

## 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.