

Molekularny mechanizm oddziaływania domeny-J białka Jac1 z partnerskim Hsp70 w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych.

Wojciech Delewski

Promotor: prof. dr hab. Jarosław Marszałek

Centra żelazo-siarkowe (FeS) są grupami prostetycznymi niezbędnymi do funkcjonowania wielu białek zaangażowanych w kluczowe procesy komórkowe. Biogeneza centrów FeS u organizmów eukariotycznych odbywa się w mitochondriach. Centra syntezowane są w obrębie białka Isu, a następnie przenoszone do białek docelowych przez system białek opiekuńczych Hsp70. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* składa się on z wyspecjalizowanego białka Hsp70 Ssq1, pomocniczego białka posiadającego domenę-J (JDP; ang. *J-domain protein*) Jac1 oraz czynnika wymiany nukleotydu Mge1. Jac1 poprzez domenę-J stymuluje aktywność ATPazy Ssq1, co prowadzi do związania Isu przez Ssq1 i uwolnienia centrum FeS do białka akceptorowego. Molekularne mechanizmy oddziaływania Jac1:Isu oraz Isu:Ssq1 są poznane, podczas gdy mechanizm oddziaływania Jac1:Ssq1 pozostawał nieznany. Celem mojej pracy było zidentyfikowanie reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za to oddziaływanie.

W pierwszej kolejności porównałem system białek opiekuńczych *S. cerevisiae*, w którym białko Hsp70 Ssq1 jest wyspecjalizowane w transferze centrów FeS, z systemem *Schizosaccharomyces pombe*, w którym za transfer FeS odpowiada wielofunkcyjne mtHsp70. Stwierdziłem, że białko Jac1_{sc} *S. cerevisiae* posiada znacznie więcej dodatnio naładowanych reszt w sekwencji domeny-J, niż jego ortolog Jac1_{sp} *S. pombe*. Zbadałem efekty wymiany naładowanych reszt Jac1_{sc} na aminokwasy pozbawione ładunku obecne w Jac1_{sp}. Wykazałem, że taka substytucja obniża symulację ATPazy Ssq1 i hamuje wzrost drożdży *in vivo*. Wykazałem w ten sposób, że reszty naładowane biorą udział w funkcjonalnym oddziaływaniu domeny-J Jac1_{sc} z Ssq1.

Następnie, na podstawie wyników analizy porównawczej oraz modelu struktury kompleksu Jac1_{sc}:Ssq1, nasz zespół zidentyfikował reszty aminokwasowe potencjalnie odpowiedzialne za oddziaływanie domeny-J Jac1_{sc} z Ssq1. W sekwencji Jac1_{sc} były to reszty R37, K38, R41 i K70, a w Ssq1 reszty D246, E248, D249 i E253. Aby zweryfikować te przewidywania, zbadałem wpływ pojedynczych podstawień alaninowych w tych pozycjach na stymulację ATPazy Ssq1 przez Jac1_{sc} oraz na formowanie kompleksu Ssq1:Isu. Wykazałem, że substytucja dowolnej z reszt zaburzała funkcjonalne oddziaływanie Jac1_{sc}:Ssq1 w obu układach doświadczalnych. Najsilniejsze efekty obserwowałem dla wariantów pojedynczych Jac1_{sc} R37A, R41A oraz dla wariantu podwójnego RR/AA. Ponadto mutant podwójny Jac1_{sc} RR/AA powodował zahamowanie wzrostu drożdży. Z wariantów Ssq1 najsilniejsze efekty miały podstawienia D246A i E253A oraz jednoczesne podstawienie obu tych reszt. Następnie stosując metodę chemicznego sieciowania miejscowo-specyficznego wykazałem, że fizyczne oddziaływanie Jac1_{sc}:Ssq1 możliwe jest tylko wtedy, gdy nie są zaburzone oddziaływania elektrostatyczne.

Uzyskane wyniki pokazały, że domena-J Jac1_{sc} oddziałuje z Ssq1 poprzez sieć elektrostatycznych oddziaływań angażujących dodatnio naładowane reszty aminokwasowe domeny-J oraz ujemnie naładowane reszty Ssq1. Ze względu na konserwatyzm ewolucyjny systemów Hsp70 wyniki przedstawione w tej rozprawie mają znaczenie dla poznania molekularnego mechanizmu oddziaływania innych białek JDP z partnerskimi Hsp70.