości Ssq1, którą obserwowałem w doświadczeniu z dziką formą Hsc20 WT. Jest to wynik porównywalny z ilością Ssq1, które precypituje z Isu1-GST, kiedy w mieszaninie reakcyjnej nie ma białka Hsc20 WT. Jednocześnie wszystkie z analizowanych zmutowanych wariantów białek Hsc20 nie wykazywały defektu w oddziaływaniu z substratem. Otrzymany wynik sugeruje, że obecność dwóch mutacji w wariacie Hsc20<sup>K132,K172/AA</sup> wywołuje znaczne zaburzenie oddziaływania z Ssq1 i obserwowany efekt jest zbliżony w skutkach do wcześniej opisywanych mutacji w motywie HPD.

Równoległe przeprowadziłem doświadczenia, których celem było zbadanie, czy podwójna mutacja nie prowadzi do zaburzenia struktury białka Hsc20 lub jego stabilności, przeprowadzając pomiary z wykorzystaniem spektrometru dichroizmu kołowego (Ryc.59).



**Ryc.59 Analiza struktury i stabilności białka Hsc20 z podwójną mutacją K132,K172/AA**

Rycina 59A przedstawia widmo CD białka ScHsc20 typu dzikiego i widmo podwójnego mutantu K132,K172/AA wyrażone w jednostkach molowej eliptyczności. Stężenia białek we wszystkich doświadczeniach wynosiło  $3\mu\text{M}$ .

Rycina 59B przedstawia przebieg topnienia obu wariantów białka ScHsc20 przy długości fali 220nm. Dla Hsc20 WT temperatura topnienia wynosi  $53,54^{\circ}\text{C}$ , w przypadku podwójnego mutantu temperatura topnienia wynosi  $51,18^{\circ}\text{C}$ .

Przeprowadzona analiza wykazała, że również podwójna mutacja nie prowadzi do zmian w obrębie struktury białka Hsc20, czy do jego obniżonej stabilności.

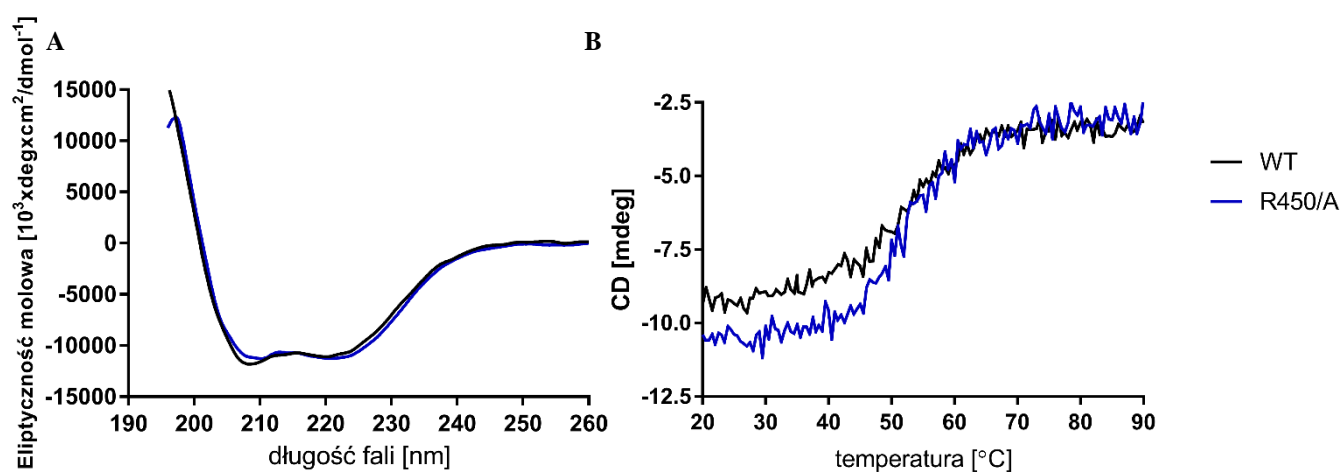
#### 4.8 Reszta aminokwasowa R450 w obrębie białka Ssq1 oddziałuje z resztą D362 białka Ssq1 i jest kluczowa dla formowania się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1

Analiza doświadczeń HDX-MS pozwoliła zidentyfikować różnice w protekcji reszt aminokwasowych K132 i K172 w sytuacji gdy Hsc20 znajduje się w kompleksie z Isu1 oraz Ssq1 i Isu1 (Ryc.53). W przypadku białka Ssq1 przedstawionego na Ryc.42 również można wyróżnić rejony podlegające ochronie. Niemniej brak pomiarów HDX-MS dla kompleksu Ssq1:Isu1 niezawierającego Hsc20 uniemożliwia jednoznacznie określić wpływ obecności Hsc20 na poziom protekcji w obrębie Ssq1 niezależnie od wpływu Isu1. Do tego konformacja kompleksu Ssq1:Isu1 związanego z ADP jest bardzo odmienna od konformacji Ssq1:Hsc20:Isu1 związanego z ATP, więc można się spodziewać, że mapa deuteracji byłaby znacząco inna, utrudniając bezpośrednie porównanie. Jednym z głównych problemów jaki napotkaliśmy podczas realizowanego projektu było uzyskanie preparatu Ssq1:Isu1, który można byłoby wykorzystać do analizy HDX-MS. Ewentualnym rozwiązaniem problemu mogłoby być skonstruowanie mutantu Ssq1 trwale związanego z ADP i stale będącego w konformacji właściwej dla stanu związanego z ADP, lecz na chwilę obecną taki mutant nie został jeszcze opracowany. Tak więc obecnie dostępne dane z doświadczeń HDX-MS nie pozwalają nam wskazać regionów Ssq1 specyficznie zaangażowanych w wiązanie domeny C-terminalnej Hsc20. Jednakże analiza modelu strukturalnego kompleksu wykazała, że reszta K172 białka Hsc20, znajduje się blisko reszt D362 i R450 białka Ssq1. Jednocześnie



wcześniejsze analizy wykazały, że reszty D362 i R450 są zaangażowane w oddziaływanie wewnątrz Ssq1. Niemniej bliskość reszty K172 białka Hsc20 oraz reszty D362 białka Ssq1 sugeruje możliwość oddziaływania tych reszt i tym samym fakt, że reszta D362 zmienia partnerów oddziaływania. Aby zweryfikować postawioną hipotezę oczyściłem mutanta Ssq1 zawierającego substytucję alaninową reszty R450. Na wstępie zbadałem czy wprowadzona mutacja nie zaburza struktury oraz stabilności białka Ssq1. W tym celu wykonałem pomiar widma dichroizmu kołowego oraz wyznaczyłem temperaturę topnienia zmutowanego białka (Ryc.60).

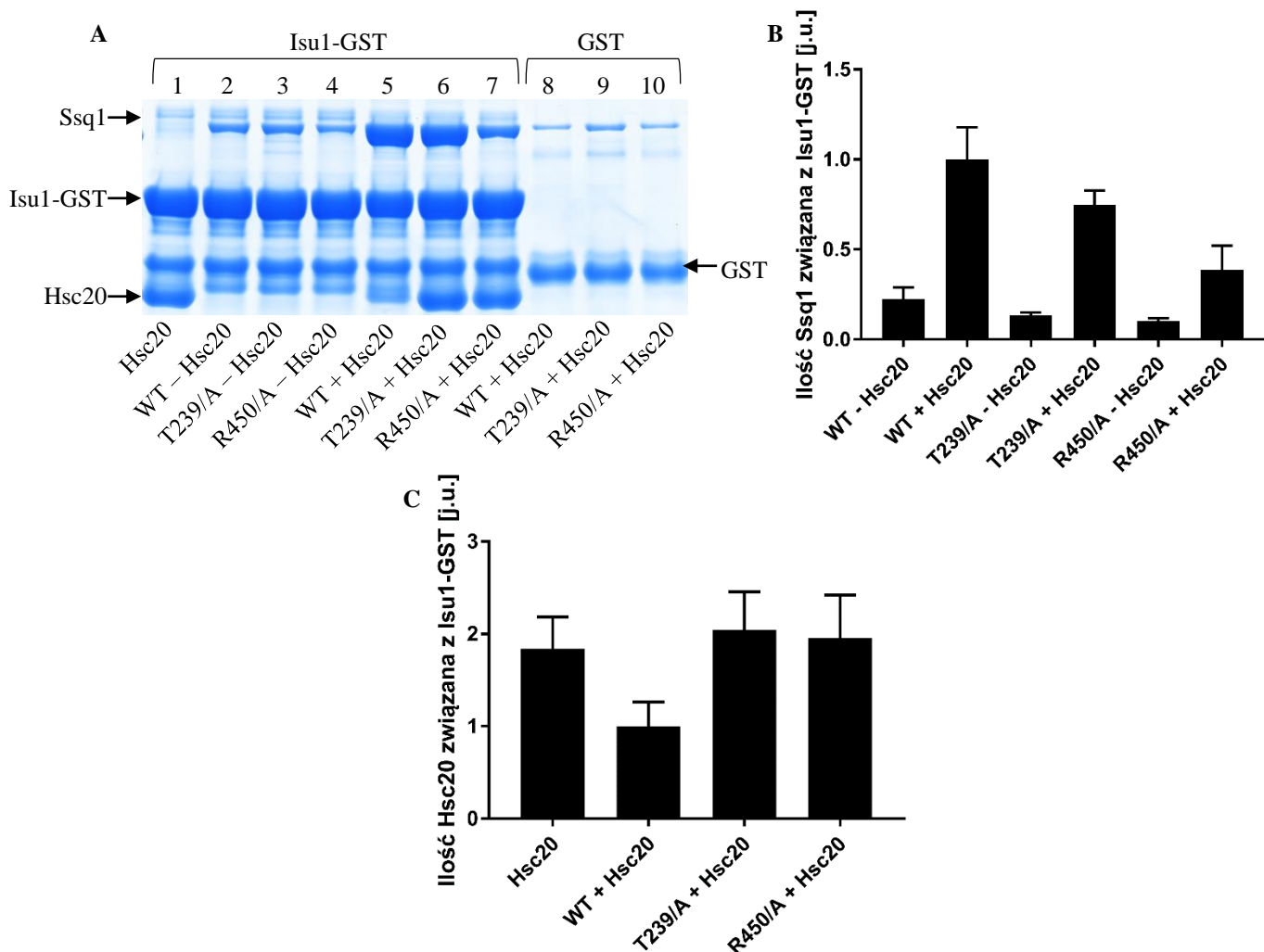
Wyniki uzyskane z analizy widm dichroizmu kołowego oraz z pomiarów topnienia zmutowanego białka Ssq1<sup>R450/A</sup> pokazały, że otrzymany preparat białkowy mutantu ma strukturę jak jego dziki odpowiednik i charakteryzuje się podobną stabilnością. W związku z tym postanowiłem sprawdzić jego aktywność w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych (Ryc. 61).



**Ryc.60 Analiza struktury i stabilności białka Ssq1<sup>R450/A</sup> z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego**

Rycina 60A przedstawia widmo CD białka ScSsq1 typu dzikiego i jego zmutowanej wersji z mutacją R450/A wyrażone w jednostkach molowej eliptyczności. Stężenie białek we wszystkich doświadczeniach wynosiło 1,5μM.

Panel B przedstawia przebiegi topnienia obu wariantów Ssq1 przy długości fali 220nm. Dla Ssq1 WT wyznaczona temperatura topnienia wynosi 53,62°C, natomiast w przypadku mutantu Ssq1<sup>R450/A</sup> temperatura topnienia wynosi 51,92°C.



### Ryc.61 Wpływ mutacji R450/A na formowanie się kompleksu Ssq1:Isu1-GST

**A Analiza SDS-PAGE kompleksów Ssq1:Isu1-GST oraz Ssq1:Hsc20:Isu1-GST formowanych w obecności Ssq1 WT, Ssq1<sup>T239/A</sup>, Ssq1<sup>R450/A</sup> w obecności dzikiej formy Hsc20** Zdjęcie żelu poliakrylamidowego (12%) przedstawia rozdział techniką SDS-PAGE precypitowanego białka Isu1-GST oraz pozostałych białek z nim związanych. Uzyskane kompleksy były formowane w wyniku inkubacji mieszanin zawierających 2,5μM Isu1-GST, 2,5μM Hsc20 i 5μM Ssq1. Ścieżka nr 1 przedstawia ilość białka Hsc20 precypitowanego z Isu1-GST, kiedy mieszanina reakcyjna nie zawierała Ssq1. Ścieżki nr 2 przedstawia kompleks białkowy uzyskany w wyniku inkubacji reakcji zawierającej Ssq1 typu dzikiego, ale z pominięciem Hsc20, ścieżka nr 3 to rozdział precypitowanych białek z Isu1-GST w analogicznej reakcji jak 2 z wariantem Ssq1 z mutacją T239/A, ścieżka nr 4 z mutacją R450/A. Ścieżka nr 5 pokazuje jaki kompleks białkowy formowany jest w wyniku inkubacji mieszaniny reakcyjnej zawierającej zarówno Hsc20 i Ssq1 typu dzikiego, ścieżka nr 6 analogiczną reakcję z wariantem Ssq1<sup>T239/A</sup>, ścieżka nr 7 reakcją z wariantem Ssq1<sup>R450/A</sup>. Ścieżki nr 8, 9 i 10 pokazują poziom niespecyficznego wiązania się wariantów Ssq1 oraz Hsc20 do złoża z immobilizowanym znacznikiem GST.

**B Densytometryczna analiza ilości Ssq1 WT, Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz Ssq1<sup>R450/A</sup> w kompleksie z Isu1-GST** Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Ssq1, które precypitowało z Isu1-GST. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1 WT związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Hsc20 WT.

**C Densytometryczna analiza ilości Hsc20 w kompleksie z Isu1-GST** Wykres słupkowy przedstawiający analizę ilości białka Hsc20, które precypitowało z Isu1-GST. Wykres przedstawiono w jednostkach umownych [j.u.], gdzie jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Hsc20 WT związanego w kompleksie z dziką formą Isu1-GST w obecności Ssq1 WT.

W przypadku eksperymentu, w którym wykorzystywałem Ssq1 WT obserwowałem precypitację głównie kompleksu obejmującego Isu1-GST i Ssq1, przy bardzo niskim poziomie Hsc20. Natomiast w przypadku wariantu Ssq1<sup>T239/A</sup> ze względu na defekt w hydrolizie ATP, podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach, mogłem zaobserwować stabilny kompleks potrójny. W tym przypadku ilość Ssq1<sup>T239/A</sup> związanego z Isu1-GST stanowi 75% poziomu Ssq1 WT związanego z Isu1-GST. W następnej kolejności sprawdziłem zachowanie mutantu Ssq1<sup>R450/A</sup> i porównałem z profilem uzyskanym dla białka Ssq1 WT i Ssq1<sup>T239/A</sup>. Uzyskany wynik pokazał, że oddziaływanie Ssq1<sup>R450/A</sup> z Isu1-GST jest znacznie obniżone względem pozostałych analizowanych wariantów Ssq1. Poziom Ssq1<sup>R450/A</sup> związanego z Isu1-GST stanowił 39% poziomu Ssq1 WT związanego z Isu1-GST. W przypadku reakcji z dzikim białkiem Ssq1 ze względu na zmianę jego konformacji po hydrolizie ATP, Hsc20 ulega dysocjacji. Jeżeli przyjąć obserwowaną ilość Hsc20 precypitującą z Isu1-GST jako 100%, to ilość Hsc20, która precypituje z Isu1-GST w obecności białka Ssq1<sup>T239/A</sup> wynosi 157%, natomiast ilość Hsc20 precypitująca z Isu1-GST w obecności Ssq1<sup>R450/A</sup> wynosi 144%. Tak więc poziom Hsc20 jest zbliżony w przypadku reakcji w których były wykorzystane mutanty Ssq1. Niemniej w przypadku mutantu Ssq1<sup>R450/A</sup> efekty tej mutacji mają ewidentny wpływ na niski poziom białka Ssq1 w kompleksie, ale zrozumienie roli reszty R450 białka Ssq1 podczas formowania kompleksu wymaga jeszcze dodatkowych analiz.

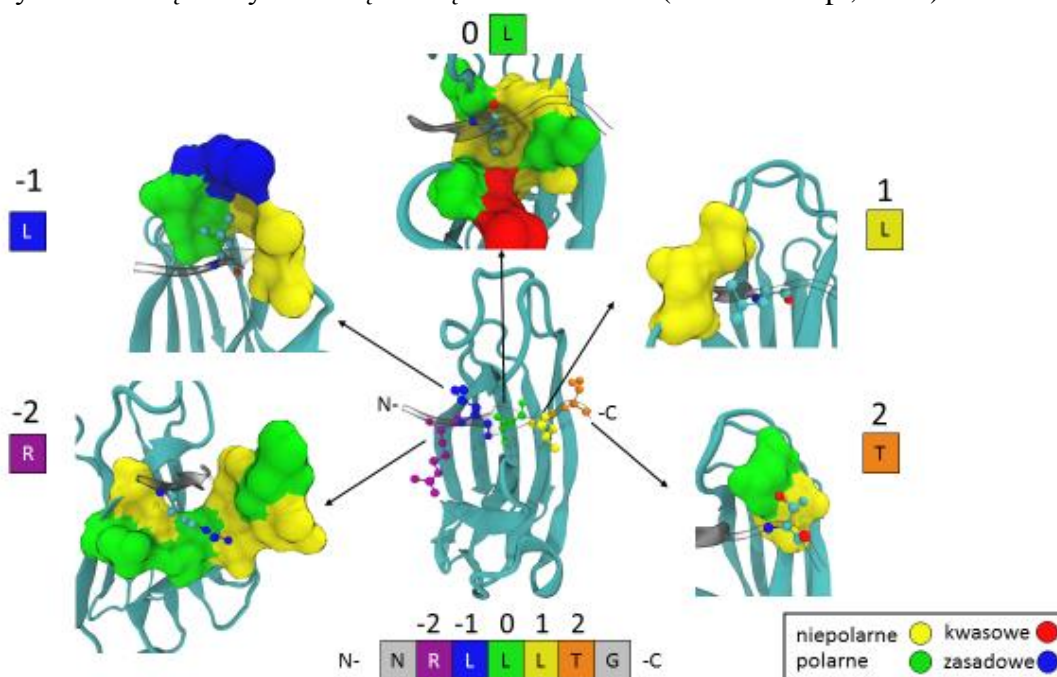
## 5. DYSKUSJA

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdziły, że drożdżowe białka mitochondrialnego systemu Hsp70 tworzą z substratem Isu1 kompleks potrójny Ssq1:Hsc20:Isu1 dzięki rozległej i skomplikowanej sieci oddziaływań. Oddziaływania pomiędzy białkami kompleksu są zależne od cyklu ATPazowego oraz zachodzą w określonej kolejności, odpowiednio w pierw powstaje kompleks podwójny Hsc20:Isu1 i do niego następnie przyłącza się białko Ssq1. Ponadto otrzymane przeze mnie wyniki w pełni korelują z wcześniej opublikowanymi danymi, które wykazały, że mutacje zaburzające oddziaływanie w obrębie kompleksu potrójnego Ssq1:Hsc20:Isu1 prowadzą do silnych defektów we wzroście drożdży lub powodują śmierć komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

### 5.1 Funkcjonalne oddziaływanie systemu białek opiekuńczych Hsp70/J ze zwiniętym substratem białkowym

Ważnymi biologicznie substratami dla systemów Hsp70 są polipeptydy, które często są niepoprawnie zwinięte. Zrozumienie interakcji maszynery Hsp70 z takimi substratami jest ograniczone, ze względu na praktyczne trudności pracy z częściowo zwiniętymi białkami. Białka Hsp70 rozpoznają fragmenty hydrofobowe. Sekwencja consensus rozpoznawana przez DnaK składa się z hydrofobowego rdzenia pięciu reszt, głównie L, lecz także I, V, F, Y. Ponadto sekwencja ta jest otoczona dwoma regionami flankującymi zawierającymi reszty zasadowe (Rüdiger i wsp., 1997). Istnieją różnice między różnymi Hsp70 odnośnie dokładniejszych preferencji, najczęściej najbardziej istotny jest hydrofobowy charakter tych reszt oraz ładunek dodatni. Pierwszy opis strukturalny wiązania substratu przez Hsp70 na poziomie atomowym ujawnił, że modelowy peptyd zawierający 7 reszt NRLLLTG (w skrócie peptyd „NR”) wiąże się w wydłużonej konformacji (przypominającej konformację poliprolinową) do kieszeni w C-terminalnej domenie wiążącej substrat (SBD) białka DnaK

będącego głównym białkiem Hsp70 w *E. coli* (Ryc.62). Rejon białka DnaK, który jest zaangażowany w oddziaływanie z łańcuchami bocznymi peptydu został zidentyfikowany wokół centralnego miejsca (oznaczonego jako miejsce 0) i znajduje się w obrębie głębokiej kieszeni. Do tego miejsca wiąże się druga leucyna modelowego peptydu. Ten hydrofobowy rejon tłumaczy silną preferencję ku alifatycznym resztom hydrofobowym w motywach rozpoznawanych przez DnaK. Na modelu widać także pozostałe rejony zaangażowane w oddziaływanie z substratem w obrębie białka DnaK po obu stronach względem miejsca centralnego 0 (odpowiednio miejsca -3, -2, -1, +1, +2, +3), a które to potencjalnie mogą się charakteryzować dużą elastycznością w wiązaniu substratu (Clerico i wsp., 2015).



