



Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

---

ROZPRAWA DOKTORSKA

---

*mgr Małgorzata Kleczewska*

## Porównanie bakteryjnych i eukariotycznych systemów Hsp70 funkcjonujących w biogenezie centrów żelazo – siarkowych

Comparison of bacterial and eukaryotic Hsp70 systems functioning in the biogenesis of iron-sulfur clusters

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

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

GDAŃSK 2023

## OŚWIADCZENIE

Ja, niżej podpisana oświadczam, iż przedłożona praca dyplomowa została wykonana przeze mnie samodzielnie, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych innych osób.

.....

data

.....

własnoręczny podpis

Na powstanie i ostateczny kształt mojej pracy doktorskiej miało wpływ wiele osób,  
którym chciałabym w tym miejscu podziękować:

**Dr. hab. Rafałowi Dutkiewiczowi, prof. UG**  
za całą przekazaną mi przez lata wiedzę, wszelką pomoc i cierpliwość.

**profesorowi Jarosławowi Marszałkowi**  
za możliwość wykonywania projektów w Pracowni Biochemii Ewolucyjnej.

**Pracownikom Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej**  
za pomoc w realizacji tego projektu i przyjemną atmosferę w pracy.

**Rodzinie**  
za wyrozumiałość, cierpliwość i pomoc, która pozwoliła mi zrealizować ten projekt



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 UMO-2015/19/B/NZ1/00237  
oraz  
programu TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej  
„Hsp70/J-protein chaperones substrate binding cycle: molecular mechanisms  
and functional consequences”  
nr POIR.04.04.00-00-4114 /17-00



*Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej*

# Spis treści

<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>8</b>
<b>1 WSTĘP .....</b>	<b>9</b>
1.1 CENTRA ŻELAZO-SIARKOWE I ICH WYSTĘPOWANIE W NATURZE .....	9
1.1.1 LOKALIZACJA BIAŁEK FE-S W KOMÓRCIE .....	9
1.2 BIOGENEZA CENTRÓW ŻELAZO-SIARKOWYCH .....	11
1.3 SYSTEMY BIOGENEZY CENTRÓW FE-S U ORGANIZMÓW PROKARIOTYCZNYCH .....	12
1.4 SYSTEMY BIOGENEZY CENTRÓW FE-S U ORGANIZMÓW EUKARIOTYCZNYCH .....	17
1.5 MITOCHONDRIALNA BIOGENEZA BIAŁEK FE-S PEŁNI KLUCZOWĄ ROLĘ PODCZAS REGULACJI HOMEOSTAZY ŻELAZA W KOMÓRKACH .....	26
1.6 PORÓWNANIE PROKARIOTYCZNYCH I EUKARIOTYCZNYCH SYSTEMÓW ISC .....	27
1.7 SYSTEM BIAŁEK HSP70 .....	30
1.7.2 BIAŁKA POMOCNICZE SYSTEMU HSP70 – BIAŁKA TYPU J I CZYNNIKI WYMIANY NUKLEOTYDÓW .....	32
1.8 WYSPECJALIZOWANE SYSTEMY BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH HSCA/HSCB ORAZ Ssq1/Hsc20 ZAANGAŻOWANE W PROCES BIOGENEZY CENTRÓW FE-S .....	34
1.8.1 CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWANIA BAKTERYJNEGO SYSTEMU BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH HSCA/HSCB Z BIAŁKIEM ISC U UCZESTNICZĄCYM W BIOGENEZIE CENTRÓW ŻELAZO-SIARKOWYCH .....	34
1.8.2 CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWANIA MITOCHONDRIALNEGO SYSTEMU BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH Ssq1/Hsc20 Z BIAŁKIEM ISU1 UCZESTNICZĄCYM W BIOGENEZIE CENTRÓW ŻELAZO-SIARKOWYCH .....	36
1.8.2.1 ODDZIAŁYWANIE ISU: Hsc20 .....	36
1.8.3 ODDZIAŁYWANIE Hsc20:Hsp70 .....	37
1.8.4 ODDZIAŁYWANIE ISU:Hsp70 .....	39
1.9 EWOLUCJA MITOCHONDRIALNEGO SYSTEMU HSP70 .....	40
<b>2 CEL PRACY .....</b>	<b>43</b>
<b>3 WYNIKI .....</b>	<b>44</b>
3.1 HSCA JEST DALEKO SPOKREWNIONY Z Ssq1 I NIE WYSTĘPUJE W PROTEOMACH EUKARIOTYCZNYCH .....	44
3.2 HSCA I Ssq1 MAJĄ PORÓWNYWALNE WARTOŚCI MAKSYMALNEJ STYMULACJI AKTYWNOŚCI ATPAZOWEJ .....	47
3.3 Ssq1 MA WYŻSZE POWINOWACTWO DO SUBSTRATU NIŻ HSCA .....	51
3.4 Ssq1 MA WYŻSZE POWINOWACTWO DO WSPÓŁPRACUJĄCEGO BIAŁKA Z DOMENĄ J NIŻ HSCA .....	53
<b>4. REKONSTYTUCJA PROCESU BIOGENEZY CENTRÓW FE-S .....</b>	<b>55</b>
4.1 REKONSTYTUCJA CENTRUM FE-S W OBRĘBIE BIAŁEK PEŁNIĄCYCH ROLĘ „MOLEKULARNEGO RUSZTOWANIA” - ISU/ISCU .....	55
4.2 TRANSFER CENTRUM FE-S Z HOLO-ISCU DO BIAŁKA DOCELOWEGO W FORMIE APO .....	61
4.2.2 TRANSFER CENTRUM FE-S Z ISCU DO FDX .....	63
4.2.3 TRANSFER CENTRUM FE-S Z ISCU DO FDX W OBECNOŚCI GRXD .....	64
4.2.4 TRANSFER CENTRUM FE-S Z ISCU DO FERRODOKSYNY FDX W OBECNOŚCI BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH HSCA/HSCB ..	65
4.2.5 WPŁYW DTT NA SZYBKOŚĆ TRANSFERU CENTRUM FE-S Z ISCU DO FDX .....	67
4.2.6 REKONSTYTUCJA TRANSFERU CENTRUM FE-S DO BIAŁKA DOCELOWEGO W OPARCIU O BIOSYNTEZĘ CENTRUM FE-S W OBRĘBIE ISCU OBEJMującĄ SYSTEM BIAŁEK FDX/FDXR I NADPH .....	68
<b>5 DYKUSJA .....</b>	<b>71</b>
<b>6 MATERIAŁY .....</b>	<b>82</b>
6.1 SZCZEPY BAKTERYJNE .....	82
6.2 PLAZMIDY .....	82
6.3 POŻYWKI DO HODOWLI BAKTERYJNYCH .....	86
6.4 INNE .....	86
6.5 ROZTWORY .....	86

