

Molekularne podstawy ewolucji małych białek szoku cieplnego w *Erwiniaceae*

mgr Piotr Sławomir Karaś

Małe białka szoku cieplnego (sHsp) są w stanie wiązać agregujące substraty, sekwestrując je w konformacji bliskiej do natywnej w złożonych kompleksach sHsp – substrat, zapobiegając tym samym niekontrolowanej dalszej agregacji. Bliska natywnej konformacja sekwestrowanych substratów jak i niewielkie rozmiary tworzonych kompleksów ułatwiają późniejszy proces dezagregacji i przywracania konformacji natywnej, prowadzony przez system Hsp70 i dezagregazy Hsp100. Inicjacja tego procesu wymaga jednak wyparcia przez system Hsp70 białek sHsp związanych do substratu, co wymusza kompromis między wydajnym wiązaniem i sekwestracją substratu przez białka sHsp, a ich zdolnością do stymulacji dezagregacji prowadzonej przez system Hsp70 i Hsp100.

Większość bakterii należących do rzędu *Enterobacterales* (w tym rodzina *Enterobacteriaceae*) posiada system dwóch współpracujących białek sHsp – IbpA i IbpB, powstałych na skutek duplikacji genu kodującego ancestralne, pierwotnie pojedyncze IbpA. IbpA wchodzące w skład systemu dwubiałkowego silnie oddziałuje z substratem i posiada silną aktywność sekwestrazy, podczas gdy IbpB, samodzielnie dużo słabiej wiąże substraty, ułatwia dysocjację sHsp od substratu podczas procesu dezagregacji, umożliwiając efektywną stymulację tego procesu przez sHsp nawet przy niższych stężeniach Hsp70. W rodzinie *Erwiniaceae* IbpB zostało utracone, a wtórnie pojedyncze IbpA wykształciło zdolność do efektywnej stymulacji dezagregacji prowadzonej przez system Hsp70 i Hsp100 na poziomie zbliżonym do systemu dwubiałkowego z rodziny *Enterobacteriaceae* mimo braku partnera.

W ramach tej pracy podjąłem próbę wyjaśnienia, w jaki sposób wtórnie pojedyncze IbpA z *Erwiniaceae* nabyło swoją nową funkcjonalność. W tym celu przeprowadziłem rekonstrukcję historii ewolucyjnej białka IbpA w *Enterobacterales*, pokazując, że charakterystyczna aktywność wtórnie pojedynczego IbpA z *Erwiniaceae* wykształciła się już w ostatnim wspólnym przodku tej rodziny, równoległe do utraty paralogicznego białka IbpB, najprawdopodobniej pod wpływem działania selekcji pozytywnej. Porównując sekwencje i właściwości biochemiczne rekonstruowanych białek ancestralnych, zidentyfikowałem dwie substytucje aminokwasowe (Q66H i G109D), które umożliwiły temu białku nabycie zdolności do efektywnej stymulacji dezagregacji i przywracania konformacji natywnej sekwestrowanych polipeptydów. Pokazałem następnie, że substytucje te spowodowały osłabienie oddziaływania między domeną α -kryształiny, a regionem końca karboksylowego białka IbpA, jak również oddziaływania między tą domeną, a substratem. Osłabienie tych oddziaływań ułatwiło wypieranie białek IbpA z kompleksu z substratem przez system Hsp70, zwiększając wydajność stymulacji dezagregacji sekwestrowanego substratu. Pokazałem również, że reszty aminokwasowe znajdujące się na zidentyfikowanych kluczowych pozycjach odgrywają istotną rolę w różnicach funkcjonalnych między współczesnymi IbpA z rodzin *Erwiniaceae* i *Enterobacteriaceae*.