**Ryc.62 Model kompleksu domeny wiążącej substrat białka DnaK z peptydem NRLLLTG, z zaznaczonymi miejscami -2, -1, 0, +1, +2 w kieszeni wiążącej substrat białka DnaK**

*Struktura fragmentu białka DnaK (PDB ID: 1DKZ) z oznaczonym różnymi kolorami modelowym peptydem NRLLLTG. Ponadto kolorami są zaznaczone rejony białka DnaK o kluczowym znaczeniu w poszczególnych miejscach wiązania substratu, czerwonym kolorem oznaczone są reszty aminokwasowe kwasowe, niebieskim zasadowe, żółtym niepolarne, zielonym polarne.*

W tym przypadku między innymi znaczący udział mają wiązania wodorowe z aminokwasowym łańcuchem głównym, które mogą stabilizować związany peptyd. W DnaK reszty M404, V436 i A429 stanowią odpowiednio miejsca -1, 0, +1 (Rüdiger i wsp., 2000). Kolejne badania pokazały, że obraz oddziaływania jest bardziej skomplikowany i na poszczególne miejsca oddziaływania przypada udział wielu reszt aminokwasowych. Na miejsce -1 wpływ mają reszty M404, T428, A429 i R467, zaś na miejsce +1 wpływ mają reszty E402, T403, M404, A429 (Nordquist i wsp., 2021). Reszty aminokwasowe potencjalnie zaangażowane w oddziaływanie z miejscami w zakresie od -2 do +2 przedstawiłem na Ryc.62. Literatura podaje, że miejsce -1 białka DnaK jest chronione przed rozpuszczalnikiem i w tym miejscu preferowane są reszty aminokwasowe peptydu o charakterze hydrofobowym jak L, P, M oraz reszty aromatyczne jak Y i F. Miejsce +1 jest bardziej wyeksponowane do rozpuszczalnika, a zatem może wiązać takie reszty jak L, P i T czyli zarówno hydrofilowe i hydrofobowe (Rüdiger 1997).

Dalsze badania także potwierdziły opisane wyżej wnioski, również w odniesieniu do Hsp70 z innych organizmów, niemniej dostarczały także dodatkowych nowych szczegółów dotyczących oddziaływania Hsp70-peptyd. Przykładowo nie zawsze jest konieczne żeby peptyd posiadał dodatni ładunek zlokalizowany w obrębie reszty oddziałującej z miejscem 0. W typowej orientacji N-terminalna część peptydu powinna oddziaływać z miejscem -3, a C-terminalna część peptydu z miejscem +3. Możliwe jest też wiązanie „na odwrót”, z peptydem związanym w odwrotnej orientacji czyli N-koniec oddziałuje z +3, a C-koniec z -3. Tak jest w przypadku białka HscA. Często gdy odwrotna orientacja jest preferowana, to w miejscu 0 jest obecna prolina (Clerico i wsp., 2015).

Kolejnym istotnym faktem jest, że peptydy działają jako allosteryczne efekторы. Doświadczalnie wykazano, że im dany peptyd jest bardziej hydrofobowy tym efektywniej stymuluje aktywność ATPazową Hsp70. Kluczowe jest jednak to, że w warunkach komórkowych białka Hsp70 oddziałują z kompletnymi białkami, a nie izolowanymi peptydami. Niemniej trudnością w badaniach z kompletnymi białkami jest kontrola ich stanu sfałdowania. Białka Hsp70 w warunkach *in vivo* oddziałują z białkami częściowo rozfałdowanymi, lecz w warunkach *in vitro* trudno jest w powtarzalny sposób częściowo rozfałdować białka bez całkowitej utraty trzeciorzędowej struktury skutkującej powstaniem agregatów.

Uzyskane kryształy kompleksów bakteryjnego białka DnaK i peptydów substratowych obejmowały kompleksy, które składały się z C-terminalnego końca DnaK (fragment obejmujący reszty 389-607) i peptydu NRLLLTG (Ryc.62). Pierwsza połowa struktury jest kompaktową  $\beta$ -kanapką, za którą jest rozwinięta struktura złożona z  $\alpha$ -helis. Helisa  $\alpha A$  i pierwsza N-końcowa połowa długiej drugiej helisy  $\alpha B$  są zintegrowane z pierwszą domeną SBD- $\beta$ , podczas gdy pozostałe fragmenty helikalne są sfałdowane wokół odrębnego rdzenia hydrofobowego. Helisa  $\alpha B$  obejmuje zakres zarówno SBD- $\alpha$  i SBD- $\beta$ . Peptyd jest związany z DnaK w wydłużonej konformacji wewnątrz  $\beta$  kanapki. Elementy helikalne nie uczestniczą bezpośrednio w wiązaniu peptydu. Za to pełnią rolę wieczka otaczającego substrat przez zatraskiwanie C-końcowej połowy helisy  $\alpha B$  z zewnętrznymi pętlami domeny SBD- $\beta$  (Zhu i wsp., 1996).

Poddomena  $\beta$ -kanapki obejmuje reszty 393-502, które są ułożone w dwie kartki z czterema antyrównoległymi strukturami  $\beta$  występującymi w każdej kartce. Dolna kartka ( $\beta 3$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ) jest typową, skręconą  $\beta$  kartką ze spinkami łączącymi poszczególne struktury  $\beta$ . Górna kartka ( $\beta 5$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ) jest wysoce nieregularna. Nieregularności związane są z charakterystycznymi pętlami wystającymi z właściwej kanapki w kierunku miejsca wiązania substratu. Kanał wiązania substratu jest odpowiednio uformowany przez wewnętrzne pętle z jednej strony, w tym pętlę łączącą  $\beta 1$  z  $\beta 2$  (402-409) oraz drugą pętlę łączącą  $\beta 4$  z  $\beta 5$  (444-451) z jednej strony oraz zlokalizowane po drugiej stronie dwie zewnętrzne pętle, łączące  $\beta 3$  z  $\beta 4$  (428-433) i  $\beta 5$  z  $\beta 6$  (462-470), zlokalizowane po drugiej stronie. Główny udział w wiązaniu substratu ma pętla łącząca  $\beta 1$  z  $\beta 2$  oraz pętla łącząca  $\beta 3$  z  $\beta 4$ . Peptyd nie kontaktuje się z fragmentami helikalnymi. Czwarta reszta peptydu, w tym przypadku leucyna, kontaktuje się z miejscem 0 w strukturze DnaK znajdującym się w głębokiej kieszeni. Peptyd oddziałuje z białkiem poprzez sieć oddziaływań van der Waalsa między łańcuchami bocznymi peptydu, a białkiem, oraz poprzez wiązania wodorowe tworzone z łańcuchem głównym peptydu, które z kolei są dodatkowo wspomagane oddziaływaniami van der Waalsa. Łańcuchy boczne kontaktujące się z DnaK są głównie hydrofobowe. Wiązanie jest najsilniejsze w punkcie

łączącym miejsce 0 w DnaK z środkowymi resztami peptydu, aczkolwiek oddziaływania zachodzą także w pozostałych punktach, z wyjątkiem znajdującej się na początku peptydu asparaginy (N-koniec peptydu), która zlokalizowana w pobliżu miejsca -3 białka DnaK. Ponadto istnieje korelacja między tym jak bardzo dana pozycja białka DnaK jest schowana w głębi struktury białka, a poziomem istotności danej reszty aminokwasowej w wiązaniu substratu. Środkowe reszty peptydu są wiązane przez reszty aminokwasowe DnaK, które są bardziej zagłębione w strukturze tego białka, dzięki czemu opisane miejsce oddziaływania jest chronione przed dostępem rozpuszczalnika i w rezultacie bardziej istotne w porównaniu do sąsiednich miejsc. Głęboka lokalizacja opisanych reszt DnaK powoduje schowanie związanego peptydu w głębi struktury DnaK. Tak związane środkowe reszty peptydu są zaangażowane w tworzenie 5 z 7 wiązań wodorowych z łańcuchem głównym białka DnaK. Zatem wiązanie peptydu jest determinowane przez rdzeń pięciu reszt rdzenia peptydu. Wszystkie wiązania wodorowe między białkiem, a substratem są tworzone między resztami peptydu, a resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi na pętli między  $\beta 3$  i  $\beta 4$ , ukierunkowanymi w kierunku zewnętrznym.

Samo miejsce 0 zapewnia trzy wiązania wodorowe z łańcuchem głównym substratu. Boczny łańcuch leucyny peptydu oddziałuje z F426 z  $\beta 3$ , V436 i I438 z  $\beta 4$ , I401 i T403 z  $\beta 1$ . Reszty M404 i A429 (odpowiednio miejsca -1 i +1) tworzą hydrofobowy łuk nad szczytem kanału wiążącego i ogólny ładunek powierzchni wiązania jest negatywny, jest to kluczowe w związku z tym, że peptydy często są dodatnio naładowane (Zhu i wsp., 1996). Preferencja wiązania leucyny w miejscu 0 czyli V436 jest zatem wyraźna, choć potencjalnie dopuszczalna byłaby także metionina, izoleucyna, treonina i seryna. Z tej perspektywy wydaje się, że obecność proliny jest wykluczona, lecz szersza analiza rodziny białek Hsp70 sugeruje, że są inne białka w obrębie tej rodziny, które wręcz preferują prolinę w miejscu 0, zgodnie z modelem wiązania peptydu „na odwrót” (Cupp-Vickery i wsp., 2003).

Przykładem takiego białka, może być bakteryjne Hsp70 zaangażowane w biogenezę centrów FeS, białko HscA, które oddziałuje z peptydem ELPPVKIHC (peptyd stanowi fragment białka IscU, które pełni funkcję „molekularnego rusztowania” podczas syntezy FeS) zawierającym motyw LPPVK w orientacji „na odwrót”. Czyli część N-terminalna peptydu (E98) oddziałuje z miejscem białka HscA +3, reszta P101 oddziałuje z miejscem 0, a reszta K103 po stronie C-terminalnej peptydu z pozycją -2. HscA posiada M401 w miejscu -1, M433 w miejscu 0, F426 stanowi miejsce +1 (Cupp-Vickery i wsp., 2003). Między wyspecjalizowanym HscA, a wielofunkcyjnym DnaK istnieją różnice w ładunkach. Frontalna część HscA zawiera kwasowe reszty D422 i E406, podczas gdy dalsza część HscA zawiera reszty zasadowe jak R453 i R457. Natomiast frontalna część DnaK zawiera reszty niepolarne, a dalsza część reszty neutralne lub kwasowe, przykładowo Q456 i D460. Z kolei w przypadku drożdżowego białka Ssq1 miejsce 0 stanowi reszta V472, a miejsce +1 stanowi F462 (Dutkiewicz i wsp., 2017).

Uzyskane do tej pory wyniki w ramach analizy oddziaływania białka DnaK z peptydem są bardzo interesujące, ponieważ pokazują, jak peptydy oddziałują z domeną wiążącą substrat (SBD) Hsp70. Subdomena SBD, która tworzy wieczko (SBD- $\alpha$ ) zamyka się ciasno nad peptydem, który zostaje w ten sposób uwięziony w szczelinie wiążącej substrat w subdomenie  $\beta$  (SBD- $\beta$ ).

Niemniej ten typ oddziaływania Hsp70-substrat, w którym wieczko zaciska się ciasno nad szczeliną, nie odzwierciedla w pełni sytuacji, kiedy dochodzi do interakcji z białkami, które są rozfałdowane, częściowo sfałdowane lub tworzą duże agregaty białkowe. Jednak ostatnie wyniki dostarczyły pewnych wskazówek, które pokazują że białko Hsp70 jest w stanie lepiej przystosować się do wiązania różnych substratów, niż wcześniej sądzono. Przedstawione dane sugerują, że SBD- $\alpha$  może nie być „po prostu” przykrywką, a raczej że oddziałuje bezpośrednio z masywnymi substratami, a także może charakteryzować się znaczną niejednorodnością konformacyjną.

Wieczko SBD- $\alpha$  składa się z pięciu helis (helisy od A do E), za którymi jest region nieustrukturyzowany składający się z 30 reszt. Badania dotyczące białka DnaK w oparciu o technikę FRET pokazały, że kiedy białko DnaK było w stanie związanym z ATP obserwowano pojedynczy wysoki szczyt w zakresie niskich wartości sygnału FRET, to oznacza, że w stanie związanym z ATP wieczko pozostawało cały czas otwarte. Natomiast kiedy DnaK jest związane z ADP, to obserwowano dwa szczyty. Obecność szczytu w zakresie wysokich wartości FRET wskazuje, że wieczko w obrębie DnaK przyjęło inną konformację w porównaniu do stanu związanego z ATP. Fakt, że zamiast jednego szczytu obserwowano dwa, oznacza dużą swobodę konformacyjną wieczka. Wieczko nie przyjęło jednej konformacji w obrębie całej populacji białka DnaK, lecz część populacji posiadało wieczko w pozycji otwartej, a część w pozycji zamkniętej, z poszczególnymi cząsteczkami zmieniającymi konformację, a zatem przechodzącymi z jednej populacji do drugiej. Gdy zastosowano niehydrolizowalny analog ATP, AMP-PNP, uzyskany sygnał wskazywał na heterogenność konformacyjną, jak w przypadku stanu związanego z ADP. Sugeruje to, że wiązanie między drugą, a trzecią grupą fosforanową w cząsteczce ATP jest kluczowe dla komunikacji allosterycznej w obrębie DnaK i umożliwia szerokie otwarcie wieczka. Gdy dodatkowo było związane białko DnaJ, czyli zawierający domenę J partner DnaK, zarówno w stanie związanym z ATP i stanie związanym z ADP obserwowano podobną heterogenność konformacyjną (choć obserwowano przesunięcie ku stanom z wysokim sygnałem FRET). Po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej substratu, hydrofobowego peptydu P5 o sekwencji CALLLSAPRR (wiązanego w konformacji klasycznej jak peptyd NR dzięki obecności leucyn w sekwencji peptydu), w obecności ADP znacząco wzrosła populacja o wysokim sygnale FRET, co oznacza, że większość cząsteczek miała zamknięte wieczko. Populacja cząsteczek z zamkniętym wieczkiem nie stanowiła jednak 100% cząsteczek DnaK, możliwe, że jest to kwestia braku możliwości osiągnięcia przez DnaK takiego homogennego stanu (Banerjee i wsp., 2016). W odróżnieniu od DnaK, drożdżowe białko Ssc1 jest w stanie zamknąć wieczko w 100% populacji (Mapa i wsp., 2010). W mieszaninach reakcyjnych z DnaK i peptydem P5, dodanie białka DnaJ nie wpłynęło na zmianę ostatecznego rezultatu analizy FRET, jedynie miało wpływ na dwukrotnie szybsze wiązanie substratu przez DnaK. Gdy zamiast peptydu do analizy oddziaływania z DnaK zastosowano cztery różne rozfałdowane białka pochodzące z *E. coli*, zaobserwowano rozbieżności w uzyskanych wynikach w zależności od wykorzystanego do badań białka. Niemniej częściej obserwowano niski sygnał FRET, co oznacza, że wieczko wykazuje dużą swobodę konformacyjną zależnie od związanego substratu (Banerjee i wsp., 2016).

Obecnie wciąż nasza dotychczasowa wiedza dotycząca zrozumienia procesu oddziaływania systemu białek Hsp70 z biologicznie ważnymi, w pełni sfałdowanymi polipeptydami jest ograniczona. Przykładem takiego zwiniętego białka jest między innymi białko Isu1, które pełni istotną rolę podczas biogenezy centrów FeS. Aby lepiej zrozumieć



mechanizm działania systemu białek Hsp70/J, jako model badawczy wykorzystałem wysoce wyspecjalizowany system białek opiekuńczych Hsp70(Ssq1)/Hsc20, który odgrywa kluczową rolę podczas biogenezy centrów FeS u drożdży *S.cerevisiae*. Jedynym do tej pory zidentyfikowanym substratem systemu Ssq1/Hsc20 jest białko Isu1, które pełni rolę molekularnego rusztowania podczas syntezy centrów FeS.

Białko Hsp70 Ssq1 składa się z wiążącej nukleotyd N-terminalnej domeny ATPazowej (NBD) i wiążącej substrat C-terminalnej domeny (SBD). Miejsce wiązania substratu znajduje się wewnątrz struktury  $\beta$ -karkki (fragment SBD- $\beta$ ), natomiast dostęp do kieszeni wiążącej substrat zamyka  $\alpha$ -helikalne wieczko (fragment SBD- $\alpha$ ). Białko współpracujące, zawierające domenę J – Hsc20 składa się z domeny N-terminalnej zwanej też domeną J, która posiada dwuskrętną strukturę złożoną z czterech antyrównoległych  $\alpha$ -helis, wśród których najistotniejsza jest helisa druga i trzecia. Analiza struktury białka Hsc20 *Saccharomyces cerevisiae* była możliwa dzięki uzyskaniu kryształów białka Hsc20. Na wstępie uzyskano kryształ konstruktu obejmującego reszty 10-184 natywnego białka Hsc20, jedynym uciętym fragmentem w tym przypadku była presekwencja kierująca do mitochondriów, zlokalizowana na N-końcu białka. W warunkach komórkowych ta presekwencja jest usuwana po translokacji do mitochondrium. Na pojedynczą jednostkę asymetryczną przypadały dwie cząsteczki, oznaczone odpowiednio A i B. W wyniku dyfrakcji została uzyskana rozdzielczość 2,13Å, niestety nie udało się zobrazować niektórych fragmentów struktury. Lepsze rezultaty uzyskano w przypadku zastosowania wariantu białka zawierającego reszty od 5 do 182. Podobnie jak wcześniej w jednostce asymetrycznej były dwie cząsteczki A i B, uzyskana rozdzielczość wynosiła 1,85Å. Dla cząsteczki A określono strukturę białka, która obejmowała reszty 8-181, a dla B 12-176, nie udało się natomiast rozwiązać struktury obejmującej fragmenty 47-60 oraz 95-98. Po połączeniu obu modeli, udało się uzyskać dobrą strukturę dla reszt 10-46 oraz 56-181. Białko Hsc20 przyjmuje kształt litery L, zarówno domena J (11-84) i domena C-terminalna (101-184) przyjmują strukturę  $\alpha$ -helikalną, obie te  $\alpha$ -helisy łączy elastyczny łącznik (85-100). Ta analiza potwierdziła obecność znanych struktur jak helisa H2 i H3 w domenie J. Zupełnie nową obserwacją było dostrzeżenie nieuporządkowania końcowych fragmentów helis H2 i H3 wraz z pętlą łączącą te helisy. To nieuporządkowanie nie występuje w ortologach z innych gatunków. Może to świadczyć o większej elastyczności domeny J w tym białku w porównaniu do jego ortologów. Region pętli jest krótszy w białku *S. cerevisiae* w porównaniu do ortologów ludzkich i bakteryjnych. Łącznik zaś posiada dodatkową  $\alpha$ -helisę (91-100). Te unikatowe cechy są skutkiem skomplikowanej historii ewolucyjnej w której Hsc20 i Ssq1 koewoluowały razem jako dedykowane elementy systemu transferu FeS. Ssq1 powstało w wyniku duplikacji genu mtHsp70 i unikatowe cechy Hsc20 wyewoluowały w celu dopasowania do niestandardowego białka mtHsp70. Domena C-terminalna mocno przypomina te znane z ortologów białka Hsc20. Złożona jest z trzech helis, z hydrofobowym rdzeniem utworzonym przez niepolarne łańcuchy boczne aminokwasów helis H6, H7 i H8. Powierzchnie ekspozowane hydrofobowe reszty L105, L106, L109 są obok ujemnie naładowanego fragmentu helisy H6 (Ciesielski i wsp., 2012).

W białku Hsc20 obie helisy łączy elastyczna pętla z zawsze konserwowanym motywem HPD niezbędnym do interakcji z Hsp70. Drugą domeną Hsc20 jest domena C-terminalna która głównie uczestniczy w wiązaniu substratu, ale również jest zaangażowana w oddziaływanie z Ssq1, co też potwierdziłem doświadczalnie podczas realizacji projektu doktorskiego.



Pierwszym wyzwaniem podczas moich badań było opracowanie efektywnego sposobu uzyskiwania preparatów białkowych kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 o wysokim stężeniu. W tym celu wykorzystalem metodę, w ramach której w ekspresyjnym szczepie *E. coli* prowadziłem jednoczesną nadprodukcję trzech białek (odpowiednio Isu1, Hsc20 i Ssq1 z mutacją T239/A uniemożliwiającą hydrolizę ATP). Wykorzystanie mutantu Ssq1 T239/A było istotne dla uzyskania kompleksu obejmującego wszystkie trzy białka, ponieważ stabilizowała ona stan białka Hsp70 ze związanym ATP i tym samym oddziaływanie z białkiem zawierającym domenę J. To podejście eksperymentalne umożliwiło formowanie kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 już podczas heterologicznej nadprodukcji białek drożdżowych w komórkach bakteryjnych. Ponadto zaobserwowałem, że nadprodukowane przeze mnie białka w kompleksie wykazywały większą stabilność, niż kiedy były one nadprodukowane osobno, szczególnie zwiększoną stabilność obserwowałem w przypadku białek Ssq1 oraz Isu1. Kluczowym etapem podczas oczyszczania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 była preparatywna filtracja żelowa, która pozwoliła mi na rozdział białek na podstawie ich masy. Analiza krzywych absorpcji UV, które uzyskałem podczas separacji frakcji pozwoliła mi wyizolować kompleks białek o masie 139kDa, który obejmował wszystkie trzy białka, Ssq1:Hsc20:Isu1, jak również kompleks o masie, który obejmował białka Hsc20:Isu1.

Zgodnie z moją wiedzą, jest to pierwszy kompleks obejmujący białka Hsp70-białko J-substrat, który został oczyszczony w znacznych ilościach, a zatem który nadaje się do analizy strukturalnej. Na wstępie wykorzystując dokowanie molekularne w połączeniu z symulacjami dynamiki molekularnej (MD), został uzyskany model strukturalny potrójnego kompleksu Hsp70(Ssq1)-Hsc20-Isu1. W tym celu została wykorzystana struktura krystaliczna Hsc20 (Ciesielski i wsp., 2012) oraz modele homologiczne Hsp70(Ssq1)-ATP i Isu1.