<b>7</b>	<b>METODY .....</b>	<b>87</b>
7.1	IZOLACJA PLAZMIDOWEGO DNA.....	87
7.2	PRZYGOTOWANIE KOMÓREK KOMPETENTNYCH .....	87
7.3	TRANSFORMACJA KOMÓREK BAKTERYJNYCH.....	87
7.4	ELEKTROFOREZA W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE).....	87
7.5	BARWIENIE CZERNIĄ AMIDOWĄ .....	88
7.6	PRZYGOTOWANIE ZŁÓŻ CHROMATOGRAFICZNYCH.....	88
7.7	OCZYSZCZANIE BIAŁEK .....	89
7.8	OZNACZANIE STĘŻENIA OCZYSZCZONYCH BIAŁEK .....	101
7.9	DICHROIZM KOŁOWY .....	101
7.10	POMIAR AKTYWNOŚCI ATPAZOWEJ BIAŁEK HSP70 Z WYKORZYSTANIEM [GAMMA-P33]ATP .....	102
7.11	POMIAR AKTYWNOŚCI ATPAZY BIAŁEK HSP70 Z UŻYCIEM SYSTEMU SPRĘŻONYCH ENZYMÓW LDH/PK .....	102
7.12	POMIAR AKTYWNOŚCI ATPAZOWEJ BIAŁEK HSP70 Z WYKORZYSTANIEM ZESTAWU ENZCHEK PHOSPHATE ASSAY KIT FIRMY MOLECULAR PROBES .....	103
7.13	PRECYPITACJA KOMPLEKSÓW BIAŁKOWYCH ( <i>ANG. PULL-DOWN</i> ) .....	103
7.13.1	PRZYGOTOWANIE ZŁOŻA AGAROWEGO OPŁASZCZONEGO ZREDUKOWANYM GLUTATIONEM .....	103
7.14	ANALIZY EWOLUCYJNE .....	104
7.15	REKONSTRUKCJA CENTRUM FeS W OBRĘBIE MOLEKULARNEGO RUSZTOWANIA, BIAŁKA Isu1/IscU W OBECNOŚCI DTT.....	105
7.16	REAKCJA REKONSTRUKCJI BIOSYNTETY CENTRÓW FeS W OBRĘBIE ISC U W OPARCIU O OCZYSZCZONY ZESTAW BIAŁEK MASZYNERII ISC .....	106
7.16.4	PRZYGOTOWANIE BIAŁKA FDX W FORMIE APO.....	106
7.16.5	PRZYGOTOWANIE BIAŁKA GRXD W FORMIE APO .....	107
7.16.6	POMIAR TRANSFERU CENTRUM FeS Z ISC U DO BIAŁKA APO FDX .....	107
7.17	POMIAR TRANSFERU CENTRUM FeS Z ISC U DO BIAŁKA APO GRXD .....	108
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>109</b>

## Streszczenie

Centra żelazo-siarkowe to małe cząsteczki składające się z atomów żelaza i siarki, które tworzą grupy prostetyczne białek niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania. Kluczowym etapem biochemicznym w ich przypadku jest proces powstawania. Proces biogenezy centrów Fe-S można podzielić na dwa odrębne etapy: (i) syntezę Fe-S w obrębie wyspecjalizowanego białka pełniącego funkcję „molekularnego rusztowania” (ii) przeniesienie Fe-S z białka rusztowania do docelowego białka. Każdy z tych etapów wymaga udziału dedykowanych białek, które tworzą skomplikowane kompleksy wielobiałkowe.

Dobrze poznany jest system drożdżowy *Saccharomyces cerevisiae*, który stanowi od wielu lat przedmiot badań w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej. Mechanizm biogenezy centrów Fe-S u *S. cerevisiae* rozpoczyna się od syntezy centrum Fe-S na białku Isu1 (molekularnym rusztowaniu). W procesie tym biorą udział białka Nfs1(Isd11) (kompleks desulfurazy cysteinowej), Yfh1 (frataksyna), jak również Yah1(ferrodoksyna) i jej reduktaza Arh1. Po tym etapie białko Isu1 ze zrekonstruowanym centrum Fe-S jest transportowane dzięki obecności białka Hsc20 do białka Hsp70. Białko Hsc20 posiada domenę C-terminalną, która wiąże się z białkiem Isu1. Następnie Hsc20 oddziałuje poprzez N-terminalną domenę z białkiem Hsp70, co powoduje aktywację hydrolizy ATP do ADP, a to skutkuje zmianą konformacji białka Hsp70 i uwolnieniem centrum Fe-S z substratu Isu do białka docelowego. W systemie bakteryjnym *E. coli* również występuje dedykowana maszyna białkowa odpowiedzialna za proces biogenezy centrów Fe-S składająca się z białka IscU (molekularne rusztowanie), IscS (desulfuraza cysteinowa), Fdx (ferrodoksyna), CyaY (frataksyna), Fpr (reduktaza ferrodoksyny). W drugim etapie biorą udział białka opiekuńcze HscA i HscB. Główną różnicą między systemem bakteryjnym i drożdżowym jest obecność białka Mge1 – czynnika wymiany nukleotydów który jest niezbędny w systemie drożdżowym na etapie uwolnienia zhydrolizowanego ATP, a niewymagany jest w systemie bakteryjnym. Celem niniejszej pracy było porównanie bakteryjnych i eukariotycznych systemów Hsp70 funkcjonujących w biogenezie centrów żelazo-siarkowych. Przeprowadzona w naszym zespole analiza filogenetyczna wykazała, że HscA i Ssq1 są odlegle spokrewnione i że ortologi HscA nie występują w proteomach eukariotycznych. Ten wynik z kolei sugeruje scenariusz, w którym bakteryjny gen kodujący białko HscA został utracony podczas ewolucji mitochondriów, a jego rolę w biogenezie centrów Fe-S przejęło mtHsp70, przodek bakteryjnego wielofunkcyjnego białka Hsp70 DnaK. Ponadto wyniki naszej analizy filogenetycznej sugerują, że gen kodujący wyspecjalizowane białko Ssq1 jest produktem duplikacji genu kodującego białko mtHsp70, która wystąpiła u *S. cerevisiae*. Z drugiej strony najważniejsze pytanie dotyczyło tego, jak biochemicznie podobne lub różne są oba białka Hsp70 wyspecjalizowane w procesie biosyntezy centrów Fe-S.

