

Streszczenie

Białko Lon należy do rodziny proteaz zależnych od ATP, które są zaangażowane w kontrolę jakości proteomu. Proteaza bakteryjna Lon jest uważana za najważniejszy czynnik zaangażowany w degradację białek. Odgrywa ona istotną rolę w wielu procesach życiowych komórki, m. in. adaptacja do warunków stresowych, podział komórkowy i różnicowanie, replikacja DNA. Dotychczas w naszym zespole wykazano, że proteaza Lon z *Escherichia coli* specyficznie degraduje białko TrfA (inicjator replikacji plazmidu RK2) związane w kompleksie nukleoproteinowym z DNA. Ponadto, sama proteaza Lon wiąże DNA. Obecność obu czynników, TrfA i DNA, silnie stymuluje aktywność proteolityczną oraz ATPazową proteazy Lon. Dotychczas jednak nie wykazano w jaki sposób DNA wpływa na degradację substratów przez Lon oraz nie zidentyfikowano miejsca wiązania DNA do Lon.

Głównym celem projektu było znalezienie miejsca wiązania DNA w białku Lon *E. coli*. W pierwszym etapie skonstruowano i oczyszczono skrócone wersje białka Lon, zawierające pojedyncze domeny i sprawdzono, która z nich wiąże DNA. Wykazano, że domena ATPazowa Lon tworzy kompleks z DNA. W oparciu o uzyskane wyniki oraz model oligomeru proteazy Lon wytypowany został rejon z pozytywnie naładowanymi resztami aminokwasowymi, które mogą być potencjalnie zaangażowane w oddziaływanie białka z DNA. Skonstruowano i oczyszczono kilka wariantów białka Lon z wprowadzonymi substytucjami zmieniającymi ładunek w wytypowanym rejonie oraz zbadano oddziaływanie tych wariantów z DNA. Warianty Lon z substytucjami, które znacznie osłabiły wiązanie do DNA, były następnie badane pod kątem aktywności proteolitycznej względem specyficznych substratów. Analiza wykazała, że warianty Lon niewiążące DNA miały znacznie obniżoną aktywność proteolityczną względem białka TrfA w kompleksie nukleoproteinowym, natomiast substraty niewiążące DNA nadal były degradowane. Kolejne etapy projektu miały na celu przeprowadzenie analiz: interakcji uzyskanych mutantów białka Lon z substratami, stymulacji aktywności ATPazowej oraz efektów fenotypowych wariantów Lon w komórkach bakteryjnych.

Przy użyciu metod biofizycznych oraz mikroskopii elektronowej przeprowadzono analizę strukturalną proteazy Lon oraz czynników wpływających na tworzenie kompleksów nukleoproteinowych. Przeprowadzone doświadczenia wykazały dominację struktury dodekamerycznej proteazy Lon w populacji cząsteczek oraz zależność wiązania enzymu do DNA od jonów Mg^{2+} i konformacji DNA. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano hipotetyczny model zależności struktury i funkcji proteazy Lon od interakcji z kwasami nukleinowymi.