Następnie oczyszczone kompleksy białkowe były wykorzystane w doświadczeniach wymiany deuterowej połączonej ze spektrometrią mas (HDX-MS). Technika wymiany deuterowej umożliwiła uzyskanie wyników szczegółowo pokazujących oddziaływanie między poszczególnymi fragmentami danych białek. Poziom deuteracji jest zależny od kilku czynników, przede wszystkim od stabilności wiązań wodorowych. Z tych danych można uzyskać istotne informacje dotyczące struktury. Dodatkowo dane z analiz różnicowych profili deuteracji kompleksów analizowanych względem pojedynczych białek, w niektórych przypadkach pozwalają na wgląd, które fragmenty poszczególnych białek są odpowiedzialne za oddziaływanie z pozostałymi białkami. Tak więc technika HDX-MS wskazuje na określone regiony białka, ale nie ma rozdzielczości pozwalającej na identyfikację pojedynczych aminokwasów.

Analiza poziomów deuteracji danego białka mówi nam o ekspozycji poszczególnych regionów do buforu lub ich ukryciu w obrębie hydrofobowych kieszeni, lecz przede wszystkim mówi o stabilności wiązań wodorowych, a to jest zależne od oddziaływań wewnątrzbiałkowych lub z innymi białkami. W uproszczeniu swobodne białko, mając wyeksponowaną sieć wiązań wodorowych do buforu, chętniej się wymienia na deuter, natomiast regiony zaangażowane w oddziaływanie w kompleksie białkowym wykazują zazwyczaj stabilizację sieci wiązań wodorowych, co prowadzi do mniejszego tempa wymiany na deuter. Technika HDX-MS ma swoje wady, niemniej mimo poważnych ograniczeń w pewnych przypadkach technika ta może zasugerować analizę regionów w obrębie badanych białek jako potencjalnie zaangażowanych w ich wzajemne oddziaływanie z wykorzystaniem innych podejść eksperymentalnych.

Resztami białka Hsc20 odpowiedzialnymi za oddziaływanie z substratem – białkiem Isu1 są według literatury reszty L104, K107, D110, D113, E114, Q117 (Andrew i wsp., 2006). Oddziaływanie między Isu1 i Hsc20 jest na tyle silne, że eksperymentalnie obserwowano oddziaływanie między Isu1, a fragmentem Hsc20 składającym się tylko z domeny C-terminalnej (reszty 71-184). Sześć reszt aminokwasowych białka Hsc20 zostało wytypowanych jako potencjalnie zaangażowane w oddziaływanie z substratem w wyniku porównania sekwencji aminokwasowej białek Hsc20 i bakteryjnego białka HscB oraz w wyniku analizy struktur krystalograficznych białek, co pozwoliło zawęzić obszar poszukiwań do reszt znajdujących się w odpowiednich miejscach struktury. Początkowo zaobserwowano, że mutant mający substytucję tych sześciu reszt na alaninę nie różni się fenotypowo od białka typu dzikiego w badaniach *in vivo*. Jednakże w doświadczeniach *in vitro* można było zauważyć zaburzone oddziaływanie Isu1 z mutantem Hsc20. W doświadczeniach polegających na wirowaniu w gradiencie glicerolu mieszaniny reakcyjnej zawierającej kombinację Isu1 WT i Hsc20 z sześcioma substytucjami alaninowymi nie zaobserwowano oddziaływania między substratem i zmutowanym białkiem zawierającym domenę J. Podobnie w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych wykazano, że wprowadzone mutacje alaninowe w obrębie reszt L104, K107, D110, D113, E114, Q117 białka Hsc20 powodują znaczny defekt w oddziaływaniu z białkiem Isu1 (Andrew i wsp., 2006).

Dalsze analizy dotyczące Hsc20 wykazały, że w oddziaływanie z Isu1 jest zaangażowany zarówno motyw LKDDEQ, jak i znajdujący się w tym samym regionie motyw LLY złożony z reszt L105, L109 oraz Y163, który oddziałuje z konserwowanym motywem Isu1 złożonym z reszt L63, V72 i F94. Doświadczenia precypitacji kompleksów białkowych jednoznacznie potwierdziły, że wprowadzenie substytucji alaninowych w obrębie motywu LLY ma znaczący wpływ na formowanie się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 i skutkuje brakiem oddziaływania między Hsc20, a Isu1, które uniemożliwia wiązanie się substratu z białkiem Ssq1.

Domena C-końcowa białka Hsc20 złożona jest z trzech helis, z hydrofobowym rdzeniem utworzonym przez niepolarne łańcuchy boczne aminokwasów helis H6, H7 i H8. Zgodnie z literaturą hydrofobowe reszty L105, L106, L109 są eksponowane na powierzchni obok ujemnie naładowanego fragmentu helisy H6.

Analiza której celem było porównanie udziału obu motywów oddziaływania z Isu1: LKDDEQ i LLY, które obejmują ten sam region białka Hsc20 wykazała, że motyw LLY ma znacznie większy wpływ na oddziaływanie pomiędzy Hsc20 i Isu1 zarówno *in vivo* oraz *in vitro*. Doświadczenia precypitacji kompleksów białkowych wykazały, że mutant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> nie był zdolny formować kompleksu z Isu1, natomiast mutant Hsc20<sup>D110,D113,E114,Q117/AAAA</sup> wiązał o połowę słabiej białko Isu1 niż Hsc20 WT. Z kolei analiza, która dotyczyła wpływu pojedynczych mutacji w obrębie Hsc20 na formowanie kompleksu z Isu1 pokazała, że najbardziej wyraźne osłabienie wiązania się z Isu1 było widać w przypadku mutantów Hsc20<sup>L105/A</sup>, Hsc20<sup>L109/A</sup> i Hsc20<sup>Y163/A</sup> (Ciesielski i wsp., 2012).

Z kolei w doświadczeniach, w których badano stymulację aktywności ATPazowej białka Ssq1, zaobserwowano całkowity brak stymulacji aktywności Hsp70 w obecności wariantu Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup>. Ponadto mutant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> wykazał znacznie obniżone powinowactwo do Isu1-GST. Tak więc te wyniki wykazały, że wariant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> nie jest zdolny do ukierunkowania białka Isu1 do wiązania przez Ssq1 i

tym samym do stymulacji jego aktywności. *In vivo* komórki zawierające gen *HSC20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> jako jedyną kopię genu *HSC20*, charakteryzowały się silnie spowolnionym wzrostem na podłożu z glukozą w stosunku do szczepu, który posiadał dziką kopię genu *HSC20*. Ponadto aktywność enzymów mitochondrialnych zawierających centra FeS, takich jak akonitaza, czy dehydrogenaza bursztynianowa były znacznie obniżone (Ciesielski i wsp., 2012).

Uzyskane przeze mnie wyniki w ramach realizacji projektu badawczego są w pełni zgodne z doniesieniami literaturowymi. W doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych wariant *Hsc20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> nie oddziaływał z substratem *Isu1*. Gdy w mieszaninie było obecne białko *Ssq1* to jego ilość która precypitowała wraz z *Isu1*-GST w obecności mutantu *Hsc20*<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> była równa ilości *Ssq1*, które precypitowało wraz z *Isu1*-GST, kiedy *Hsc20* było pominięte w mieszaninie reakcyjnej. Jest to kolejne potwierdzenie, że substytucje alaninowe tych trzech reszt aminokwasowych prowadzą do zaburzenia oddziaływania między *Hsc20*, a *Isu1*, co z kolei przekłada się na brak możliwości efektywnego formowania kompleksu potrójnego *Ssq1*:*Hsc20*:*Isu1*.

Identyfikacja motywu LVF w obrębie białka *Isu1* była możliwa dzięki wcześniejszej analizie uzyskanej struktury krystalicznej drożdżowego białka *Hsc20*. Uzyskaną strukturę *Hsc20* wykorzystano do doświadczeń *in silico*. Niestety do tej pory nie została uzyskana struktura krystalograficzna drożdżowego białka *Isu1*, w związku z tym w badaniach wykorzystano model homologiczny białka opracowany w oparciu o znaną strukturę bakteryjnego białka *IscU*. Molekularne dokowanie obu białek, *Hsc20* i *Isu1*, pozwoliło pokazać, że hydrofobowy motyw LLY białka *Hsc20* oddziałuje z regionem białka *Isu1*, w którym później zidentyfikowano motyw LVF. Natomiast naładowane reszty DDE *Hsc20* oddziałują z resztami K54, K55, R74 białka *Isu1*. Równolegle przeprowadzona analiza NMR bakteryjnych odpowiedników również wykazała, że homologiczne reszty w obrębie *IscU* z *E. coli* (odpowiednio M31, V40, Y61) ulegały zmianom w doświadczeniach spektroskopii NMR, kiedy dodano *HscB* do mieszaniny reakcyjnej, w której obecne było białko *IscU* (Majewska i wsp., 2013).

Aby potwierdzić rolę zidentyfikowanych reszt w oddziaływaniu z *Hsc20* przygotowano mutanty *Isu1*<sup>L63,V72,F94/AAA</sup> oraz *Isu1*<sup>L63,V72,F94/SSS</sup>. Zazwyczaj reszty hydrofobowe są schowane głęboko w strukturze białka, niemniej w przypadku białka *Isu1* motyw LVF mimo hydrofobowego charakteru jest silnie eksponowany. W przypadku mutantu z wprowadzonymi resztami alaninowymi istniało ryzyko, że substytucje alaninowe mogą okazać się niedostateczne, aby zaburzyć oddziaływanie z *Hsc20*, w związku z tym został dodatkowo przygotowany mutant z substytucjami serynowymi. Doświadczenia *in vitro* polegające na precypitacji kompleksów białkowych *Hsc20*/*Isu1*-GST jednoznacznie potwierdziły, że obie zmutowane wersje „molekularnego rusztowania” charakteryzowały się znacznym upośledzeniem oddziaływania z białkiem *Hsc20*. Uzyskane wyniki w pełni korelowały z eksperymentami *in vivo*, które wykazały że zarówno mutacje alaninowe, jak i serynowe w motywie LVF genu *ISU1* są letalne dla drożdży *S.cerevisiae* (Majewska i wsp., 2013).

W następnej kolejności pojawiło się pytanie o efekt fenotypowy kombinacji mutacji zaburzających oddziaływanie z substratem *Isu1* w obrębie białka zawierającego domenę J i *Hsp70*. Aby odpowiedzieć na to pytanie skonstruowano szczep drożdży z mutacją w obrębie

*HSC20*<sup>L104,K107,D110,D113,E114,Q117/AAAAAA</sup> oraz *SSQ1*<sup>V472/F</sup>. Mutacja V472/F wprowadza substytucję reszty aminokwasowej miejsca 0 w kieszeni wiążącej substrat, konkretnie tej zaangażowanej w oddziaływanie z resztą P134 motywu LPPVK białka Isu1. W warunkach *in vivo* szczep zawierający mutację *SSQ1*<sup>V472/F</sup> oraz dziką wersję genu *HSC20* charakteryzował się dzikim fenotypem. Natomiast szczep zawierający jednocześnie wariant *Hsc20*<sup>L104,K107,D110,D113,E114,Q117/AAAAAA</sup> oraz wariant *Ssq1*<sup>V472/F</sup> hodowany w temperaturze 30°C rósł znacznie wolniej, a w temperaturze 37°C nie tworzył kolonii wcale. Te obserwacje korelują z doświadczeniami *in vitro*, podczas których analizowano stymulację aktywności ATPazowej białka *Ssq1* (Andrew i wsp., 2006).

Także wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonej analizy HDX-MS pokazują, że motyw LVF białka *Isu1* ulega błyskawicznej wymianie na deuter, natomiast gdy *Isu1* jest związane w kompleksie z białkiem zawierającym domenę J - *Hsc20*, tempo wymiany znacznie spada.

Oddziaływanie białka *Hsc20* z *Isu1* jest kluczowe dla ukierunkowania substratu do tworzenia kompleksu z mitochondrialnym *Hsp70*, ale także pełni istotną rolę w ochronie *Isu1* przed degradacją przez proteazę *Pim1*. Dotychczasowa literatura jednoznacznie wskazuje, że białko *Isu1* w kompleksie z *Hsc20* jest chronione przed degradacją. Przyczyną degradacji *Isu1* *in vivo* przez proteazę *Pim1* jest ekspozycja specyficznych fragmentów sekwencji białka *Isu1* do roztworu, które to są rozpoznawane przez *Pim1*. Prawdopodobnie rozpoznawane fragmenty mają charakter hydrofobowy. Biorąc pod uwagę, że *Hsc20* również rozpoznaje fragmenty hydrofobowe w obrębie *Isu1*, ochrona *Isu1* przed degradacją, spowodowana oddziaływaniem z *Hsc20*, prawdopodobnie wynika z tego, że *Hsc20* zakrywa fragmenty *Isu1* rozpoznawane przez proteazę (Ciesielski i wsp., 2016).

Wyniki doświadczeń HDX-MS wskazują, że *Isu1* jest mocno chronione w kompleksie potrójnym. Prawdopodobnie zwiększona stabilizacja wynika z tego, że oprócz oddziaływań międzybiałkowych, dodatkowo dochodzi czynnik przesunięcia równowagi między stanem zdeorganizowanym (stan D, *ang. disordered*), a ustabilizowanym (stan S, *ang. stabilised*) białka *Isu1* w kierunku stanu S (Kim i wsp., 2012).

Na tym etapie pojawiło się kolejne pytanie, dlaczego mutacje alaninowe motywu LVF genu *ISU1* prowadziły do śmierci komórki, w odróżnieniu do mutacji w obrębie korespondującego motywu LLY genu *HSC20*, które prowadzą do obniżonego tempa wzrostu drożdży? Odpowiedzi na to pytanie dostarczyła analiza bioinformatyczna uzyskanej struktury krystalograficznej kompleksu białek bakteryjnych *IscU-IscS*, która wykazała że bakteryjny odpowiednik motywu LVF może być zaangażowany w oddziaływanie z bakteryjną desulfurazą cysteinową *IscS*. Aby zweryfikować tą hipotezę przeprowadzono doświadczenia, których celem było sprawdzenie, czy mutacje w obrębie motywu LVF białka *Isu1* zaburzają oddziaływanie z drożdżowym kompleksem *Nfs1(Isd11)*. Doświadczenia *in vitro* polegające na precypitacji kompleksów białkowych potwierdziły hipotezę o zaangażowaniu motywu LVF w formowanie kompleksu z desulfurazą cyteinową. Co więcej analiza bakteryjnego kompleksu *IscU-IscS* pozwoliła wytypować potencjalne reszty aminokwasowe w obrębie desulfurazy cysteinowej oddziaływujące z „molekularnym rusztowaniem”. Wytypowano reszty P478, L479, M482 w domenie C-terminalnej *Nfs1*. Ze względu na strukturalną rolę proliny przeprowadzono jedynie analizę znaczenia reszt aminokwasowych w pozycji 479 i 482 poprzez wprowadzenie substytucji alaninowych. Zarówno doświadczenia *in vitro*, jak *in*

*in vivo* potwierdziły udział obu analizowanych reszt w tworzeniu kompleksu z Isu1. Podsumowując przeprowadzone analizy kompleksu bakteryjnego IscS-IscU oraz drożdżowego kompleksu Hsc20-Isu1, a także wyniki uzyskane w ramach analizy biochemicznej sugerowały, że Nfs1 oraz Hsc20 dzielą to samo miejsce oddziaływania w obrębie białka Isu1. Doświadczenia *in vitro* polegające na precypitacji kompleksów białkowych potwierdziły, że ma miejsce współzawodnictwo pomiędzy Hsc20 i Nfs1 podczas wiązania się z Isu1. Tak więc powyższe wyniki pozwalają na postawienie hipotezy, która zakłada że białko Hsc20 najprawdopodobniej wypiera Nfs1 z kompleksu z Isu1, a w kolejnym etapie aktywuje białko Ssq1 do wiązania się z Isu1. To z kolei może świadczyć o regulacyjnej roli białka Hsc20, które to kontroluje szybkość transferu centrów FeS z Isu1 do docelowego białka (Majewska i wsp., 2013).

Analiza bioinformatyczna białek Hsc20 oraz Isu1 pokazała, że zarówno motyw LLY, jak i motyw LVF są motywami ewolucyjnie konserwowanymi. Wśród grzybów motyw LVF jest bardzo silnie konserwowany, spośród 62 analizowanych gatunków wszystkie miały walinę i fenyloalaninę, zaś leucyna występowała w 89%. Wyraźna preferencja reszt LVF jest też obserwowana wśród innych gatunków eukariotycznych. Nie jest to przypadkowe, ponieważ najsilniejsza konserwacja LVF jest wśród  $\alpha$ -proteobakterii spokrewnionych z przodkami mitochondriów. Za to wśród innych proteobakterii powszechne jest zastąpienie motywu LVF motywem MVY, taki motyw występuje choćby w białku IscU *E.coli*. W przypadku homologów Hsc20 około połowa badanych grzybów ma klasyczny motyw LLY, natomiast reszta ma motyw LMY. Można też zauważyć, że wśród pozostałych eukariontów motyw LMY występuje znacznie częściej niż LLY. W  $\alpha$ -proteobakteriach podobnie obserwuje się obecność motywu LMY, choć tu dodatkowo częstość występowania tego motywu ustępuje bardziej powszechnemu motywowi FMY. Jest to o tyle ciekawe, że pozostałe proteobakterie jednak w pierwszej pozycji tego motywu mają leucynę we wszystkich analizowanych przypadkach. Najprawdopodobniej wśród  $\alpha$ -proteobakterii zamiana leucyny na fenyloalaninę nastąpiła już po rozdziale linii na współczesne  $\alpha$ -proteobakterie i bezpośrednich przodków mitochondriów. Pozostałe proteobakterie, choć na pierwszej pozycji motywu mają konserwowaną leucynę, to pozostałe pozycje mogą się różnić od klasycznego motywu LLY. Najczęściej występuje motyw LMF, choć część ma też motyw LLF. Przykładowym ortologiem Hsc20, który posiada w domenie C-terminalnej motyw LMF jest białko HscB z gatunku *Escherichia coli*. W przypadku Nfs1 i jego ortologów, prawie we wszystkich analizowanych organizmach jest zachowana konserwacja reszt LM w motywie PLM, jedynie 30% grzybów ma w zamian motyw obejmujący reszty PLL (Majewska i wsp., 2013).

Kolejne analizy doświadczeń HDX-MS wykazały, że obecność w kompleksie oprócz Hsc20 dodatkowo Ssq1 powoduje dalszy spadek wymiany na deuter w omawianym regionie Isu1. W układzie obejmującym trzy białka Ssq1:Hsc20:Isu1 wszystkie reszty motywu LVF podlegają silnej protekcji, zaś w przypadku kompleksu podwójnego obserwowano tylko umiarkowaną protekcję dla L63 i F94, podczas gdy dla reszty V72 protekcję znikomą (Ryc. 45). Tak więc obecność Ssq1 dodatkowo zwiększa stabilność całej struktury Isu1.

Ze względu na fakt, że motyw LVF białka Isu1 jest zaangażowany w oddziaływanie z białkiem J oraz desulfurazą cysteinową to pojawia się pytanie o rolę tego motywu w protekcji „molekularnego rusztowania” przed degradacją przez proteazę Pim1 z rodziny proteaz Lon. W warunkach *in vivo* okres półtrwania białka Isu1 wynosi 20 minut. Natomiast w szczepie

drożdżowym posiadającym delecję  $\Delta pim1$ , w lizatach komórkowych ilość Isu1 pozostawała stała. Ponadto jednoznacznie pokazano, że oddziaływanie między Isu1, a Pim1 jest specyficzne, ponieważ w odróżnieniu od delecji  $\Delta pim1$  delecja innych proteaz nie zatrzymała degradacji. W doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkiego LONP1 także obserwowano równie skuteczną degradację ScIsu1. Do analiz *in vitro* zostało wykorzystane ludzkie białko LONP1 ze względu na trudności w oczyszczeniu aktywnego preparatu drożdżowego Pim1 (Ciesielski i wsp., 2016). Wszystkie proteazy Lon do swojego działania wymagają obecności ATP oraz jonów  $Mg^{2+}$ , gdy się te dwa składniki usunie to LONP1 nie jest w stanie degradować Isu1. Podobnie brak degradacji obserwowano, kiedy zastosowano zmutowany wariant LONP1<sup>S855/A</sup>, w przypadku tego wariantu wprowadzona substytucja dotyczy katalitycznej seryny w centrum aktywnym enzymu (Shin i wsp., 2021). Gdy zamiast ludzkiego LONP1 zastosowano w eksperymentach *in vitro* ortolog z *Escherichia coli*, to wydajność degradacji ScIsu1 była niższa, niemniej degradacja białka drożdżowego postępowała. Podobnie jak w przypadku wersji eukariotycznej, bakteryjny ortolog Lon nie jest w stanie działać, gdy brakuje w mieszaninie reakcyjnej ATP i jonów  $Mg^{2+}$ . Dalsza analiza mutantów drożdży *S. cerevisiae* wykazała, że delecja niektórych składników systemu biogenezy FeS powoduje akumulację Isu1. Przykładem jest delecja  $\Delta ssq1$ . Dlaczego tak się dzieje? Kluczowa może tu być rola białek Nfs1 i Hsc20. Zależnie od dostępności składników pozwalających się na formowanie centrów FeS, cząsteczki Isu1 mogą być mniej lub bardziej związane z Nfs1 i/lub Hsc20. Przy braku Ssq1 nie mogą być uwolnione z kompleksu, który tworzą z jednym z tych dwóch białek, a nieprzerwane oddziaływanie chroni przed degradacją przez Pim1. Ten wniosek może potwierdzić obserwacja, że w przypadku obecności w komórkach *S. cerevisiae* wariantu Hsc20 defektywnego w oddziaływaniu z „molekularnym rusztowaniem”, to widać akumulację Isu1 jak w próbie z delecją Ssq1. Prawdopodobnie Isu1 pozostaje trwale związane z desulfurazą cysteinową Nfs1(Isd11), która chroni je przed degradacją, a z kolei zmutowane białko Hsc20 nie jest w stanie przekazać Isu1 do białka Ssq1 które następnie uwolniłoby je z kompleksu, jednocześnie narażając na proteolizę. Gdy w środowisku mitochondrium zawierającego tylko ten zmutowany wariant Hsc20, nastąpi wyczerpanie się zapasu Nfs1(Isd11), końcowym efektem będzie proteoliza Isu1. Co istotne aktywność desulfurazy cysteinowej nie jest konieczna, liczy się sam fakt oddziaływania Nfs1(Isd11) z Isu1. Gdy w drożdżach był obecny wariant Hsc20 defektywny w oddziaływaniu Isu1 oraz wariantu Nfs1<sup>C421/A</sup>(Isd11 WT) który charakteryzował się brakiem aktywności desulfurazy cysteinowej, białko Isu1 było stabilnie chronione (Song i wsp., 2012). Natomiast w warunkach *in vitro* gdy w reakcji jest nieobecny kompleks Nfs1(Isd11), jedyną opcją ochrony przed proteolizą pozostaje utworzenie kompleksu z Hsc20. Jeśli w mieszaninie reakcyjnej było białko Hsc20 WT, chroni ono wtedy Isu1 przed proteolizą przez ludzki Lon. Jednakże gdy zastosowano mutant Hsc20<sup>L105,L109,Y163/AAA</sup> niezdolnego do oddziaływania z Isu1, wtedy Isu1 było efektywnie degradowane przez LONP1. Podobnie obecność w mieszaninie reakcyjnej dzikiego wariantu Nfs1(Isd11) w pełni chroni Isu1 przed degradacją, natomiast zastosowanie mutantu Nfs1<sup>L479,M482/AA</sup>(Isd11 WT) zapewnia tylko częściową ochronę Isu1 przed proteolizą Isu1 przez LONP1.