W tym celu oczyściłam potrzebne komponenty z organizmów *S. cerevisiae*, *E. coli* oraz odpowiednik białka Isu1 z organizmu *Chaetomium thermophilum*, gdyż do dalszych analiz biochemicznych niezbędny był eukariotyczny preparat o wysokim stężeniu. W następnej kolejności aby sprawdzić aktywność oczyszczonych preparatów wykonałam doświadczenie pomiaru aktywności ATPazowej białek Hsp70 i ich stymulacji w obecności białek pomocniczych typu J i substratów. W celu weryfikacji czy oczyszczone białka oddziałują ze sobą zgodnie z cyklem ATPazowym wykonałam doświadczenie precypitacji kompleksów białkowych (*ang. pull-down*). Moja analiza porównawcza białek opiekuńczych Ssq1 i HscA wykazała uderzające podobieństwo we właściwościach biochemicznych obu układów.

Kolejnym etapem moich badań w ramach realizacji projektu doktorskiego było zbadanie roli białek opiekuńczych w procesie biogenezy centrów Fe-S. W tym celu na wstępie przeprowadziłam rekonstrukcję procesu biosyntezy centrum Fe-S w warunkach fizjologicznych w oparciu o białka systemu *E. coli*. To wymagało opracowania wydajnych procedur oczyszczania kompletu białek (IscS, CyaY, Fdx, Fpr) niezbędnych do efektywnej syntezy centrum w obrębie bakteryjnego białka IscU. Proces rekonstytucji centrum Fe-S monitorowałam z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego (CD, *ang. Circular Dichroism*). Z kolei do badań transferu centrów Fe-S z IscU do białek docelowych wykorzystywałam dwa bakteryjne białka akceptorowe ferrodoksynę (Fdx) oraz glutaredoksynę D (GrxD), oba w formie apo, czyli bez centrum Fe-S. Obserwacja transferu centrum Fe-S z Isu1 do Fdx, lub do GrxD była możliwa ze względu na różnice w widmach CD analizowanych białek.

Ostatnim etapem mojego projektu doktorskiego było zbadanie wpływu białek opiekuńczych systemu Hsp70 na proces transferu Fe-S z molekularnego rusztowania IscU do białek docelowych – Fdx i GrxD. Ta analiza pozwoliła mi pokazać znaczący wpływ bakteryjnych białek opiekuńczych w obecności ATP na wzrost szybkości transferu centrum Fe-S z IscU do GrxD. Uzyskane przeze mnie wyniki są w pełni zgodne z dotychczas opublikowanymi danymi *in vivo*, a opracowany przeze mnie model badawczy *in vitro* otwiera nam nowe możliwości badania wpływu mutacji, które zakłócają określone interakcje białko:białko, na wydajność procesów syntezy oraz transferu centrów Fe-S.

## Summary

Iron sulfur clusters are prosthetic groups of proteins crucial for their function. They consist of iron and sulfur atoms. Biogenesis of iron sulfur clusters is a complexed biochemical process, which we can divide into two steps. Firstly, (i) the iron sulfur cluster is synthesized on a specialized protein called molecular scaffold (ii) in the second step formed cluster is transferred to the target protein. The pathway requires the involvement of several different proteins which form protein multicomplexes.