Tak więc na tym etapie analizy pojawia się pytanie o miejsce w obrębie Isu1, które jest rozpoznawane przez Pim1 i ludzki ortolog? Okazało się, że zmutowanie motywu LVF w białku Isu1 przez wprowadzenie substytucji serynowych jedynie nieznacznie spowalnia proteolizę. Zatem ten wynik sugeruje, że proteazy rozpoznają inne miejsca w obrębie Isu1. Dotychczasowa literatura, w oparciu o doświadczenia *in vivo*, wskazuje, że w obecności w

pełni sprawnego systemu biogenezy centrów FeS proteoliza postępuje szybko, gdyż białko Hsp70 szybko uwalnia Isu1 lub jego ortologi z kompleksów białkowych. Niemniej pojawiło się kolejne pytanie co się stanie gdy po hydrolizie ATP w warunkach *in vitro* nie będzie możliwości wymiany ADP na ATP, a zatem uwolnienia substratu białkowego? Gdy do kompleksu podwójnego bakteryjnych białek HscA (Hsp70) i IscU (substrat) dodano bakteryjną proteazę z rodziny Lon, degradacja IscU postępowała tak samo jak w przypadku reakcji zawierającej tylko białko IscU. To wskazuje, że białko Hsp70 samo nie jest w stanie ochronić substratu przed degradacją (Zakład Biochemii Ewolucyjnej, dane nieopublikowane).

Analiza dotycząca oddziaływania pomiędzy bakteryjnym białkiem HscA i IscU pozwoliła wytypować region w obrębie bakteryjnego białka IscU, który jest rozpoznawany przez bakteryjne białko Hsp70. Region ten obejmuje reszty L99, P100, P101, V102, K103 tworzące konserwowany motyw LPPVK białka IscU. Analizy filogenetyczne homologów bakteryjnego białka IscU oraz drożdżowego Isu1 jednoznacznie wskazały, że motyw PVK jest silnie konserwowany ewolucyjnie. Motyw ten jest zaangażowany w oddziaływanie z mtHsp70 - Ssq1 oraz w formowanie kompleksu z drożdżową frataksyną, białkiem Yfh1 (Manicki i wsp., 2014). W kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1 rejon białka Ssq1 wiążący motyw LPPVK białka Isu1 obejmuje resztę aminokwasową F462. Dotychczasowa literatura wskazuje, że reszta ta jest zaangażowana w oddziaływanie z resztą V135 motywu LPPVK białka Isu1 (Andrew i wsp., 2006). Przeprowadzony eksperyment precypitacji kompleksów białkowych, w którym wykorzystywałem zmutowaną wersję Isu1<sup>P134,V135,K136/AAA</sup>-GST nie obserwowałem formowania potrójnego kompleksu z białkami Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz Hsc20 w odróżnieniu do reakcji w której obecne było białko Isu1-GST typu dzikiego, które to efektywnie precypitowało się wraz z białkami Ssq1<sup>T239/A</sup> oraz Hsc20, tym samym tworząc kompleks potrójny obejmujący Ssq1:Hsc20:Isu1.

Co ciekawe, motyw PVK w obrębie Isu1 jest również zaangażowany w interakcję Isu1 z drożdżową frataksyną, która jest wymagana na etapie syntezy centrum FeS. Tak więc ponownie mamy sytuację, jak w przypadku konkurencji pomiędzy Hsc20 i desulfurazą cysteinową, kiedy ten sam motyw w obrębie Isu1 jest rozpoznawany przez komponent wczesnej fazy biogenezy centrum FeS -Yfh1, jak i białko działające na późniejszym etapie – mtHsp70.

## 5.2 Strukturalne czynniki determinujące funkcjonalne oddziaływanie białka zawierającego domenę J Hsc20 z białkiem Ssq1 należącym do rodziny białek Hsp70

Poprzedni rozdział Dyskusji poświęciłem kwestii oddziaływania białek Hsp70 z substratami białkowymi, uwzględniając przy tym rolę białek pomocniczych zawierających domenę J. Niemniej wciąż bez odpowiedzi pozostawiłem pytanie o rolę bezpośredniego oddziaływania między białkami zawierającymi domenę J, a białkami Hsp70?

Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na udział dwóch motywów w obrębie białek J, które determinują oddziaływanie z białkami Hsp70. Pierwszym motywem jest motyw HPD (Kampinga i Craig 2010, Mayer 2013, Delewski i wsp., 2016, Dutkiewicz i wsp., 2017), a drugim RKRK (Delewski i wsp., 2016, Kityk i wsp., 2018).



Pionierskie badania białek zawierających domenę J (JDP, ang. *J-Domain containing Proteins*) dotyczyły bakteryjnego białka DnaJ. To od nazwy tego białka pochodzi nazwa domeny J. Wyniki tych badań pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu, w oparciu o który białko DnaJ jest w stanie stymulować aktywność ATPazową Hsp70 (Laufen i wsp., 1999). Kolejnych przełomowych informacji dostarczyły doświadczenia, które pozwoliły na uzyskanie kryształów domeny NBD Hsc70 połączonych mostkami disiarczkowymi z domeną J auksyliny (Jiang i wsp., 2007). Okazało się, że mechanizm oddziaływania białek opiekuńczych Hsp70 z domeną J pomocniczego białka opiekuńczego jest silnie konserwowany. Jednocześnie mimo silnej konserwacji domeny J, między różnymi klasami białek zawierających domenę J nie ma uniwersalnej konserwacji domeny C-końcowej. Domeny C-końcowe poszczególnych białek potrafią znacznie się różnić, a część klas w ogóle nie posiada domeny C-końcowej, Drożdżowe białko Hsc20, które było przedmiotem mojej analizy, jest dość klasycznym reprezentantem klasy białek zawierających domenę J i reprezentuje ledwie ułamek białek należących do rodziny białek zawierających domenę J, która obejmuje wiele odmiennych białek zawierających domenę J (Kampinga i Craig 2010).

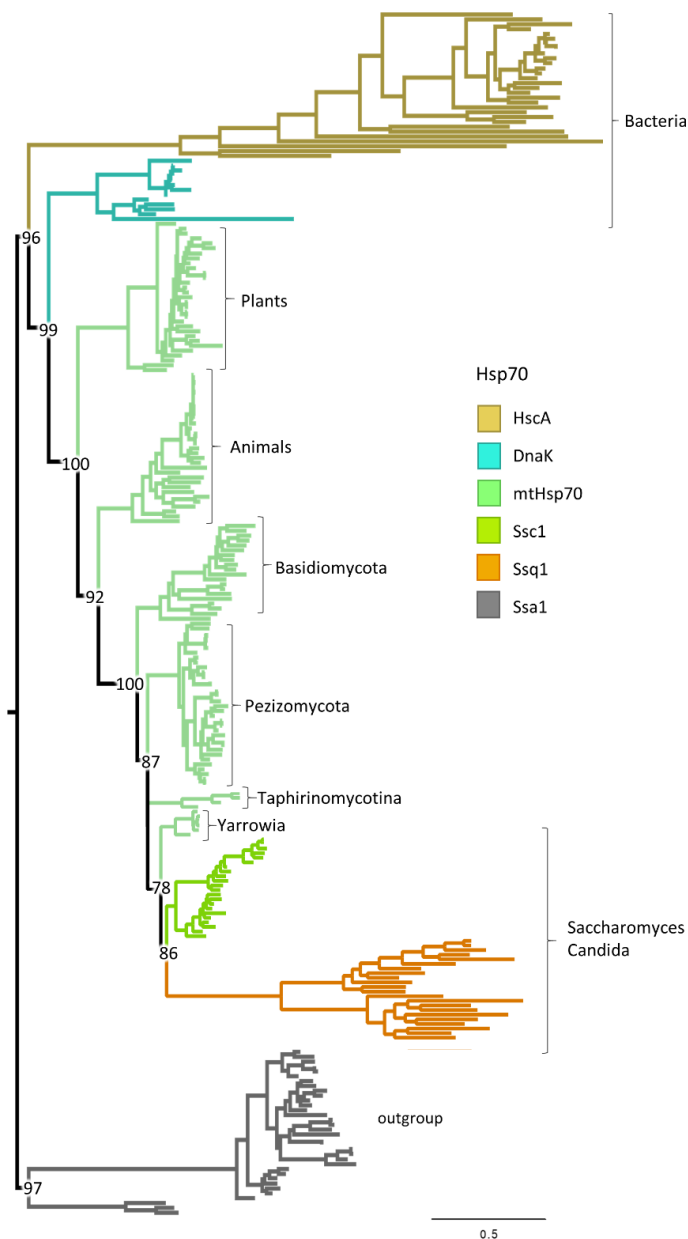
Kluczowa domena J zawiera cztery antyrównoległe  $\alpha$ -helisy ułożone w kompaktową dwuskrotną strukturę. Dwie z tych  $\alpha$ -helis, nazwane odpowiednio helisą H2 i H3, są połączone elastycznym łącznikiem w postaci pętli z zawsze konserwowanym motywem HPD, te trzy elementy razem tworzą strukturę palca (Dutkiewicz i wsp., 2017). Motyw ten jest niezbędny do oddziaływania z Hsp70. W przypadku drożdżowego białka Hsc20 współpracuje ono z dedykowanym białkiem z rodziny Hsp70, z Ssq1. Niemniej białko Hsc20 zachowało również zdolność do oddziaływania z mitochondrialnym wielofunkcyjnym Hsp70 - białkiem Ssc1. Domena J białka Hsc20 bezpośrednio oddziałuje z domeną ATPazową białka Ssq1, w ten sposób stymulując aktywność ATPazową białka Ssq1, którego aktywność podstawowa jest bardzo niska. Interakcja domeny J z obecną w białkach Hsp70 domeną wiążącą nukleotyd (NBD) ma miejsce, kiedy białko Hsp70 przyjmuje otwartą konformację. Wówczas domena Hsp70 wiążąca substrat (SBD) oraz elastyczny łącznik są zacumowane do domeny NBD związanej z ATP (Mayer 2013). W ten sposób białka zawierające domenę J regulują aktywność ATPazową, tylko wtedy kiedy jest to wymagane. Jednakże jest to tylko jeden z wielu etapów regulacji tej aktywności. Hsc20 samo stymuluje aktywność Ssq1 jedynie w niewielkim stopniu. W celu pełnej stymulacji konieczna jest synergia białka zawierającego domenę J oraz białka będącego substratem dla danego Hsp70, w przypadku Ssq1 jest to Isu1. Białko zawierające domenę J wiąże się do NBD białka Hsp70 w stanie otwartej konformacji, gdy NBD i SBD są sprzężone i wpływa na strukturę NBD. Związanie substratu powoduje dalsze zmiany w konformacji NBD i końcowa konformacja NBD charakteryzuje się największym zoptymalizowaniem do wykonywania aktywności hydrolizy ATP (Delewski i wsp., 2016).

Analiza bioinformatyczna wskazuje na fakt, że miała miejsce koewolucja drożdżowego białka Hsc20 oraz dedykowanego do współpracy z nim białka Ssq1. Białko Ssq1 jest specyficzne pod tym względem, że jest produktem duplikacji genu kodującego mtHsp70. Często się zdarza, że duplikaty wykazują większą tolerancję na pojawiające się mutacje. Stąd też pojawiło się interesujące pytanie o zmiany jakie zaszły w obrębie partnerskiego białka J po pojawieniu się współdziałającego z nim białka Ssq1? Po procesie duplikacji mtHsp70 powstały dwa geny, które kodują odpowiednio wielofunkcyjne białko Ssc1 oraz białko Ssq1, które to stało się białkiem wyspecjalizowanym w procesie biogenezy centrów FeS. Analiza obu kopii mtHsp70 wykazała, że białko Ssc1 jest bardziej zbliżone do

ortologa tuż sprzed duplikacji, natomiast Ssq1 jest kopią w obrębie której doszło do znacznych zmian. Trzeba pamiętać, że przodkowie współczesnych gatunków drożdży nie zmienili się do współczesnych wersji skokowo. Obecnie mamy dobrze scharakteryzowany gatunek *Schizosaccharomyces pombe*, zwany drożdżami rozszczepkowymi ze względu na inny cykl rozwojowy w stosunku do *S. cerevisiae*, czyli drożdży pączkujących. Drożdże *Schizosaccharomyces pombe* należą do podtypu Taphirinomycotina w obrębie workowców (Ascomycota). Zarówno *S. pombe* i *S. cerevisiae* mają wspólnego przodka i ten wspólny przodek miał pojedynczą kopię mtHsp70. Po tym jak potomkowie tego przodka rozdzielili się na dwie linie rozwojowe, ta która doprowadziła do powstania współczesnego gatunku *S. pombe* zachowała cały czas pojedynczą kopię mtHsp70. Z pozostałą linią rozwojową było inaczej. Przez jakiś czas od oddzielenia się od wspomnianego przodka istniała pojedyncza kopia genu kodującego mtHsp70, lecz w pewnym momencie doszło do duplikacji genu *SSC1*, wydarzenia które nigdy nie wystąpiło w siostrzanej linii prowadzącej do *S. pombe*. Po tym jak nastąpiła duplikacja tego genu, konfiguracja dwóch kopii mtHsp70 została oddziedziczona przez wielu następców, w tym *S. cerevisiae* i co ciekawe nie ma w historii ewolucyjnej grzybów przypadku utraty drugiej kopii mtHsp70 (Ryc.63) (Delewski i wsp., 2016). Należy tu zadać pytanie, skoro *S. pombe* posiada pojedynczą kopię SpSsc1, która charakteryzuje się dużym podobieństwem do kopii mtHsp70 wspólnego przodka *S. pombe* i *S. cerevisiae*, natomiast u *S. cerevisiae* w proces biogenezy FeS jest zaangażowana mocno zmieniona kopia ScSsq1, to jak ten fakt wpływa na różnice we właściwościach biochemicznych współpracujących białek zawierających domenę J, odpowiednio SpHsc20 i ScHsc20?

W przypadku *S. pombe* białko SpHsc20 musi konkurować z innymi białkami zawierającymi domenę J o funkcjonalne oddziaływanie z wielofunkcyjnym białkiem SpSsc1. Wielofunkcyjność SpSsc1 oznacza przystosowanie do wykorzystywania jednego uniwersalnego mechanizmu oddziaływania z różnymi białkami zawierającymi domenę J, w związku z tym oddziaływanie z tymi poszczególnymi białkami J nie może być zbyt specyficzne. Natomiast u drożdży *S. cerevisiae* Hsc20 jest jedynym białkiem zawierającym domenę J, które oddziałuje głównie z białkiem Ssq1. Tak więc możliwe jest pojawienie się dodatkowych mechanizmów oddziaływania o dużej specyficzności wyłącznie dla tego układu, które to dodatkowo wspierają oddziaływanie Hsc20-Ssq1, które zachodzi głównie w oparciu o mechanizm wykorzystujący oddziaływanie motywu HPD białka Hsc20 z odpowiednimi resztami w obrębie Ssq1. Ta hipoteza została zweryfikowana poprzez doświadczenia *in vivo*, które pokazały, że o ile delecja poszczególnych homologów Hsc20 jest w przypadku obu gatunków drożdży śmiertelna dla komórek, to już wprowadzenie pojedynczych substytucji alaninowych w motywie HPD wywiera inny efekt w obu gatunkach. Komórki *S. cerevisiae* z wprowadzonymi mutacjami w rejonie HPD (w białku ScHsc20 reszty motywu HPD zlokalizowane są odpowiednio w pozycjach 48, 49 i 50) charakteryzowały się mocno spowolnionym wzrostem w temperaturze 30°C, a w temperaturze 37°C nie tworzyły kolonii. Tymczasem mutanty *S. pombe* z pojedynczymi substytucjami w motywie HPD (w białku SpHsc20 motyw HPD zajmuje pozycje 98, 99 i 100) nie tworzyły kolonii w żadnej temperaturze. Na kolejnym etapie zbadano w doświadczeniach *in vitro* efekty mutacji w obrębie motywu HPD białka ScHsc20 poprzez pomiar stymulacji aktywności mtHsp70. W przypadku ScHsc20 okazało się że pojedyncze mutacje w motywie HPD prowadziły do poważnych zaburzeń w stymulacji ATPazy ScSsq1. Tymczasem w przypadku SpHsc20 analogiczne pojedyncze mutacje miały jeszcze bardziej dramatyczny efekt, ponieważ żaden z mutantów w motywie HPD nie stymulował białka Hsp70 z *S.pombe*. Tak więc te wyniki

sugerują, że u drożdży *S. cerevisiae* istnieją dodatkowe mechanizmy determinujące oddziaływanie ScHsc20-Ssq1, które mogą kompensować efekty mutacji w obrębie motywu HPD (Delewski i wsp., 2016).



**Ryc.63 Dystrybucja filogenetyczna Hsp70 w proteomach eukariotycznych**

Bakterie wykorzystują dedykowane białko *HscA* w procesie biogenezy *FeS*. U podstawy linii rozwojowej Eukariotów doszło do utraty *HscA* i rolę przejęły białka wywodzące się z *DnaK*. Następnie u przodka *Candida* i *Saccharomyces* doszło do duplikacji *mtHsp70*, prowadząc do powstania białka *Ssq1* wyspecjalizowanego w biogenezie *FeS* (Delewski i wsp., 2016).

Aby zweryfikować tą hipotezę przeprowadzono analizę bioinformatyczną, przeprowadzając analizę dynamiki molekularnej (MD) z użyciem pola siłowego CHARMM36 (Huang i MacKerell 2013) w GROMACS (Van Der Spoel 2005). Głównym celem tego doświadczenia była próba zidentyfikowania dodatkowego rejonu w obrębie białka Hsc20 z *S.cerevisiae*, który to jest zaangażowany w oddziaływanie z Ssq1. Ta analiza pozwoliła na wytypowanie dodatnio naładowanego obszaru wokół domeny J i na fragmencie

helisy H2 białka ScHsc20. Wytypowano reszty w obrębie H2 o największym dodatnim potencjale elektrostatycznym, odpowiednio K20, R35, R37, K38 i R41. W przypadku odpowiednika z *S. pombe* – białka SpHsc20 homologiczny region wykazywał niższy potencjał elektrostatyczny i stanowił mieszaninę punktów naładowanych zarówno dodatnio i ujemnie. Tak więc te wyniki sugerowały, że oddziaływania elektrostatyczne zachodzące między białkami *S. cerevisiae* mogą być odpowiedzialne za wstępną orientację białek przed właściwym oddziaływaniem białko-białko.