In Laboratory of Biochemical Evolution, we are working on a well-known *Saccharomyces cerevisiae* yeast system. In this system at the first step Fe-S cluster is formed on a protein Isu (molecular scaffold). Several different proteins are involved in this process including Nfs1(Isd11) (cysteine desulfurase complex), Yfh1(frataxin), Yah1(ferredoxin) and its reductase Arh1. In the next step Isu1 with Fe-S cluster is transferred to the Hsp70 protein via Hsc20 protein. Hsc20 protein has a C-terminal domain, which binds Isu1. Afterwards the N-terminal domain of Hsc20 interacts with Hsp70 protein that results in ATP to ADP hydrolysis, a change of conformation of Hsp70 occurs, and the Fe-S cluster is released from the Isu protein and delivered to the apo protein. *Escherichia coli* system has also a dedicated protein machinery consisting of IscU (molecular scaffold), IscS (cysteine desulfurase), CyaY (frataxin), Fdx (ferredoxin) and ferredoxin reductase Fpr. In the second step *E.coli* chaperone system: HscA and HscB is involved. Main difference between these two systems is an involvement of the Mge1 protein (nucleotide exchange factor) in a yeast system, needed during the release of hydrolyzed ATP, whether in the case of *E.coli* system such component is not necessary.

The aim of this work was to compare bacterial and eukaryotic Hsp70 systems functioning in Fe-S cluster biogenesis. Phylogenetic analysis conducted in our laboratory showed that HscA and Ssq1 are distantly related and that the orthologs of HscA protein are not present in eukaryotic proteomes. This result suggested that the gene coding for HscA protein was lost during evolution of mitochondria, and the mitochondrial multifunctional Hsp70, which is the descendent of bacterial DnaK, took its role. Moreover, the results of our phylogenetic analysis suggest that the gene encoding the specialized Ssq1 protein is the product of a duplication of the gene encoding the mtHsp70 protein that occurred in *S. cerevisiae*. On the other hand, the main question was how biochemically similar or different both Hsp70 involved in Fe-S cluster biogenesis are.

To answer that question I needed to purify proteins from *S.cerevisiae*, *E.coli* and Isu1 from *Chaetomium thermophilum*, because of the high concentration of Isu protein required for biochemical analysis. To check if the purified proteins are active I performed the ATPase activity assay to determine the activity of Hsp70 proteins in the absence and in the presence of J- proteins and substrates to determine if they properly stimulate Hsp70 system. In order to check whether the purified proteins interact with each other according to the ATPase cycle, I performed pull-down experiments of protein complexes. My comparative analysis showed incredible similarities in biochemical properties of both systems.

Further research focused on the role of chaperones in the biogenesis process. For this purpose, I recreated the physiological environment for the reaction using *E.coli* proteins. Firstly, I developed protocols for efficient purification of *E.coli* proteins (IscS, CyaY, Fdx, Fpr) which are necessary for effective Fe-S cluster synthesis on IscU protein. To monitor whether proper Fe-S cluster is formed on IscU protein I used Circular Dichroism spectroscopy (CD). For transfer studies I used two different acceptor proteins ferredoxin (Fdx) and glutaredoxin D (GrxD), both in apo form without Fe-S clusters. During the experiment, I could distinguish if the transfer occurred to the Fdx or to GrxD because of the differences in CD spectra of those proteins.

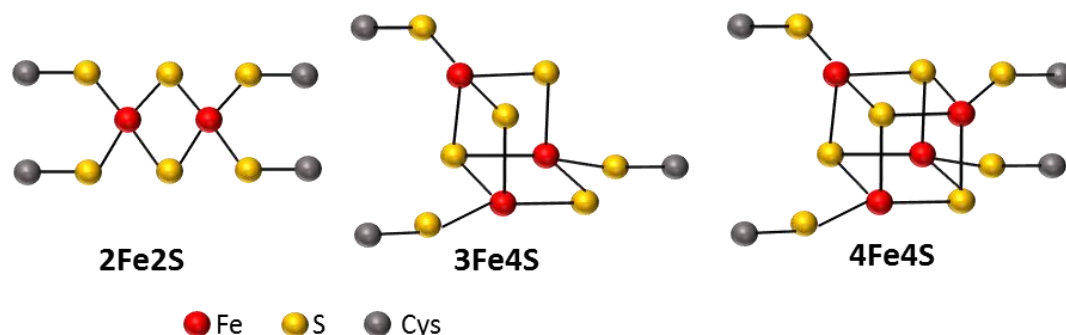
Finally, the last step of my PhD thesis was to verify the influence of the Hsp70 chaperone system on a transfer of Fe-S cluster from the molecular scaffold - IscU to the acceptor proteins - Fdx or GrxD. This analysis allowed me to show the significant effect of bacterial chaperones in the presence of ATP on the increase in the rate of Fe-S cluster transfer from IscU to GrxD. Obtained results are fully consistent with the *in vivo* data published so far. The *in vitro* research model I have developed opens up new possibilities for studying the impact of mutations that disrupt specific protein: protein interactions, on the efficiency of the synthesis and transfer of Fe-S clusters.



# 1 Wstęp

## 1.1 Centra żelazo siarkowe i ich występowanie w naturze

Centra żelazo-siarkowe są to małe grupy składające się z atomów żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$  lub  $\text{Fe}^{3+}$ ) i siarki ( $\text{S}^{2-}$ )(rycina 1). Stanowią jedną z najbardziej wszechobecnych oraz zróżnicowanych strukturalnie i funkcjonalnie grup prostetycznych w świecie biologicznym (1). Najczęściej występują w formie rombu  $[2\text{Fe} - 2\text{S}]$  i sześcianu  $[4\text{Fe} - 4\text{S}]$  (Rycina 1), jednakże scharakteryzowano również jeszcze bardziej złożone formy (2) (3). Biochemicznie centra Fe-S wykazują zdolność do wiązania i uwalniania elektronów (1). Ta unikalna właściwość chemiczna pozwala białkom zawierającym centra Fe-S pełnić różnorodne funkcje metaboliczne, począwszy od oczywistego udziału w reakcjach przenoszenia elektronów, redukcji siarki i azotanów, asymilacji azotu i biosyntezy kofaktorów, do mniej oczywistych ról na przykład w biogenezie rybosomów i naprawie DNA (1) (3) (4). Uważa się, że białka zawierające centra Fe-S ewoluowały, gdy stężenie tlenu w atmosferze ziemskiej było niskie. Później, gdy tlen pojawił się w drodze fotosyntezy, organizmy przystosowały się do ochrony ugrupowań Fe-S przed stresem oksydacyjnym. Wrażliwość centrów Fe-S na obecność tlenu jest czynnikiem utrudniającym ich głębsze poznanie. Z tego też powodu podczas rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie białek w warunkach *in vitro* są wymagane ściśle beztlenowe warunki (5). Obecność tlenu powoduje przekształcenie centrum Fe-S do niestabilnej formy, która bardzo szybko ulega rozkładowi.



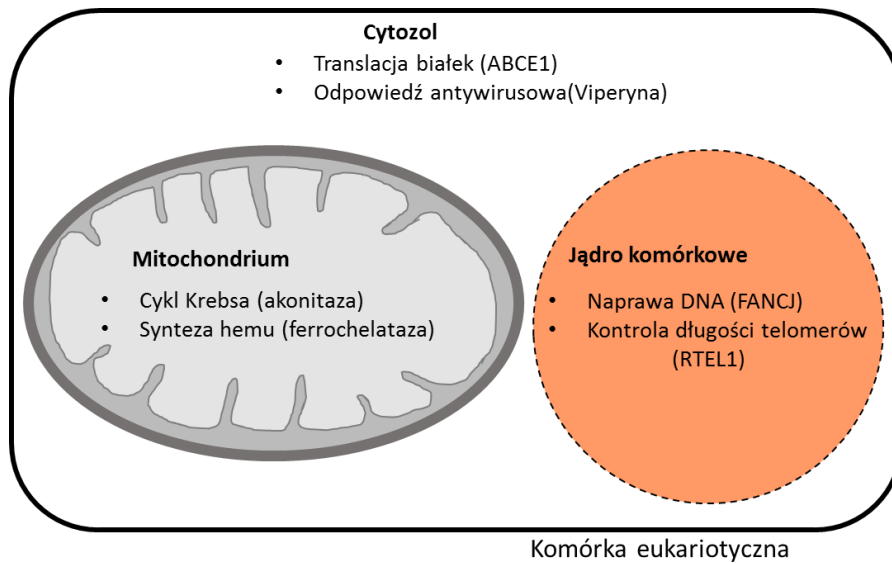
**Rycina 1** Struktura przykładowych najczęściej występujących centrów żelazo-siarkowych.