Kolejnym etapem była weryfikacja hipotezy w doświadczeniach *in vitro*. Na wstępie przygotowano odpowiedniego mutanta ScHsc20, który zawierał odpowiednie substytucje. Mutacje zostały tak dobrane by na poszczególnych pozycjach białka ScHsc20 znajdowały się ich homologiczne odpowiedniki z SpHsc20. Jedynie pozycja K20 stanowiła wyjątek, ponieważ wprowadzono alaninę zamiast homologicznej glicyny z białka *S. pombe*. W ten sposób został zaprojektowany zmutowany wariant ScHsc20<sup>K20,R35,K38,R41/AASL</sup>. Okazało się, że białko to charakteryzowało się znacznie obniżonym powinowactwem do białka ScSsq1. Natomiast w kombinacji z pojedynczą mutacją w motywie HPD – H48/A, wariant ScHsc20<sup>K20,R35,K38,R41,H48/AASLA</sup> nie był zdolny do stymulacji aktywności ATPazowej białka Ssq1. Tak więc ta analiza wykazała, że odpowiednie reszty aminokwasowe w obrębie SpHsc20 wypadkowo dają razem efekt neutralny, a reszty ScHsc20 są wysoce zaadaptowane do zapewniania dodatkowego oddziaływania z ScSsq1. Między przodkiem, a gatunkiem współczesnym określona pozycja w sekwencji aminokwasowej mogła się zmieniać wielokrotnie. Przykładowo w pozycji 38 białka ScHsc20 znajduje się reszta K, a w homologicznej pozycji 88 SpHsc20 znajduje się S. Nie jest wiadomo jaka była reszta w homologicznej pozycji w białku Hsc20 wspólnego przodka *S. cerevisiae* i *S. pombe*. Ta nieznaną resztę nie uległa bezpośredniej zmianie do K w przypadku ScHsc20, zaś w przypadku SpHsc20 nie było bezpośredniej zmiany do S. Na etapach pośrednich prowadzących do współczesnego białka ScHsc20 w tej homologicznej pozycji skład aminokwasowy podlegał wielu zmianom, zanim w historii ewolucyjnej relatywnie niedawno doszło do mutacji na K, która to reszta pozostała do dziś. Analogicznie było w przypadku historii ewolucyjnej, której rezultatem jest obecność S w białku SpHsc20. W jednej z tych linii rozwojowych częstość substytucji mogła być większa. Choć *S. pombe* jest dobrym organizmem modelowym, to istnieją gatunki drożdży, które są bliżej spokrewnione z *S. cerevisiae*, a których wspólny przodek z *S. cerevisiae* znajduje się w punkcie czasu przed wydarzeniem duplikacji genu kodującego białko mtHsp70. Przykładem mogą być gatunki podlegające pod rodzaje *Yarrowia*, *Pezizomycota* i *Taphyromycota* (Ryc.63). W białkach Hsc20 i Ssc1 obecnych w tych organizmach substytucje poszczególnych reszt zdarzały się rzadziej, o czym świadczy mniejsza długość gałęzi na drzewie mtHsp70, niż substytucje reszt białek Hsc20 i Ssq1 obecnych w drożdżach podduplikacyjnych należących do rodzajów *Candida* i *Saccharomyces*. Kolejna kwestia, którą należy uwzględnić, jest to, że tempo substytucji może być wielopoziomowe. Przykładowo wielofunkcyjna kopia Ssc1 w drożdżach podduplikacyjnych ewoluowała szybciej, niż Ssc1 w drożdżach przedduplikacyjnych. Jednakże choć podduplikacyjne Ssc1 ewoluowały szybciej w stosunku do mtHsp70 z innych gatunków zawierających jedną kopię mtHsp70, to jednak jeżeli porównamy tempo ewolucji wielofunkcyjnej kopii Ssc1 w stosunku do kopii Ssq1 w tych samych podduplikacyjnych organizmach, to możemy zaobserwować, że tempo ewolucji Ssc1 było z kolei wolniejsze od tempa ewolucji Ssq1 (Delewski i wsp., 2016).

Kolejne bardziej precyzyjne analizy pokazały, że choć region złożony z reszt K20, R35, K38 i R41 jest istotnie kluczowy, to ciężar oddziaływania z Hsp70 jest prawdopodobnie przesunięty ku dalszym pozycjom i obejmuje motyw RKRK złożony z reszt R37, K38, R41 i K70.

W ramach przeprowadzonej analizy HDX-MS widać, że gdy Hsc20 jest w kompleksie potrójnym z Isu1 i Ssq1 to obserwowaliśmy widoczne usztywnienie domeny J wraz ze zwiększeniem protekcji zarówno helisy H2 z motywem HPD oraz helisy H3.

Gdy zaś zamiast kompleksu potrójnego mamy Hsc20 jedynie w kompleksie podwójnym z Isu1, to wtedy motyw HPD i duże fragmenty domeny J nie podlegają protekcji, gdyż domena J nie jest zaangażowana w oddziaływanie między Hsc20, a Isu1. Dopiero przyłączenie Ssq1 powoduje wyraźną zmianę w poziomie protekcji tego regionu i prowadzi do jego stabilizacji. Większa protekcja domeny J świadczy o zaangażowaniu tego regionu w oddziaływanie z Ssq1, stabilizując sieć wodorowych. Podczas ekspozycji białka Hsc20 na deuter w obrębie pętli zawierającej motyw HPD dochodzi do błyskawicznej wymiany wodoru na deuter. Sytuacja diametralnie się zmienia, kiedy Hsc20 tworzy kompleks ze swoim partnerem Hsp70. Kiedy białko Hsc20 znajduje się w kompleksie z Isu1 i Ssq1, widać znaczną protekcję w większości regionów białka.

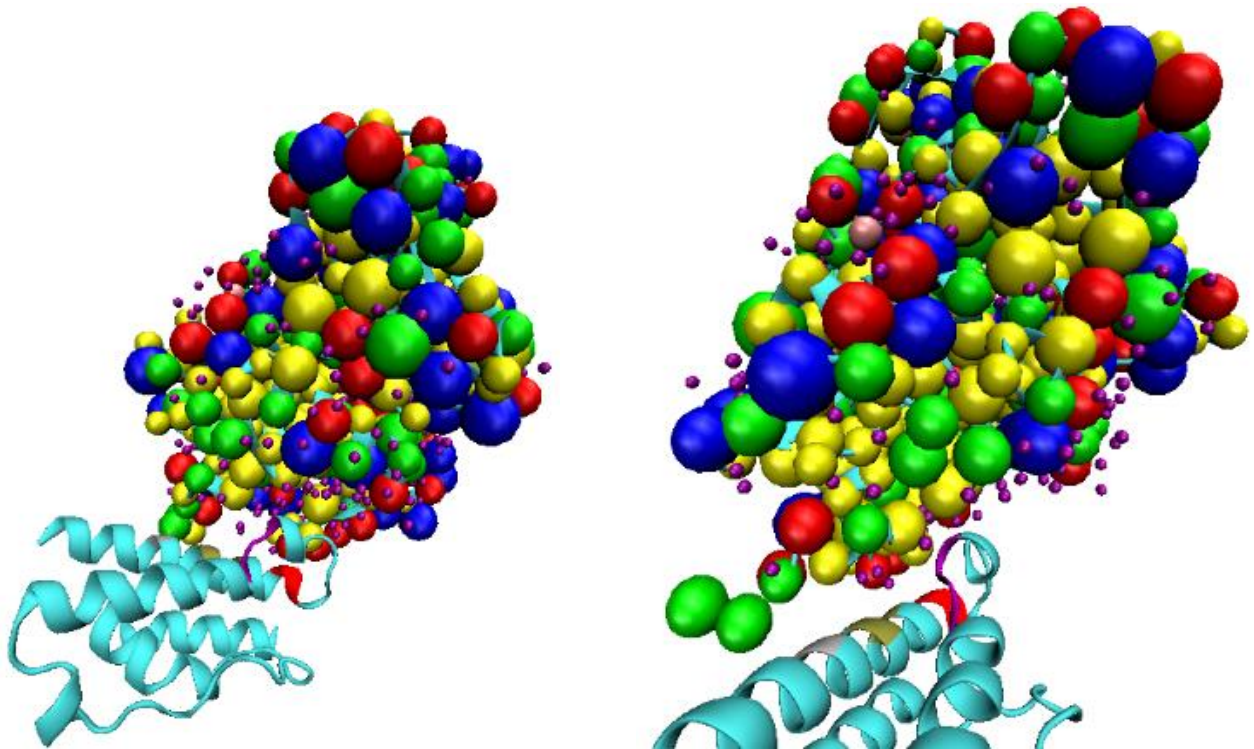
Szczególną uwagę podczas analizy wyników HDX-MS zwróciły regiony w obrębie domeny C-końcowej Hsc20, które ulegały protekcji jedynie w sytuacji oddziaływania z Ssq1. To pozwoliło na identyfikację nowych reszt w obrębie białka Hsc20 zaangażowanych w oddziaływanie z Ssq1. Uzyskane wyniki HDX-MS zasugerowały kolejne analizy bioinformatyczne, w ramach których zostały zidentyfikowane lizyny K132 i K172 w obrębie domeny C-terminalnej Hsc20. Po oczyszczeniu wariantów Hsc20 przeprowadzona analiza dichroizmu kołowego pokazała, że obie mutacje K132/A i K172/A nie wpływają na strukturę drugorzędową białka. Podobnie uzyskane krzywe topnienia dla mutantów białka Hsc20 mają przebieg bardzo podobny jak przebieg topnienia białka typu dzikiego Hsc20 WT, tak więc obie mutacje nie wpływają na stabilność białka. Z kolei doświadczenia precypitacji kompleksów białkowych jednoznacznie wykazały, że mutanty Hsc20<sup>K132/A</sup> i Hsc20<sup>K172/A</sup> charakteryzują się obniżoną zdolnością do oddziaływania z Ssq1, natomiast wariant Hsc20<sup>K132,K172/AA</sup> nie oddziaływał z Ssq1. Tak więc te doświadczenia jednoznacznie potwierdziły rolę reszt K132 i K172 w tworzeniu kompleksu z Ssq1. Zmutowanie tych reszt daje efekt zbliżony do tego obserwowanego gdy wprowadzimy mutacje w obrębie motywu HPD białka Hsc20.

Tak więc analizowany region domeny C-końcowej białka Hsc20 jest istotny nie tylko w oddziaływaniu z substratem, ale także w oddziaływaniu z Ssq1. Tutaj też pojawia się pytanie dlaczego tak jest? Jaki może być mechanizm leżący u podstaw oddziaływania domeny C-końcowej Hsc20 z białkiem Hsp70?

Dotychczasowa literatura przedstawia obszerną analizę oddziaływania bakteryjnego ortologa DnaK z białkiem DnaJ należącym do rodziny białek J, jak również pozwala na wytypowanie określonych reszt w obrębie białka Hsp70, które są zaangażowane w to oddziaływanie. Dane te uzyskano między innymi w ramach doświadczeń, które polegały na przeprowadzeniu sieciowania chemicznego białka DnaK z DnaJ. W jednym z takich eksperymentów resztę Q424 białka DnaK w domenie SBD poddano substytucji na cysteinę. W obecności wysokiego stężenia DnaJ i obecności ATP obserwowano wydajne tworzenie się

kompleksów Hsp70-białko J. Jednakże dodanie peptydowego substratu zmniejsza wiązanie się DnaJ do DnaK. Ta obserwacja sugerowała, że wiązanie się DnaJ do reszty Q424 nie jest fizjologicznym oddziaływaniem DnaK i DnaJ prowadzącym do stymulacji aktywności ATPazowej. Okazało się, że w tym eksperymencie białko DnaJ nie pełniło roli typowej dla białek typu J, ale zaczęło funkcjonować jako substrat niezgodnie ze swoją funkcją (Laufen i wsp., 1999).

Kolejnym przykładem doświadczeń, których celem była analiza oddziaływania Hsp70-białko zawierające domenę J są eksperymenty dotyczące oddziaływania bydłeczych białek Hsc70 i auksyliny, która jest homologiem DnaJ. Uzyskane wyniki pokazały, że domena J auksyliny jest związana wewnątrz wgłębienia między płatem IA oraz IIA w obrębie domeny NBD Hsc70. Bardziej precyzyjna analiza wykazała, że domena J oddziałuje z resztami Hsc70 zlokalizowanymi w obrębie łącznika białka Hsc70, który to łączy domeny Hsc70 oraz z resztami wgłębienia zlokalizowanymi blisko łącznika. W bydłeczej auksylinie reszty motywu HPD przypadają odpowiednio na pozycje H874, P875 i D876 (struktura przedstawiona na Ryc.64 w pozycji 876 posiada substytucję na cysteinę, która to była wymagana w doświadczeniach chemicznego sieciowania auksyliny z Hsc70). Pierścień imidazolowy reszty H874 auksyliny tworzy wiązania wodorowe z grupą karbonylową reszty L170 białka Hsc70, podobnie reszta D896 auksyliny tworzy wiązania wodorowe z resztą S385 białka Hsc70. W przypadku reszt H874, P875 i F891 auksyliny oddziaływania o charakterze hydrofobowym determinują ich kontakt z resztami L380 oraz I379 białka Hsc70. Główny i boczny łańcuch reszty V388 białka Hsc70 są dopychane w pobliżu reszty M892 i M889 auksyliny. Natomiast C-terminalna część pętli łączącej helisę H2 z H3 (reszty 878-885) i alifatyczne elementy łańcuchów bocznych reszt E884 i Q885 są dopychane względem łańcucha bocznego I216 białka Hsc70 (Jiang i wsp., 2007). Wprowadzenie mutacji w obrębie fragmentu łącznika białek Hsc70 i DnaK redukuje lub eliminuje stymulację aktywności ATPazowej przez domenę J (Laufen i wsp., 1999). Mutacje reszt Hsc70 V388, L393 oraz I216 powodują redukcję wiązania auksyliny (Jiang i wsp., 2005). Z tych mutantów najbardziej dramatyczny wpływ na zaburzenie wiązania auksyliny mają mutanty wielokrotne mające we wszystkich przypadkach zmutowaną resztę I216. Dodatkowo podczas wcześniejszych badań dotyczących białka DnaK zidentyfikowano reszty R167, N170, T173 (ich odpowiednikami w Hsc70 są reszty R171, N174, T177) odpowiedzialne za oddziaływanie z DnaJ (Suh i wsp., 1998). Homologiczne reszty w obrębie Hsc70 są także resztami, które za pośrednictwem cząsteczek wody tworzą sieć rozległych wiązań wodorowych obejmujących reszty T879 i E884 domeny J auksyliny (Jiang i wsp., 2007).



**Ryc.64 Model kompleksu bydłeczego białka Hsc70 w formie związanej z ADP, usieciowanego z fragmentem bydłeczej auksyliny zawierającym motyw HPD**

*Struktura białka Hsc70 w kompleksie z auksyliną (PDB ID: 2QWP). Struktura Hsc70 została przedstawiona w formie sfer z resztami aminokwasowymi pokolorowanymi według właściwości biochemicznych.*

*Odpowiednio czerwonym kolorem oznaczone są reszty aminokwasowe kwasowe (D, E), niebieskim zasadowe (R, H, K), żółtym niepolarne (A, G, I, L, M, F, P, W, V, C), zielonym polarne (N, Q, S, T, Y). Z kolei fragment bydłeczej auksyliny został przedstawiony jako wstążki. Pozycje 874-876 odpowiadające motywowi HPD (w tej strukturze reszta D876 została poddana substytucji na cysteinę w celu utworzenia mostka białko-białko) zostały pokolorowane na fioletowo. Reszta D896 została zaznaczona kolorem srebrnym. Reszty M889 i M892 zostały zaznaczone kolorem oliwkowym. Reszty E884 i Q885 zostały zaznaczone kolorem czerwonym.*

Mutanty Hsc70<sup>L380/G</sup> oraz Hsc70<sup>I216/T</sup> charakteryzowały się defektem w wiązaniu auksyliny i nie obserwowano stymulacji aktywności ATPazowej Hsc70. Mutanty zawierające substytucje w łączniku międzydomenowym czyli Hsc70<sup>V388/C</sup> oraz Hsc70<sup>L393/C</sup> także wykazywały defekt, lecz bardzo wysokie stężenia auksyliny pozwalały na kompensację zaburzonej stymulacji. Stymulacja aktywności ATPazowej zachodzi poprzez oddziaływanie łącznika międzydomenowego z domeną NBD. Rolą domeny J białek JDP jest stabilizacja tego oddziaływania łącznika z domeną NBD w przypadku białek rodziny Hsp70. Łącznik Hsp70 przesuwa domenę J, co w następnej kolejności fizycznie przesuwa  $\gamma$ -fosforan cząsteczki ATP w stronę katalitycznej reszty znajdującej się w obrębie domeny NBD, w przypadku Hsc70 jest to E175. Wprowadzenie mutacji E175/S zapobiega tej kaskadzie wydarzeń, aktywność ATPazowa takiego mutantu nie jest stymulowana przez domenę J. Dodatkowo białko JDP odpycha domenę SBD białka Hsc70 w celu interakcji. Wbrew utartemu modelowi po rozpięciu domen Hsp70 w stanie związanym z ADP oraz bez nukleotydu, okazuje się, że rozpięte domeny nie działają w odosobnieniu, sporadyczne przejściowe interakcje modulują funkcjonowanie białka (Jiang i wsp., 2007).

Choć rozważania dotyczące oddziaływania bakteryjnego białka DnaJ z resztą Q424 białka DnaK okazały się fałszywym tropem, to kolejne eksperymenty pokazały, że



podejrzenia odnośnie interakcji DnaJ z domeną SBD DnaK nie były nieuzasadnione. Między domeną J białka DnaJ, a domeną C-kończową znajduje się region GF oraz palec cynkowy. Region GF zgodnie ze swoją nazwą bogaty jest w reszty glicyny i fenyloalaniny. Okazuje się, że gdy DnaK znajduje się w konformacji związanej z ADP, region GF białka DnaJ dynamicznie oddziałuje z domeną SBD białka DnaK. W takim stanie związanym domena C-terminalna DnaJ porusza się dosyć swobodnie wokół domeny SBD, w przypadku obecności trzeciego komponentu jakim jest substrat ta elastyczność DnaJ potencjalnie może pomagać w odpowiednim zorientowaniu substratu względem DnaK. Domena J przemieszcza się wzdłuż powierzchni regionu subdomeny IIA NBD białka DnaK obejmującego pozycje 206-221 o sekwencji EIDEVDGEKTFEVLAT. Ten region zawiera wiele ujemnie naładowanych reszt, które mogą oddziaływać z dodatnio naładowanymi resztami helisy H2 domeny J. Tak więc ten fragment białka ma wpływ na wiązanie DnaJ zarówno, gdy DnaK jest w konformacji związanej z ATP oraz konformacji związanej z ADP (Ahmad i wsp., 2011).

Analiza NMR dotycząca bakteryjnego systemu białek opiekuńczych HscA-HscB wyspecjalizowanego w biogenezie centrów FeS także pokazała, że motyw HPD w obrębie białka HscB umożliwia wiązanie się do HscA związanego z ATP. Doświadczenia te jednocześnie wykazały, że reszty 153-171 znajdujące się w domenie C-końcowej białka J-HscB są w stanie oddziaływać z HscA niezależnie od tego czy nukleotyd jest wiązany przez Hsp70 - HscA oraz jaki jest to nukleotyd. Podczas doświadczeń NMR, których celem było zbadanie oddziaływania pomiędzy HscB i zmutowanym wariantem HscA<sup>T212/V</sup> (jest to mutant niezdolny do hydrolizy ATP, odpowiednik wykorzystywanego w moich badaniach mutanta Ssq1<sup>T239/A</sup>) obserwowano poszerzenie szczytów (pozytywny sygnał) poza detekcję dla wielu reszt, co świadczyło o ich potencjalnym zaangażowaniu w interakcję z HscA. Wśród nowych reszt aminokwasowych, które mogą być zaangażowane w oddziaływanie z HscA, zidentyfikowano także reszty znajdujące się poza rejonem obejmującym fragment 153-171 (D155, K156, R158, A161, Q163, E166 i L169). Na przykład pozytywny sygnał zaobserwowano także dla reszty R152. Niemniej sygnał dla tych reszt nie był tak silny jak sygnał obserwowany w przypadku reszt H32, P33, D34. Podsumowując w oparciu o doświadczenia przeprowadzone dla systemu HscA-HscB, możemy wywnioskować, że miejsca oddziaływania w domenie C-końcowej HscB są niewystarczające do samodzielnego oddziaływania z HscA, gdy HscA jest związane z ADP lub jest bez nukleotydu. Natomiast kiedy HscB wiąże się do HscA związanego z ATP ma to miejsce przede wszystkim w oparciu o mechanizm wiązania wykorzystujący domenę J, z kolei dodatkowe miejsca oddziaływania w obrębie domeny C-końcowej dodatkowo wzmacniają oddziaływanie pomiędzy HscB i HscA. Kolejną kwestią jaką należy uwzględnić podczas analizy oddziaływania HscA i HscB jest substrat – białko IscU. Białko IscU, które jest homologiem drożdżowego Isu1, jest wiązane przez HscB poprzez reszty R87, L92, M93, L96, R99, E100, F153 (reszty L92, M93, F153 stanowią motyw LMF, który jest bakteryjnym odpowiednikiem drożdżowego motywu LLY białka Hsc20). IscU wiąże się do reszt HscB, które znajdują się blisko reszt wykorzystywanych przez to białko do wiązania HscA:ATP, konkretnie do reszt R152, D155, K156, R158 i Q163. Także więc można przypuszczać, że na strukturę kompleksu HscB:IscU może mieć istotny wpływ oddziaływanie z HscA:ATP. Ponadto analiza NMR pozwoliła na zbadanie jak HscB oddziałuje z izolowaną domeną NBD białka HscA (fragment obejmujący reszty 1-385). Zaobserwowano, że domena J nie oddziałuje z izolowaną domeną NBD, lecz to reszty aminokwasowe znajdujące się w obrębie domeny C-końcowej HscB oddziaływały z tym fragmentem HscA. Niemniej oddziaływanie izolowanej domeny NBD z samą domeną C-

końcówką HscB jest niewystarczająca do stymulacji aktywności ATPazowej. Tak więc te obserwacje sugerują, że nie można powiedzieć, że domena J wiąże się do statycznego punktu w jednej z domen HscA. Ponadto ten punkt nie stanowi pojedynczą resztą aminokwasową zawsze zdolną do oddziaływania z domeną J, niezależnie od zmian konformacyjnych HscA. Gdy HscA wiąże cząsteczkę ATP, następują zmiany konformacyjne i w obrębie struktury trójwymiarowej białka tworzy się miejsce wiązania domeny J białka HscB złożone z reszt aminokwasowych HscA znajdujących się w bardzo różnych pozycjach sekwencji aminokwasowej tego białka, które nie są ograniczone do jednej domeny (Kim i wsp., 2014). Wyniki wcześniejszych eksperymentów jednoznacznie wskazują, że bakteryjne białko DnaJ jest w stanie oddziaływać z subdomeną IIA NBD białka DnaK. Tak więc w przypadku analizy oddziaływania HscA-HscB może to być specyficzne przystosowanie HscA, gdyż region subdomeny IIA NBD białka DnaK pozwala na wiązanie DnaJ w stanie związanym z ADP (Ahmad i wsp., 2011).

Analizując dotychczasową literaturę, zadałem pytanie czy reszty K125, K132, K172 i D173 są resztami drożdżowego białka Hsc20, które stanowią odpowiedniki wcześniej opisanych reszt aminokwasowych domen C-końcowych bakteryjnych homologów Hsc20 i są rzeczywiście zaangażowane w oddziaływanie z mtHsp70? Potencjalnie dodatni charakter reszt K125, K132, K172 i D173 białka Hsc20 może być odpowiedzialny za powtarzające się pojawienie się takiego mechanizmu oddziaływania z Hsp70 (biorąc pod uwagę fakt, że Ssq1 nie jest spokrewnione z HscA) lecz wymaga to dodatkowej analizy.

Kolejną interesującą kwestią dotyczy z kolei regionu w obrębie Ssq1, który oddziałuje z resztami zidentyfikowanymi w obrębie Hsc20. Jedną z reszt białka Ssq1, która wchodzi w interakcję z motywem HPD jest reszta R207 białka Ssq1 (Tomiczek i wsp., 2020). Dodatni ładunek reszty R207 sugeruje, że wiąże się ona do ujemnie naładowanej reszty D50 białka Hsc20. Potencjalnie może dochodzić też do tworzenia wiązań wodorowych między tymi dwoma resztami. Ponadto przeprowadzone analizy bioinformatyczne wykazały, że ta sama reszta R207 białka Ssq1 tworzy wewnątrzcząsteczkowe wiązanie z resztą D517 w SBD- $\beta$  i D429 w łączniku. W przypadku związania białka Hsc20 wiązanie między R207, a D517 zostaje prawdopodobnie zerwane, a za to zostanie utworzone wiązanie między R207, a D50 białka Hsc20. W przypadku DnaK homologiczna reszta R167 (w bydlęcym Hsc70 jest to R171) oddziałuje z resztą D35 białka DnaJ. W DnaK ta konserwowana arginina razem z resztami N170 i T173 tworzą motyw RNT. Wprowadzenie substytucji alaninowych w pozycje 170 i 173 powoduje znaczne obniżenie wiązania DnaJ. Ponadto gdy DnaJ posiada mutację D35/N to wprowadzenie do DnaK mutacji R167/H przywraca oddziaływanie między tymi białkami (Suh i wsp., 1998). Z kolei analiza sekwencji Ssq1 wykazała, że zarówno arginina w pozycji 207, jak też pozostałe reszty motywu RNT, reszty N210 oraz T213, są konserwowane, co sugeruje, że byłoby niezwykle interesującym aby przeprowadzić bardziej złożone analizy, których celem byłoby zbadanie molekularnej roli tych reszt podczas oddziaływania z Hsc20 (Kityk i wsp., 2012).

Pomimo dużych postępów, wciąż pozostaje wiele pytań bez jasnych odpowiedzi. Czy w białku Ssq1 są reszty oddziałujące z resztami H48 i P49 białka Hsc20 na zasadzie oddziaływań hydrofobowych, tak jak to ma miejsce w przypadku reszt H874 i P875 bydlęcej auksyliny, które oddziałują w oparciu o interakcje hydrofobowe z resztami L380 oraz I379 znajdującymi się w obrębie bydlęcego białka Hsc70 (Ahmad i wsp., 2011)? To pytanie pozostaje bez odpowiedzi. Czy istnieje leucyna w obrębie białka Ssq1, której grupa

karbonylowa tworzyłyby wiązania wodorowe z pierścieniem imidazolowym reszty H48? Owszem, w pozycji 206 znajduje się konserwowana leucyna więc potencjalnie ta reszta mogłaby oddziaływać z resztą histydynową białka Hsc20. Czy w łączniku międzydomenowym Ssq1 jest odpowiednik bydlęcej reszty L393, a w domenie NBD odpowiednik I216? Potencjalnie odpowiednikiem I216 może być w drożdżowym białku Ssq1 reszta V251. Bydlęcy fragment 201-219 białka Hsp70 o sekwencji GGGTFDVSILTIEDGIFEV wykazuje podobieństwo do fragmentu Ssq1 236-254 o sekwencji GGGTFDISILDIEDGVFEV. Do tego izoleucyna oraz walina wykazują strukturalne podobieństwo, oba aminokwasy mają hydrofobowe łańcuchy boczne. Z kolei odpowiednikiem reszty L393 bydlęcego białka Hsc70 może być reszta L427 w drożdżowym Ssq1. Natomiast reszty D246 i E253 białka Ssq1 tworzą sieć oddziaływań z resztami R37 i R41 motywu RKRK białka Hsc20. Kolejne interesujące pytanie to, czy reszty D246 i E253 są spokrewnione z resztami fragmentu 206-221 o sekwencji EIDEVDGEKTFEVLAT, który znajduje się w subdomenie IIA NBD białka DnaK? Potencjalnym odpowiednikiem drożdżowej reszty E253 może być reszta E217 DnaK, a odpowiednikiem D246 reszta D208 DnaK. Dalsza analiza tego fragmentu wykazała, że w odróżnieniu do bydlęcego białka Hsc70, które posiada izoleucynę oraz drożdżowego Ssq1, które posiada walinę w homologicznej pozycji 215 białka DnaK znajduje się treonina. Tak więc w tym przypadku zamiast hydrofobowego łańcucha bocznego znajduje się łańcuch polarny. Należy jednak pamiętać, że oddziaływanie mtHsp70 z motywem RKRK jest względnie nowym mechanizmem który pojawił się dopiero w gatunkach drożdży, u których doszło do duplikacji genu kodującego mtHsp70 i dotyczy tej kopii genu, która koduje białko wyspecjalizowane w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych.

Następne pytanie, które możemy zadać to jak ten typ oddziaływania, wygląda u organizmów, które posiadają jedną kopię genu, który koduje mtHsp70? Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, że u drożdży *S. pombe* w przypadku białka SpHsc20 odpowiednikami reszt R37, K38 i R41 motywu RKRK białka ScHsc20 są odpowiednio reszty K87, S88 i L91. O ile między arginina w pozycji 37 ScHsc20 i lizyna w pozycji 87 SpHsc20 zachowany jest ten sam ładunek, w pozostałych wymienionych pozycjach nie ma korelacji wartości ładunku między ScHsc20, a SpHsc20. Niemniej jest to zgodne z przedstawionymi w literaturze doświadczeniami jednoznacznie pokazującymi, że w przypadku mutacji w motywie HPD, ten homologiczny region SpHsc20 nie zapewnia alternatywnego wiązania z SpSsc1, które mogłoby kompensować mutacje w obrębie motywu HPD (Delewski i wsp., 2016).

W związku z tym kolejnym interesującym pytaniem było pytanie dotyczące mitochondrialnego białka Hsp70 drożdży *S. pombe*, które posiadają jego jedną kopię, czy SpSsc1 posiada regiony charakterystyczne, które zostały wcześniej opisane dla wyspecjalizowanego białka Ssq1 drożdży *S. cerevisiae*? W białku ScSsq1 we fragmencie obejmującym reszty od 206 do 213 o sekwencji LRVINEPT odpowiednio znajduje się konserwowana reszta L206 potencjalnie oddziałująca z resztą H48 motywu HPD białka ScHsc20, następnie reszty R207, N210 i T213 konserwowanego motywu RNT. Natomiast w przypadku białka SpSsc1 homologiczny fragment obejmuje reszty od 214 do 221 o sekwencji LRVVNEPT, w którym reszta L214 SpSsc1 to odpowiednik L206 ScSsq1, a reszty R215, N218 i T221 SpSsc1 tworzą konserwowany motyw RNT. Ponadto fragment białka ScSsq1 obejmujący pozycje 236-254 o sekwencji GGGTFDISILDIEDGVFEV, zawiera istotne reszty D246, V251 i E253, które są zaangażowane w oddziaływanie z białkiem J. Homologiczny

rejon białka SpSsc1 obejmuje fragment 243-261 o sekwencji GGGTFDISILELNNGVFEV. W obrębie tego regionu znajdują się konserwowane reszty V258 i E260, lecz w pozycji 253 jest kwas glutaminowy zamiast kwasu asparaginowego. Niemniej mimo różnicy w tej pozycji nadal jest zachowany ujemny ładunek reszty. Także analiza białek Hsp70 znajdujących się w obrębie mitochondrii *Candida albicans* wykazała, że ujemnie naładowana reszta znajduje się w homologicznej pozycji. Tak więc te wyniki sugerują, że zostały zachowane podobne właściwości fizykochemiczne tego fragmentu Hsp70 nawet jeśli partner, czyli białko zawierające domenę J, nie ma typowego odpowiednika motywu RKRK. Podobnie analiza dotycząca bakteryjnego białka DnaK wykazała, że ma ono w homologicznych pozycjach takie same reszty aminokwasowe jak drożdżowe białko ScSsq1. Z kolei analiza bakteryjnego białka J - DnaJ wykazała, że w pozycji 22 znajduje się reszta argininy, w pozycji 23 lizyny i w pozycji 26 kolejnej lizyny. Tak więc jedyna różnica dotyczy pozycji R41 białka ScHsc20, w homologicznej pozycji białka DnaJ znajduje się reszta lizyny, niemniej zachowany jest ten sam dodatni ładunek w obu przypadkach. Natomiast w przypadku bakteryjnego białka HscB wyspecjalizowanego w biogenezie centrów FeS w homologicznych pozycjach znajdują się odpowiednio: seryna w pozycji 21, leucyna w 22, glutaminian w pozycji 25 czyli aminokwasy fizykochemicznie mocno odmienne od tych znajdujących się w drożdżowym motywie RKRK. Ponadto analizując sekwencję HscA w pozycjach 209-227 białka mamy fragment o sekwencji GGGTFDISILRLSRGVFEV, tak więc główna różnica jest taka, że w pozycji 219 znajduje się arginina, podczas gdy w homologicznej pozycji białka ScSsq1 jest D246. W związku z tym w rodzinie Hsp70 nie ma konserwacji kwasu asparaginowego w tej pozycji. Jednakże bardzo silnie konserwowany jest motyw VFEV w obrębie białek Hsp70, także w przypadku bakteryjnego białka HscA. Nie jest do końca jasne co jest przyczyną silnej konserwacji tego motywu. W Ssq1 fragment DIEDGVFEV oddziałuje z motywem RKRK białka ScHsc20 i wzmacnia to oddziaływanie między tymi białkami oprócz typowego mechanizmu wykorzystującego motyw HPD. W pozostałych białkach Hsp70 motyw VFEV także jest konserwowany, choć rejon otaczający ten motyw już niekoniecznie. Zatem pozostałe Hsp70 dzięki konserwacji motywu VFEV już zawniesu były częściowo przygotowane do oddziaływania z motywem RKRK choć ten dopiero później zaistniał w bardzo konkretnym przypadku jednego białka z dużej rodziny białek zawierających domenę J. Zatem gdy w przodku ScHsc20 pojawiły się mutacje, które doprowadziły do powstania motywu RKRK, były to mutacje zyskania funkcji (*ang. gain of function*). Utworzone zostało nowe miejsce wiązania i pojawienie się motywu RKRK w białku Hsc20 nadało nowe znaczenie resztom fragmentu DIEDGVFEV białka Ssq1, które już istniały u przodków Ssq1.

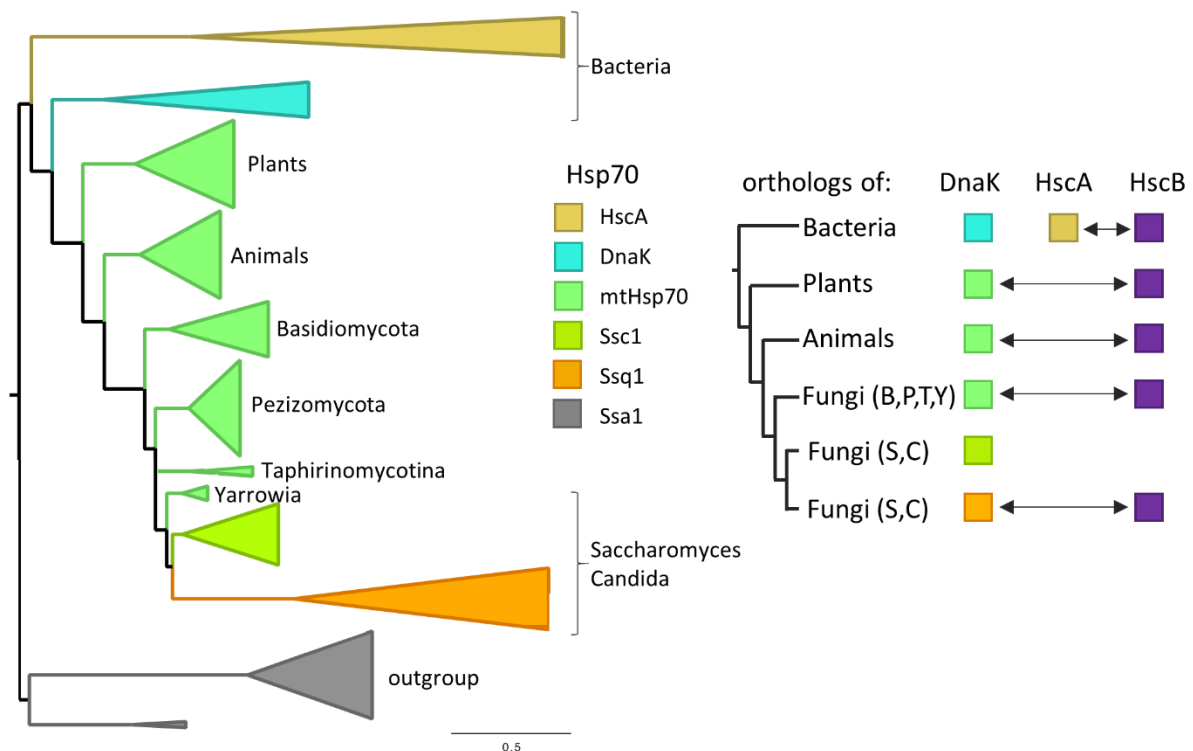
Reszty domeny C-końcowej białka Hsc20 zgodnie z wcześniej prezentowanym modelem znajdują się fizycznie blisko ujemnie naładowanych reszt D362 i D364 domeny NBD białka Ssq1. Analiza dynamiki molekularnej wskazuje, że reszta D364 domeny NBD białka Ssq1 może bezpośrednio oddziaływać z resztą R450 domeny SBD tego białka. Dotychczasowa literatura dotycząca analiz bakteryjnego białka DnaK sugeruje możliwość, że reszta D326 w obrębie domeny NBD DnaK może oddziaływać z resztą N415 znajdującą się w domenie SBD- $\beta$ . Aczkolwiek w doświadczeniach, w których wykorzystano mutant białka DnaK zawierającego substytucje tych reszt na cysteiny, nie zaobserwowano tworzenia się mostka disiarczkowego w obecności ATP i związku sieciującego (Kityk i wsp., 2012). Niemniej niepowodzenie eksperymentu *in vitro* nie wyklucza, że *in vivo* takie oddziaływanie zachodzi w *E. coli*. Wyniki moich doświadczeń precypitacji kompleksów białkowych pokazują bezpośredni wpływ reszty R450 na oddziaływanie Ssq1 z Hsc20. Gdy w

eksperymentcie zamiast dzikiego białka Ssq1, wykorzystałem jego zmutowany wariant z substytucją reszty R450 na alaninę, to obserwowałem znaczny spadek wiązania mutantu Ssq1 do kompleksu Isu1-GST:Hsc20. Moja wstępna hipoteza zakłada, że prawdopodobnie skutkiem defektu jest zaburzone oddziaływanie między resztą D364 białka Ssq1, a resztą K172, która znajduje się w obrębie białka Hsc20. W ramach proponowanego mechanizmu połączonego z hydrolizą ATP, początkowo reszta D364 oddziałuje z R450 Ssq1, spinając NBD z SBD- $\beta$ . Następnie reszta D364 przestaje oddziaływać z domeną SBD- $\beta$  białka Ssq1, a zaczyna oddziaływać z resztą K172 białka Hsc20. W ten sposób nawiązywane byłoby nowe wiązanie między Ssq1, a Hsc20, a dodatkowo rozpinane byłaby domena NBD od SBD. Dotychczasowa literatura w dość obszerny sposób opisuje reszty domeny J oraz reszty domeny C-końcowej białek J oddziałujących z białkami z rodziny Hsp70 oraz są opisane reszty domeny NBD Hsp70 oddziałujące z resztami domeny J. Niemniej brakuje doniesień literaturowych, które opisywałyby ewentualne reszty aminokwasowe domeny NBD Hsp70 (w przypadku eukariontów mtHsp70) oddziałujące z domeną C-terminalną białek J pochodzących w linii prostej od bakteryjnego białka HscB. Kolejna problematyczna kwestia to także brak literatury, która dyskutowałaby oddziaływanie białek J z domeną SBD- $\beta$  białek Hsp70. Jeśli reszta D326 bakteryjnego DnaK oddziałuje z N415 i zachowany jest mechanizm zgodnie, z którym to funkcjonuje białko Ssq1, to reszta N415 przenosiłaby swoje wiązanie z D326 na określoną resztę domeny C-końcowej DnaJ, która to nie została do tej pory zbadana. Tak więc jest możliwe, że reszta D326 białka DnaK również oddziałuje bezpośrednio z odpowiednikiem motywu KK w domenie C-końcowej białka DnaJ. Istnieją doniesienia literaturowe, które sugerują, że reszta D326 oddziałuje z domeną J białka DnaJ, nie wiadomo jednak czy to oddziaływanie jednocześnie wyklucza proponowane oddziaływanie reszty D326 z domeną C-końcową białka DnaJ (Ahmad i wsp., 2011). Historia ewolucyjna białek zawierających domenę J jest skomplikowana, nawet jeśli współczesne białko DnaJ odziedziczyło wiele cech po wspólnym przodku DnaJ i HscB, to presja ewolucyjna wywierana na HscB selekcjonowała te cechy, które dostosowywały białko do oddziaływania z HscA czyli z dość nietypowym białkiem Hsp70. Równocześnie białko to w trakcie ewolucji mogło utracić pierwotne cechy przodka. Prawdopodobnie jednocześnie gdy przodek mitochondriów utracił gen kodujący odpowiednik białka HscA, to pojawiła się presja na odpowiednik białka HscB, która mogła doprowadzić do ponownego przystosowania się do oddziaływania z odpowiednikiem DnaK. To z kolei mogło promować wykształcenie się nowych mechanizmów oddziaływania pomiędzy białkiem zawierającym domenę J i Hsp70, które nie występują w oddziaływaniu pomiędzy bakteryjnymi białkami DnaJ z DnaK. Dyskutowana kwestia jest niezmiernie interesująca i mogłaby stanowić podmiot kolejnego projektu badawczego.

### 5.3 Ewolucja systemu białek opiekuńczych oraz ich rola w procesie biogenezy centrów FeS

Wyniki mojej pracy dotyczące oddziaływania drożdżowych białek opiekuńczych z substratem wykazały podobieństwa w funkcjonowaniu tego układu do systemu białek bakteryjnych wyspecjalizowanych w procesie biogenezy FeS. Jedną z hipotez, która tłumaczyłaby te podobieństwa między układem bakteryjnym i drożdżowym, zakłada że miała miejsce zarówno konwergencja funkcjonalna, jak też w pewnym stopniu konwergencja biochemiczna. Aby zweryfikować tą hipotezę na wstępie przeprowadzono obszerną analizę bioinformatyczną.

Przeprowadzona analiza typu maksymalnego podobieństwa (*ang.* „*maximum likelihood*”) wykazała, że mtHsp70 jest bliżej spokrewnione z bakteryjnym DnaK niż HscA, zatem sekwencje HscA i mtHsp70 nie są monofiletyczne (Ryc.65). Za to mitochondrialne Hsp70 tworzą grupę monofiletyczną z DnaK pochodzącą z alfabroteobakterii, wskazując na ich endosymbiotyczne pochodzenie od przodka mitochondriów. Mitochondrialne Hsp70 tworzą wspólny kład obejmujący wielofunkcyjne mtHsp70 i wyspecjalizowane Ssq1. Zgrupowanie się razem Ssc1 i Ssq1 jest potwierdzeniem tezy, że Ssq1 powstało w wyniku duplikacji genu kodującego mtHsp70 u podstawy kładów *Saccharomyces* i *Candida* (Kleczewska i wsp., 2020).



### Ryc.65 Ewolucyjne zależności między bakteryjnymi i mitochondrialnymi systemami Hsp70 zaangażowanymi w biogenezę FeS

Analiza typu maksymalnego podobieństwa białek Hsp70 uczestniczących w biogenezie FeS. Dla uproszczenia drzewo zostało zakorzenione względem wspólnego przodka HscA i DnaK. Bakterie wykorzystują dedykowane białko HscA w procesie biogenezy FeS. W przypadku HscA jedynym białkiem zawierającym domenę J z nim współpracującym jest HscB. Tymczasem u bakterii białko DnaK pełni inne, bardziej ogólne funkcje. U podstawy linii rozwojowej Eukariotów doszło do utraty HscA i jego rolę przejęły białka wywodzące się z DnaK. Mimo utraty HscA, w przypadku eukariotycznych mtHsp70 wywodzących się z DnaK białkiem zawierającym domenę J niezbędnym w procesie biogenezy FeS, oddziałującym z mtHsp70, jest Hsc20, ortolog HscB. Następnie u przodka *Candida* i *Saccharomyces* doszło do duplikacji mtHsp70, co doprowadziło do powstania białka Ssq1 wyspecjalizowanego w biogenezie FeS. Strzałki na schemacie z prostokątami reprezentują funkcjonalne interakcje między poszczególnymi białkami u poszczególnych grup organizmów. Oznaczenia literowe oznaczają odpowiednio: B – Basidiomycota; P – Pezizomycotina; T – Taphirinomycotina; Y – Yarrowia; S – *Saccharomyces*; C – *Candida* (Kleczewska i wsp., 2020).

W następnej kolejności pojawiło się pytanie, jak podobne lub różne biochemicznie są oba białka Hsp70 wyspecjalizowane w procesie biosyntezy centrów FeS. Przeprowadzona analiza jednoznacznie wykazała znaczne podobieństwo biochemiczne obu systemów; mitochondrialnego Ssq1/Hsc20 oraz bakteryjnego HscA/HscB. Aktywności ATPazy obu

Hsp70 są stymulowane do porównywalnych poziomów przez współpracujące z nimi białko zawierające domenę J (Hsc20 / HscB) oraz substrat białkowy (Isu1 / IscU), niezależnie od tego, czy występują w niskich, bardziej istotnych fizjologicznie, czy bardzo wysokich stężeniach. Chociaż aktywność ATPazy w Ssq1 jest stymulowana w mniejszym stopniu niż w przypadku HscA, to wydajność układu Ssq1, mierzona jako stosunek  $k_{cat} / K_m$ , jest wyższa niż w układzie HscA, co sugeruje, że przy niskich stężeniach białka J i substratu wyspecjalizowany system mitochondrialny jest bardziej wydajny niż jego bakteryjny odpowiednik. To z kolei sugeruje, że niżej stymulowaną aktywność ATPazy obserwowaną dla układu Ssq1 można zrekompensować wyższym jego powinowactwem zarówno do Hsc20, jak i Isu1. Chociaż bezwzględne stężenia komórkowe białek tworzących oba układy białek opiekuńczych nie są znane, względne wartości dostępne w literaturze sugerują, że Ssq1 (183ppm) i Hsc20 (152ppm) są obecne w ilościach zbliżonych do równomolowych, w zakresie stężeń mikromolarnych; to samo dotyczy HscA (261ppm) i HscB (171ppm), dane ze źródła <https://pax-db.org/>. Zatem podobne właściwości biochemiczne tych dwóch wyspecjalizowanych układów, które obserwujemy, są najprawdopodobniej istotne fizjologicznie.

Miarę powinowactwa Hsp70 względem substratów zbadano także w doświadczeniach polegających na precypitacji kompleksów białkowych w obecności ADP. Hsp70 w stanie związanym z ADP wykazuje niskie tempo wymiany substratu zatem poziom wiązania w tym stanie jest dobrym wyznacznikiem powinowactwa. Przeprowadzono eksperymenty w ramach których miareczkowano stężenie danego Hsp70 w obecności stałego stężenia substratu. Zmierzona densytometrycznie intensywność sygnału białka Hsp70, które precypitowało z substratem pozwoliła wyznaczyć zależność oddziaływania danego Hsp70 z substratem w funkcji stężenia białka Hsp70. Przebieg zależności zarówno dla białek bakteryjnych, jak i drożdżowych był hiperboliczny, co umożliwiło dopasowanie do równania Michaelisa-Menten i wyznaczenie parametru  $K_m$ , który opisuje miarę powinowactwa danego białka Hsp70 do substratu. Ta analiza wykazała, że Ssq1 ma 6-krotnie większe powinowactwo do substratu niż bakteryjne HscA.

Miara powinowactwa Hsp70 do substratu jest prosta do zmierzenia, lecz znacznie trudniej jest zmierzyć powinowactwo do białka zawierającego domenę J ze względu na przejściowość oddziaływania tego białka z pozostałymi składnikami kompleksu. W tym przypadku powinowactwo Hsp70 do białka J udało się zmierzyć w sposób pośredni. W obecności ATP zmiana konformacji Hsp70 zachodzi w wyniku hydrolizy ATP, to z kolei powoduje, że białko zawierające domenę J ulega dysocjacji, a substrat wiąże się z bardzo wysoką wydajnością z białkiem Hsp70. Tak więc doświadczenia polegające na precypitacji kompleksów białkowych w obecności ATP, w których miareczkowano stężenie białka zawierającego domenę J pozwoliły zaobserwować wydajną stymulację formowania kompleksu Hsp70-substrat. Z kolei ta obserwacja pozwoliła na wyznaczenie zależności pomiędzy ilością Hsp70 precypitującego z substratem, a stężeniem białka J obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Przebieg zależności umożliwił dopasowanie uzyskanego wykresu do równania Michaelisa-Menten i tym samym na wyznaczenie wartości  $K_m$ , która opisuje powinowactwo Hsp70 do białka zawierającego domenę J. Ponownie Ssq1 wykazało większe powinowactwo, niemniej niewielka różnica między dwoma niskimi wartościami świadczy o tym, że w obu przypadkach interakcja między Hsp70, a białkiem J jest bardzo wydajna. Oba białka zawierające domenę J są w stanie w stężeniach poniżej stechiometrycznych wiązać się



efektywnie do Hsp70 i stymulować aktywność ATPazową tych białek (Kleczewska i wsp., 2020).

Dotychczas koncentrowaliśmy się na oddziaływaniach białek systemu Hsp70 i weryfikacji znaczenia tych oddziaływań w warunkach *in vivo* z zastosowaniem mutageny miejscowo specyficznej. Otrzymane wyniki oraz wyniki badań genetycznych i komórkowych innych zespołów wskazują, że białka opiekuńcze mitochondrialnego systemu Hsp70 są niezbędne dla transferu centrum FeS z białka rusztowania Isu1 na białka docelowe. Ponadto wcześniejsze analizy biochemiczne wykazały, że w obrębie białka Isu1 istnieją rejony, które są współdzielone pomiędzy białkami odpowiedzialnymi za syntezę centrum FeS (Nfs1/Yfh1) jak i za ich transfer do białek docelowych (Hsc20/Ssq1). Tak więc można zaproponować hipotezę, zgodnie z którą taka wyłączność wiązania z Isu1 może mieć funkcjonalne konsekwencje i odrywać istotną rolę podczas regulacji procesu biogenezy centrów FeS. Warto zwrócić uwagę na kwestię konserwacji reszt aminokwasowych zaangażowanych w oddziaływanie między Isu1, a Yfh1 oraz między Nfs1, a Yfh1. Z analizy 422 bakteryjnych genomów i 199 eukariotycznych wynika, że motyw PVK w obrębie białek pełniących funkcje „molekularnego rusztowania” takich jak drożdżowe Isu1 jest w 100% konserwowany. Natomiast w obrębie białek homologicznych do frataksyny konserwowany jest tryptofan, który w przypadku drożdżowego Yfh1 znajduje się w pozycji 131. Jedną z hipotez badawczych zakładała, że jest on odpowiedzialny za oddziaływanie z motywem PVK białka Isu1. Analiza eksperymentalna tej hipotezy poprzez precypitację kompleksów białkowych z wykorzystaniem białka fuzyjnego Yfh1-GST wykazała, że białko Yfh1 nie wiąże się do Isu1, ani do desulfurazy cysteinowej Nfs1(Isd11), natomiast białko to efektywnie oddziałuje z wcześniej uformowanym kompleksem Isu1-Nfs1(Isd11). Natomiast kiedy dziką wersję białka Yfh1 zastąpiono jego zmutowanym wariantem z substytucją reszty W131 na alaninę, to okazało się, że taki mutant posiada znacznie zredukowaną zdolność do tworzenia kompleksu z Isu1:Nfs1(Isd11). Ponadto taki mutant nie jest w stanie stymulować aktywności desulfurazy cysteinowej. Natomiast *in vivo* komórki zawierające Yfh1 z tą mutacją rosły wolniej. Analiza kompleksu Yfh1-Isu1-Nfs1(Isd11) pozwoliła także na wytypowanie reszt zaangażowanych w oddziaływanie Yfh1 z Nfs1. W przypadku białka Yfh1 z *S. cerevisiae* kluczowe role odgrywają reszty D86 oraz E89. W innych organizmach reszty te nie są bardzo silnie konserwowane, niemniej bardzo często zachowany jest ujemny ładunek reszt aminokwasowych. Za to w przypadku Nfs1 kluczowe są reszty R313, R316, R318, które są bardzo silnie konserwowane. Jedynie wybrane  $\alpha$ -proteobakterie mają lizynę zamiast argininy w pozycji homologicznej do 313 (Manicki i wsp., 2014). Warto też pamiętać, że choć pierwotnie wytypowano te trzy argininy w białku Nfs1 jako zaangażowane w wiązanie białka Yfh1, to kolejne eksperymenty pokazały, że te trzy reszty są także kluczowe w wiązaniu białka Yah1 (drożdżowa ferrodoksyna) przez Nfs1. Doświadczalnie pokazano, że potrójny mutant alaninowy Nfs1 ma znacznie obniżoną zdolność oddziaływania z Yah1 (Uzarska i wsp., 2022). Uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie hipotezy, która zakłada mechanizm zgodnie, z którym uwolnienie holo-Isu1 z kompleksu z Nfs1(Isd11) ma miejsce w wyniku działania białka Hsc20. Oddziaływanie Isu1 z Hsc20 może także inicjować dysocjację Yfh1, tym samym uwalniając miejsce PVK dla mtHsp70. Gdy Ssq1 zwiąże motyw PVK, białko Isu1 jest prawdopodobnie „chronione” przed ponownym wiązaniem Yfh1. Tak więc białka opiekuńcze mogą odgrywać rolę regulacyjną, kontrolując dostarczanie centrów FeS do białek akceptorowych.

Temat molekularnego mechanizmu syntezy centrum FeS w obrębie białka pełniącego rolę rusztowania jest dość mocno dyskutowany. Jednym z kluczowych pytań jest, czy reakcja syntezy jest inicjowana przez wiązanie żelaza, czy może siarki? Najnowsze badania sugerują, że pierwszym etapem biosyntezy jest związanie żelaza przez Isu1. W warunkach doświadczalnych monomeryczne mysie białko ISCU wiązało swobodne żelazo poprzez dwie cysteiny znajdujące się w miejscu aktywnym białka, odpowiednio C35 i C61, które to razem koordynowały żelazo. Wiązanie żelaza mocno zależało od pH i zastosowanego buforu. W buforze zawierającym Tris o pH 8.0 85% żelaza w roztworze było związane przez ISCU w stanie koordynowanym przez dwie cysteiny, a pozostałe 15% pozostało niezwiązane (Srouf i wsp., 2022). Niemniej wymagane są dalsze badania, aby zrozumieć dynamikę oddziaływania białka Isu1 w formie holo (z centrum FeS) i w formie apo (bez centrum FeS) z komponentami istotnymi dla syntezy centrum FeS, jak i jego transferu do białek docelowych.

Rola białek opiekuńczych w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych oraz mechanizm biochemiczny ich działania w tym procesie także stanowi wciąż pole do dyskusji wśród środowiska naukowego. Dotychczasowa literatura wskazuje, że prawdopodobnie pierwszym białkiem, do którego kierowane jest centrum FeS po jego rekonstrukcji w obrębie „molekularnego rusztowania” u drożdży *S.cerevisiae* jest białko Grx5. Drożdżowe białko Grx5 należy do licznej i dobrze udokumentowanej grupy monotiolowych glutaredoksyn z miejscami aktywnymi o sekwencji CGFS. Białka te wykazują niską aktywność oksydoreduktazy tiolowo-dwusiarczkowej zależnej od glutationu. Rolę glutaredoksyn w transferze centrów żelazo-siarkowych z Isu1 do białek docelowych wykazano między innymi w doświadczeniu, które polegało na tym, że komórki *S. cerevisiae* były znakowane radioaktywnym izotopem  $^{55}\text{Fe}$  *in vivo* i następnie po lizie komórek białko Isu1 izolowano za pomocą immunoprecypitacji z użyciem przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko Isu1. Podobną precypitację przeprowadzono w przypadku dwóch białek docelowych dla centrów FeS Yah1 i Bio2. Gdy w tym doświadczeniu wykorzystano szczep drożdży z delecją  $\Delta\text{grx5}$ , zaobserwowano dwukrotny wzrost ilości centrów FeS związanych z Isu1, natomiast ich dwu-, trzykrotny spadek w obrębie białek akceptorowych Yah1 i Bio2 (Mühlenhoff i wsp., 2003). Glutaredoksyny wiążą centra 2Fe-2S w taki sposób, że centrum FeS stanowi mostek łączący dwie podjednostki. Jest ono koordynowane przez cysteiny miejsc aktywnych poszczególnych podjednostek oraz przez dwie cząsteczki glutationu. W takim układzie centra FeS mogą zostać szybko przetransferowane do białek docelowych. Analiza biochemiczna przeprowadzona w oparciu o oczyszczone bakteryjne białka z *Azotobacter vinelandii* pokazała, że w obecności białek opiekuńczych HscA/HscB następuje bardzo wydajny, zależny od ATP transfer FeS z holo-IscU do apo-Grx5. Pomiar transferu centrów FeS wykonano z wykorzystaniem spektrometru dichroizmu kołowego. Pomiar był możliwy, ponieważ zarejestrowane widmo CD (*ang. circular dichroism*) białka Grx5 ze związanym centrum 2Fe-2S jest inne niż białka IscU w formie holo. Gdy w mieszaninie reakcyjnej znajdowało się tylko holo-IscU, apo-Grx5 i 3mM glutation, reakcja transferu zachodziła powoli. W ciągu 3h tylko 30% centrów FeS uległo transferowi. Natomiast po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej HscA, HscB, Mg-ATP i KCl, widmo IscU ulega pewnej zmianie z powodu wiązania HscA i HscB, ale również tempo wymiany drastycznie przyspiesza i w ciągu 6 min od dodania Mg-ATP obserwowano 100% transfer centrów FeS z IscU do Grx5. Tak więc tempo transferu zmieniło się z  $30 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  do  $20000 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ , co stanowi 700-krotny wzrost szybkości transferu. Natomiast gdy zamiast Grx5 mieszanina reakcyjna zawierała bakteryjną ferrodoksynę, wówczas zaobserwowano tylko 20-krotny wzrost

szybkości transferu w obecności białek opiekuńczych i ATP. Ten wynik sugeruje, że w warunkach fizjologicznych prawdopodobnie zamiast bezpośredniego transferu centrum FeS z IscU do apo-IscFdx, najpierw centrum FeS jest transportowane z IscU do Grx5, a następnie z Grx5 do ferredoksyny (Shakamuri i wsp., 2012). Zgodnie z tym mechanizmem zaobserwowano, że między innymi w roślinnych chloroplastach glutaredoksyna GrxS14 efektywnie pośredniczy w transferze centrów FeS do roślinnego białka Fdx, podobnie doświadczenia *in vitro* wykonane w oparciu o bakteryjne białka *E. coli* wykazały efektywny transfer FeS z Grx4 do Fdx (Shakamuri i wsp., 2012).

Kolejne doniesienia literaturowe wskazują także na inną możliwą rolę, którą pełnią białka należące do rodziny glutaredoksyn. Mianowicie białka te mogą funkcjonować jako sensory poziomu żelaza w komórce. U drożdży *S. cerevisiae* aktywacja regulonu żelaza jest zależna od tego, czy w obrębie cytozolowych białek Grx3 i Grx4 są związane centra FeS, czy nie. Gdy jest dużo żelaza dimer na który składają się obie glutaredoksyny, oddziałuje z białkiem Fra2 z rodziny BolA, tworząc kompleks glutaredoksyny i Fra2. To zapobiega akumulacji czynnika transkrypcyjnego Aft w jądrze, którego rolą jest aktywacja systemów odpowiedzialnych za asymilację żelaza u drożdży. Prawdopodobnie podobny system funkcjonuje także w bakteriiach *E. coli* w oparciu o białka Grx4 oraz BolA. U bakterii *A. vinelandii* homolog BolA również został zidentyfikowany. Alternatywnie w bakteriiach glutaredoksyny mogą funkcjonować jako białka dostarczające centra FeS do białka IscR. Białko IscR po związaniu centrum Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> działa jako represor transkrypcji operonu ISC. Zatem dotychczasowa literatura sugeruje, że glutaredoksyny mogą pełnić dwojaką rolę, jako białka przechowujące FeS do wykorzystania później lub jako białka pośredniczące podczas transferu centrów FeS (Shakamuri i wsp., 2012).

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że zaproponowany w niniejszej pracy doktorskiej model kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 poparty wynikami analizy biochemicznej jest zgodny z dotychczasową literaturą dotyczącą funkcjonowania białek opiekuńczych i promuje określoną kolejność wydarzeń w ich oddziaływaniu z substratem białkowym. U drożdży na pierwszym etapie substrat Isu1 jest wiązany przez białko z domeną J, Hsc20. Następnie kompleks tych dwóch białek oddziałuje z mtHsp70, białkiem Ssq1, dedykowanym ściśle do pełnienia roli w procesie biogenezy centrów FeS. Przejściowo tworzy się kompleks wszystkich trzech białek i wzajemne interakcje stymulują aktywność ATPazową białka Hsp70, w wyniku której ATP jest hydrolizowane do ADP. W wyniku hydrolizy białko Ssq1 zmienia konformację ze zwartej, w której obie domeny białka są spięte, na taką w której domeny są rozpięte i mogą swobodnie się obracać względem siebie, choć mimo swobody, nadal dochodzi do przejściowych interakcji między nimi. W tym czasie dysocjacji ulga białko Hsc20. Nie jest jednak wiadomo, czy po hydrolizie ATP białko Hsc20 dysocjuje najpierw, co pociąga za sobą zmianę konformacji Ssq1, czy dysocjacja Hsc20 jest konsekwencją, a nie przyczyną zmiany konformacji. Niektóre doniesienia literaturowe sugerują, że w przypadku białek bakteryjnych stymulacja aktywności ATPazowej białka HscA przez holo-IscU:HscB może być wspomagana przez pośredni mechanizm aktywacji przez atak reszt cysteinowych białka akceptorowego (przykładowo Grx5) na atomy żelaza centrum 2Fe-2S związanego z IscU. Postulowany atak uwalnia łańcuchy boczne reszt aminokwasowych IscU, które są zaangażowane w koordynację centrum 2Fe-2S. Wystąpienie takiej zmiany konformacyjnej w obrębie IscU wpływałoby na konformację HscB. Biorąc pod uwagę, że w strukturze domeny C-końcowej HscB znajduje się miejsce wiązania IscU, które zlokalizowane jest blisko miejsca wiązania HscA, to zmiany strukturalne w obrębie HscB mogłyby również wpływać

na zmiany konformacji HscA. Z kolei zmiana w obrębie HscA dotyczyłaby domeny NBD, tym samym inicjując hydrolizę ATP. W wyniku hydrolizy rozpięcie domeny NBD i SBD spowodowałoby utratę możliwości oddziaływania z HscB, tym samym powodując jego dysocjację. W tym czasie związana cząsteczka IscU może uzyskać stan nieuporządkowany, co doprowadziłoby do uwolnienia centrum FeS do kolejnego białka – monotiolowej glutaredoksy (Kim i wsp., 2014). Uzyskane wyniki w ramach realizacji projektu doktorskiego pokazują, że białka drożdżowe funkcjonują w oparciu o zbliżony mechanizm. Niemniej wciąż pozostaje kwestią otwartą wyjaśnienie roli biochemicznej eukariotycznych białek opiekuńczych w procesie biogenezy centrów FeS. Analiza miejsc oddziaływania pomiędzy białkami drożdżowymi okazała się być w większości zgodna z danymi dostępnymi w literaturze (Kampinga i Craig 2010, Ciesielski i wsp., 2012, Manicki i wsp., 2014, Delewski i wsp., 2016, Dutkiewicz i wsp., 2017). Wcześniej uważano, że domena C-końcowa białka Hsc20 oddziałuje wyłącznie z białkiem Isu1. Realizując projekt doktorski, poprzez zastosowanie zarówno białek natywnych jak też białek pozbawionych zdolności oddziaływania ze specyficznymi partnerami, potwierdziłem, że rejony wytypowane w obrębie poszczególnych białek kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 są niezbędne do oddziaływania białko:białko i tym samym istotne podczas tworzenia kompleksu trzech białek. Mam nadzieję, że uzyskane wyniki przyczynią się do lepszego poznania molekularnego mechanizmu procesu mitochondrialnej biogenezy FeS. Ponad to ze względu na dużą konserwację ewolucyjną tego procesu wyniki dotyczące poszczególnych oddziaływań pomiędzy białkami drożdżowymi mogą być również ważne w przypadku analiz dotyczących białek ludzkich. Tym samym ufam, że być może przyczynią się do lepszego zrozumienia molekularnych podstaw patologii związanych z mutacjami genów kodujących białka odpowiedzialne za mitochondrialną biogenezę centrów FeS.

## 6. Bibliografia

- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR. (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase, *Annu Rev Biochem*, 78:701–722.
- Rees DC. (2002) Great metalloclusters in enzymology, *Annual review of biochemistry*, 71:221–246.
- Beinert H, Holm RH, Munck E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science* 277:653-659.
- Meyer J. (2008) Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution, *J Biol Inorg Chem*, 13:157-170.
- Lill R, Mühlenhoff U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases, *Annu Rev Biochem*, 77:669-700.
- Rouault TA. (2014) Mammalian iron–sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(1):45–55.
- Beinert H, Emptage MH, Dreyer JL, Scott RA, Hahn JE, Hodgson KO, Thomson AJ. (1983) Iron-sulfur stoichiometry and structure of iron-sulfur clusters in three-iron proteins: evidence for [3Fe-4S] clusters, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(2):393-396.
- Hirst J. (2013) Mitochondrial Complex I, *Annual Review of Biochemistry*, 82(1):551–575.

- Mettert EL, Outten FW, Wanta B, Kiley PJ. (2008) The impact of O(2) on the Fe-S cluster biogenesis requirements of Escherichia coli FNR, *J Mol Biol*, 384:798-811.
- Imlay JA. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, *Annu Rev Biochem*, 77:755-776.
- Lill R, Mühlenhoff U. (2006) Iron-Sulfur Protein Biogenesis in Eukaryotes: Components and Mechanisms, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1):457-486.
- Rudolf J, Makrantonis V, Ingledew WJ, Stark MJ, White MF. (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains, *Mol Cell*, 23:801-808.
- Kispal G, Katalin S, Heike L, Zsuzsanna F, Tibor B, Tamás J, Jochen B. (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria, *The EMBO Journal*, 24(3):589-598.
- Rouault TA. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease, *Nat Chem Biol*, 2:406-414.
- Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR. (1989) Biochemical and Genetic Analysis of the NifUSVWZM Cluster from Azotobacter Vinelandii, *Molecular & General Genetics*, 219(1-2):49-57.
- O'Brien E, Holt ME, Thompson MK, Salay LE, Ehlinger AC, Chazin WJ, Chazin, Barton JK. (2017) The [4Fe4S] cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport, *Science*, 355(6327):eaag1789.
- Brill WJ. (1980) Biochemical genetics of nitrogen fixation, *Microbiol Rev*, 44:449-467.
- Rees DC, Howard JB. (2003) The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters, *Science*, 300:929-931.
- Bishop PE, Brill WJ. (1977) Genetic analysis of Azotobacter vinelandii mutant strains unable to fix nitrogen, *J Bacteriol*, 130:954-956.
- Shah VK, Brill WJ. (1981) Isolation of a molybdenum-iron cluster from nitrogenase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:3438-3440.
- Ugalde RA, Imperial J, Shah VK, Brill WJ. (1984) Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor in the absence of nitrogenase, *J Bacteriol*, 159:888-893.
- Brigle KE, Newton WE, Dean DR. (1985) Complete nucleotide-sequence of the Azotobacter vinelandii nitrogenase structural gene-cluster, *Gene*, 37:37-44.
- Hu Y, Ribbe MW. (2011) Biosynthesis of Nitrogenase FeMoco, *Coord Chem Rev*, 255:1218-1224.
- Kennedy C, Dean D. (1992) The nifU, nifS and nifV gene products are required for activity of all three nitrogenases of Azotobacter vinelandii, *Mol Gen Genet*, 231:494-498.
- Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2754-2758.

- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR. (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:599–604.
- Zheng L, Cash VL, Flint DH, Dean DR. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*, *J Biol Chem*, 273:13264–13272.
- Smith AD, Agar JN, Johnson KA, Frazzon J, Amster IJ, Dean DR, Johnson MK. (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis, *J Am Chem Soc*, 123:11103-11104.
- Cupp-Vickery JR, Urbina H, Vickery LE. (2003) Crystal Structure of IscS, a Cysteine Desulfurase from *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology*, 330(5):1049-1059.
- Kakuta Y, Horio T, Takahashi Y, Fukuyama K. (2001) Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters, *Biochemistry*, 40:11007-11012.
- Takahashi Y, Tokumoto U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids, *J Biol Chem*, 277:28380–28383.
- Outten FW, Djaman O, Storz G. (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 52:861–872.
- Yeo WS, Lee JH, Lee KC, Roe JH. (2006) IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins, *Mol Microbiol*, 61:206–218.
- Lee JH, Yeo WS, Roe JH. (2004) Induction of the sufA operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor, *Mol Microbiol*, 51:1745–1755.
- Dai Y, Outten FW. (2012) The *E. coli* SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU. *FEBS Lett*, 586:4016–4022.
- Wollers S, Layer G, Garcia-Serres R, Signor L, Clemancey M, Latour JM, Fontecave M, Ollagnier de Choudens S. (2010) Iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly: the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor, *J Biol Chem*, 285:23331–23341.
- Lill R, Dutkiewicz R, Elsässer HP, Hausmann A, Netz DJA, Pierik AJ, Stehling O, Urzica E, Mühlhoff U. (2006) Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(7):652-667.
- Dutkiewicz R, Nowak M, Craig EA, Marszalek J. (2017) Fe-S Cluster Hsp70 Chaperones: The ATPase Cycle and Protein Interactions, *Methods Enzymol*, 595:161-184.
- Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek J. (2003) Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart, *J Biol Chem*, 278(32):29719-29727.
- Boniecki MT, Freibert SA, Mühlhoff U, Lill R, Cygler M. (2017) Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex, *Nat Commun*, 1287(8).

- Gakh O, Bedekovics T, Duncan SF, Smith DY IV, Berkholtz DS, Isaya G. (2010) Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly, *J. Biol. Chem.*, 285:38486–38501.
- Tsai CI, Barondeau DP. (2010) Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex, *Biochemistry*, 49:9132–9139.
- Adinolfi S, Iannuzzi C, Prisci F, Pastore C, Iametti S, Martin S, Bonomi F, Pastore A. (2009) Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron sulfur formation catalysed by IscS, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16:390–396.
- Yoon T, Cowan JA. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins, *J Am Chem Soc*, 125:6078–6084.
- Yan R, Konarev PV, Iannuzzi C, Adinolfi A, Roche B, Kelly G, Simon L, Martin SR, Py B, Barras F, Svergun DI, Pastore A. (2013) Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS. *J Biol Chem*, 288:24777–24787.
- Kim JH, Frederick RO, Reinen NM, Troupis AT, Markley JL. (2013) [2Fe-2S]Ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin, *J Am Chem Soc*, 135:8117–8120.
- Webert H, Freibert SA, Gallo A, Heidenreich T, Linne U, Amlacher S, Hurt E, Mühlhoff U, Banci L, Lill R. (2014) Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin, *Nat. Commun*, 5:5013.
- Braymer JJ, Freibert SA, Rakwalska-Bange M, Lill R. (2021) Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*, 1868(1):118863.
- Song J-Y, Marszalek J, Craig EA. (2012) Cysteine desulfurase Nfs1 and Pim1 protease control levels of Isu, the Fe-S cluster biogenesis scaffold, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(26):10370-10375.
- Vickery LE, Cupp-Vickery JR. (2007) Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(2):95–111.
- Kampinga HH, Craig EA. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 11(8):579–592.
- Schilke B, Williams B, Knieszner H, Puksza S, D’Silva P, Craig EA, Marszalek J. (2006) Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis, *Current Biology*, 16(16):1660–1665.
- Mayer MP. (2013) Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism, *Trends in Biochemical Sciences*, 38(10):507–514.
- Nachman E, Wentink AS, Madiona K, Mogk A, Bukau B, Nussbaum-Krammer C. (2020) Disassembly of Tau fibrils by the human Hsp70 disaggregation machinery generates small seeding-competent species, *Molecular Basis of Disease*, 295(28):9676-9690.



- Craig EA, Marszalek J. (2017) How Do J-Proteins Get Hsp70 to Do So Many Different Things? *Trends Biochem Sci*, 42(5):355-368.
- Majewska J, Ciesielski SJ, Schilke B, Kominek J, Blenska A, Delewski W, Song J-Y, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R. (2013) Binding of the chaperone Jac1 protein and cysteine desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive, *J Biol Chem*, 288(40):29134-29142.
- Ciesielski SJ, Schilke B, Marszalek J, Craig EA. (2016) Protection of scaffold protein Isu from degradation by the Lon protease Pim1 as a component of Fe-S cluster biogenesis regulation, *Mol Biol Cell*, 27(7):1060-1068.
- Dong Y, Zhang D, Yu Q, Zhao Q, Xiao C, Zhang K, Jia C, Chen S, Zhang B, Zhang B, Li M. (2017) Loss of Ssq1 leads to mitochondrial dysfunction, activation of autophagy and cell cycle arrest due to iron overload triggered by mitochondrial iron-sulfur cluster assembly defects in *Candida albicans*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 85:44-55.
- Cupp-Vickery JR, Peterson JC, Ta DT, Vickery LE (2004) Crystal structure of the molecular chaperone HscA substrate binding domain complexed with the IscU recognition peptide ELPPVKIHC, *J Mol Biol*, 342(4):1265-1278.
- Bonomi F, Iametti S, Morleo A, Ta DT, Vickery LE (2011) Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange, *Biochemistry*, 50(44):9641-9650.
- Lodi R, Tonon C, Calabrese V, Schapira AHV. (2006) Friedreich's Ataxia: From Disease Mechanisms to Therapeutic Interventions, *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4):438-443.
- Mochel F, Knight MA, Tong WH, Hernandez D, Ayyad K, Taivassalo T, Andersen PM, Singleton A, Rouault TA, Fischbeck KH, Haller RG (2008) Splice Mutation in the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein ISCU Causes Myopathy with Exercise Intolerance, *American Journal of Human Genetics*, 82(3):652-660.
- Baker PR 2<sup>nd</sup>, Friederich MW, Swanson MA, Shaikh T, Bhattacharya K, Scharer GH, Aicher J, Creadon-Swindell G, Geiger E, MacLean KN, Lee W-T, Deshpande C, Freckmann M-L, Shih L-Y, Wasserstein M, Rasmussen MB, Lund AM, Procopis P, Cameron JM, Robinson BH, Brown GK, Brown RM, Compton AG, Dieckmann CL, Collard R, Coughlin CR 2<sup>nd</sup>, Spector E, Wempe MF, Van Hove JLK (2014) Variant nonketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5, *Brain*, awt328.
- Ye H, Rouault TA. (2010) Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease, *Biochemistry*, 49:4945-4956.
- Andressoo J-O, Mitchell JR, de Wit J, Hoogstraten D, Volker M, Toussaint W, Speksnijder E, Beems RB, van Steeg H, Jans J, de Zeeuw CI, Jaspers NG, Raams A, Lehmann AR, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van der Horst GT. (2006) An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria, *Cancer Cell*, 10:121-132.
- Knieszner H, Schilke B, Dutkiewicz R, D'Silva P, Cheng S, Ohlson M, Craig EA, Marszalek J. (2005) Compensation for a defective interaction of the hsp70 ssq1 with the mitochondrial Fe-S cluster scaffold isu, *J Biol Chem*, 280:28966-28972.

Kelly SM, Jess TJ, Price NC. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2):119–139.

Hoff KG, Cupp-Vickery JR, Vickery LE. (2003) Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system, *J Biol Chem*, 278(39):37582-37589.

Dutkiewicz R, Schilke B, Cheng S, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J. (2004) Sequence-specific Interaction between Mitochondrial Fe-S Scaffold Protein Isu and Hsp70 Ssq1 Is Essential for Their in Vivo Function, *J Biol Chem*, 279(28):29167-29174.

Garland SA, Hoff KG, Vickery LE, Cizewski Culotta V. (1999) Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly, *Journal of Molecular Biology*, 294(4):897-907.

Srouf B, Gervason S, Monfort B, D'Autréaux B. (2020) Mechanism of Iron-Sulfur Cluster Assembly: In the Intimacy of Iron and Sulfur Encounter, *Inorganics*, 8(10):55.

Ranatunga W, Gakh O, Galeano BK, Smith DYT, Soderberg CA, Al-Karadaghi S, Thompson JR, Isaya G. (2016) Architecture of the Yeast Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Assembly Machinery: The Sub-Complex Formed by the Iron Donor, Yfh1 Protein, and the Scaffold, Isu1 Protein, *J Biol Chem*, 291:10378–10398.

Yoon H, Knight SAB, Pandey A, Pain J, Turkarslan S, Pain D, Dancis A. (2015) Turning Saccharomyces cerevisiae into a Frataxin-Independent Organism, *PLoS Genetics*, 11(5):e1005135.

Rüdiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries, *The EMBO Journal*, 16(7):1501-1507.

Aloria K, Schilke B, Andrew AJ, Craig EA. (2004) Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo, *EMBO Rep*, 5(11):1096-1101.

Li H, Outten CE. (2012) Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe–2S] binding partners in iron homeostasis, *Biochemistry*, 51:4377–4389.

Shakamuri P, Zhang B, Johnson M. (2012) Monothiol Glutaredoxins Function in Storing and Transporting [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] Clusters Assembled on IscU scaffold proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 134:15213-15216.

Weiler BD, Bruck MC, Kothe I, Bill E, Lill R, Mühlhoff U. (2020) Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1-ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 117:20555–20565.

Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, Del Toro M, Labayru MT, Landa J, Font A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Ugarte M, Gutierrez-Solana LG, Campistol J, Garcia-Cazorla A, Vaquerizo J, Riudor E, Briones P, Elpeleg O, Ribes A, Lill R. (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins, *Am. J. Hum. Genet.*, 89:656–667.

- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerscher S, Elsasser HP, Wittig I, Balk J, Brandt U, Lill R. (2009) Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I, *Mol. Cell. Biol.*, 29:6059–6073.
- Netz DJ, Stumpfig M, Dore C, Mühlenhoff U, Pierik AJ, Lill R. (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis, *Nat. Chem. Biol.*, 6:758–765.
- Paul VD, Mühlenhoff U, Stumpfig M, Seebacher J, Kugler KG, Renicke C, Taxis C, Gavin AC, Pierik AJ, Lill R. (2015) The deca-GX3 proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion, *eLife*, 4:e08231.
- Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics*, 9:40.
- Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. (2017) The ClusPro web server for protein-protein docking, *Nat Protoc*, 12(2):255–278.
- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, 1-2:19-25.
- Huang J, MacKerell AD Jr. (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data, *J Comput Chem*, 34(25):2135–2145.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, 14:33-38.
- Nørby JG. (1988) Coupled Assay of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity, *Methods in Enzymology*, 156(C):116–119.
- Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G. (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione, *J. Biol. Chem*, 277:26944–26949.
- Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *Journal of Chromatography A*, 411:177-184.
- Miroux B, Walker JE. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J Mol Biol*, 260(3):289-298.
- Iametti S, Barbiroli A, Bonomi F. (2015) Functional implications of the interaction between HscB and IscU in the biosynthesis of FeS clusters, *J Biol Inorg Chem*, 20:1039–1048.
- Kleczewska M, Grabinska A, Jelen M, Stolarska M, Schilke B, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R. (2020) Biochemical Convergence of Mitochondrial Hsp70 System Specialized in Iron–Sulfur Cluster Biogenesis, *Int J Mol Sci*, 21(9):3326.
- Ciesielski SJ, Schilke B, Osipiuk J, Bigelow L, Mulligan R, Majewska J, Joachimiak A, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R. (2012) Interaction of J-Protein Co-Chaperone Jac1 with Fe–S Scaffold Isu Is Indispensable In Vivo and Conserved in Evolution, *J Mol Biol*, 417(1-2):1-12.

- Bonomi F, Iametti S, Morleo A, Ta D, Vickery LE. (2008) Studies on the Mechanism of Catalysis of Iron-Sulfur Cluster Transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB Chaperones, *Biochemistry*, 47:12795-12801.
- Craig EA, Marszalek J. (2011) Hsp70 Chaperones, *eLS*.
- Kityk R, Kopp J, Mayer MP. (2018) Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones, *Mol Cell*, 69(2):227-237.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free, *J Comput Chem*, 26:1701–1718.
- Mapa K, Sikor M, Kudryavtsev V, Waegemann K, Kalinin S, Seidel CAM, Neupert W, Lamb DC, Mokranjac D. (2010) The Conformational Dynamics of the Mitochondrial Hsp70 Chaperone, *Molecular Cell*, 38:89-100.
- Uzarska MA, Dutkiewicz R, Freibert SA, Lill R, Mühlhoff U. (2013) The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation, *Mol Biol Cell*, 24(12):1830-1841.
- Manicki M, Majewska J, Ciesielski S, Schilke B, Blenska A, Kominek J, Marszalek J, Craig EA, Rafal Dutkiewicz. (2014), *J Biol Chem*, 289(44):30268-30278.
- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, Bukau B. (1999) Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5452–5457.
- Jiang J, Maes EG, Taylor AB, Wang L, Hinck AP, Lafer EM, Sousa R. (2007) Structural Basis of J Cochaperone Binding and Regulation of Hsp70, *Mol Cell*, 28(3):422-433.
- Sichting M, Mokranjac D, Azem A, Neupert W, Hell K. (2005) Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1, *The EMBO Journal*, 24:1046-1056.
- Clerico EM, Tilitsky JM, Meng W, Gierasch LM. (2015) How Hsp70 Molecular Machines Interact with Their Substrates to Mediate Diverse Physiological Functions, *J Mol Biol*, 427(7):1575–1588.
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA. (1996) Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK, *Science*, 272(5268):1606–1614.
- Banerjee R, Jayaraj GG, Peter JJ, Kumar V, Mapa K. (2016) Monitoring conformational heterogeneity of the lid of DnaK substrate-binding domain during its chaperone cycle, *FEBS J*, 283(15):2853-2868.
- Andrew AJ, Dutkiewicz R, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J (2006) Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p, *J Biol Chem*, 281(21):14580-14587.
- Shin M, Watson ER, Song AS, Mindrebo JT, Novick SJ, Griffin PR, Wiseman RL, Lander GC. (2021) Structures of the human LONP1 protease reveal regulatory steps involved in protease activation, *Nature Communications*, 12:3239.

- Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R. (2005) Structural Basis of Interdomain Communication in the Hsc70 Chaperone, *Mol. Cell*, 20:513–524.
- Suh WC, Burkholder WF, Lu CZ, Zhao X, Gottesman ME, Gross CA. (1998) Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:15223–15228.
- Ahmad A, Bhattacharya A, McDonald RA, Cordes M, Ellington B, Bertelsen EB, Zuiderweg ERP. (2011) Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:18966-18971.
- Kim JH, Alderson TR, Frederick RO, Markley JL. (2014) Nucleotide-Dependent Interactions within a Specialized Hsp70/Hsp40 Complex Involved in Fe–S Cluster Biogenesis, *J Am Chem Soc*, 136(33):11586-11589.
- Kityk R, Kopp J, Sinning I, Mayer MP. (2012) Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones, *Molecular Cell*, 48(6):863-874.
- Rüdiger S, Mayer MP, Schneider-Mergener J, Bukau B. (2000) Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch, *J Mol Biol*, 304(3):245-251.
- Nordquist EB, English CA, Clerico EM, Sherman W, Gierasch LM, Chen J. (2021) Physics-based modeling provides predictive understanding of selectively promiscuous substrate binding by Hsp70 chaperones, *PLoS Comput Biol*, 17(11):e1009567.
- Rüdiger S. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries, *EMBO J*, 16(7):1501-1507.
- Tomiczek B, Delewski W, Nierzwicki L, Stolarska M, Grochowina I, Schilke B, Dutkiewicz R, Uzarska MA, Ciesielski SJ, Czub J, Craig EA, Marszalek J. (2020) Two-step mechanism of J-domain action in driving Hsp70 function, *PLoS Comput Biol*, 16(6):e1007913.
- Mühlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p, *EMBO J*, 22(18):4815-4825.
- Wittig I, Schägger H. (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis, *Proteomics*, 8(19):3974-3990.
- Yan L-J, Forster MJ. (2009) Resolving mitochondrial protein complexes using non-gradient blue native polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal Biochem*, 389(2):143-149.
- Heck AJR. (2008) Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology, *Nature Methods*, 5:927-933.
- Delewski W, Paterkiewicz B, Manicki M, Schilke B, Tomiczek B, Ciesielski SJ, Nierzwicki L, Czub J, Dutkiewicz R, Craig EA, Marszalek J. (2016) Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Chaperones: Evidence for Emergence of Mutational Robustness of a Highly Specific Protein-Protein Interaction, *Mol Biol Evol*, 33(3):643-656.
- Uzarska MA, Grochowina I, Soldek J, Jelen M, Schilke B, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R. (2022) During FeS cluster biogenesis, ferredoxin and frataxin use overlapping binding sites on yeast cysteine desulfurase Nfs1, *J Biol Chem*, 298(2):101570.

Srouf B, Gervason S, Hoock MH, Monfort B, Want K, Larkem D, Trabelsi N, Landrot G, Zitolo A, Fonda E, Etienne E, Gerbaud G, Müller CS, Oltmanns J, Gordon JB, Yadav V, Kleczewska M, Jelen M, Toledano MB, Dutkiewicz R, Goldberg DP, Schünemann V, Guigliarelli B, Burlat B, Sizun C, D'Autréaux B. (2022) Iron Insertion at the Assembly Site of the ISCU Scaffold Protein Is a Conserved Process Initiating Fe–S Cluster Biosynthesis, *J Am Chem Soc*, 144(38):17496-17515.

Puchala W, Burdukiewicz M, Kistowski M, Dabrowska KA, Badaczewska-Dawid AE, Cysewski D, Dadlez M. (2020) HaDeX: an R package and web-server for analysis of data from hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry experiments, *Bioinformatics*, 36(16):4516-4518.

Füzéry AK, Oh JJ, Ta DT, Vickery LE, Markley JL. (2011) Three hydrophobic amino acids in *Escherichia coli* HscB make the greatest contribution to the stability of the HscB-IscU complex, *BMC Biochem*, 12:3.

Kim JH, Tonelli M, Markley JL. (2012) Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(2):454-459.

Grochowina I. (2019) Analiza struktury i dynamiki potrójnego kompleksu Hsp70(Ssq1)-Hsc20-IscU z zastosowaniem wymiany wodoru-deuteru ze spektrometrią mas, praca magisterska, Uniwersytet Gdański.