Na czerwono zaznaczone zostały atomy żelaza, na żółto atomy siarki, a na czarno reszty cysteinowe

### 1.1.1 Lokalizacja białek Fe-S w komórce

Eukariotyczne białka z centrum Fe-S zlokalizowane są w mitochondrium, cytozolu jak również w jądrze komórkowym (6)(rycina 2). W każdym z tych organelli pełnią inną funkcję w metabolizmie komórkowym. W mitochondrium znajduje się między innymi białko akonitaza, które do swojej aktywności potrzebuje czterech atomów żelaza (Fe) i 4 atomów siarki (S). Utrata jednego atomu żelaza powoduje, że akonitaza (rycina 3) uzyskuje centrum  $3\text{Fe}4\text{S}$  i staje się nieaktywna, ponieważ to właśnie ten czwarty wyeksponowany atom żelaza może wiązać substrat i wodę. Białko to odpowiedzialne jest za katalizę reakcji, podczas której

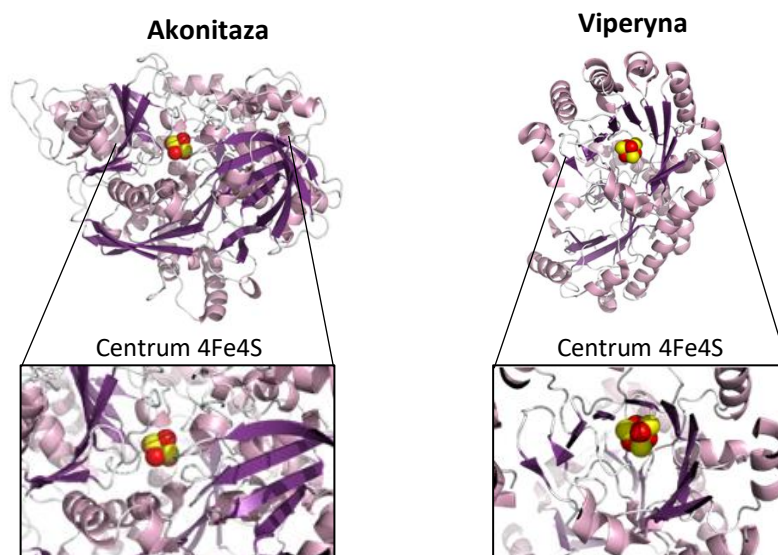
ma miejsce przekształcenie cytrynianu do izocytrynianu w cyklu Krebsa, czyli w centralnym szlaku metabolicznym, w którym utleniane są cukry, kwasy tłuszczowe i aminokwasy.



**Rycina 2 Lokalizacja przykładowych białek Fe-S w komórce eukariotycznej.**

Na schemacie zaznaczone zostały organella komórkowe komórki eukariotycznej wraz z przykładowymi białkami z centrami Fe-S niezbędnymi do ich prawidłowego funkcjonowania.

Z kolei w jądrze komórkowym znajdują się między innymi białka Fe-S odpowiedzialne za naprawę i replikację DNA, czy kontrolę długości telomerów (7) (8). Tą ostatnią funkcję pełni białko RTEL1, które posiada centrum Fe-S składające się z 4 atomów żelaza i 4 atomów siarki (4Fe4S). Natomiast w przestrzeni cytozolowej znajdują się białka funkcjonujące w metabolizmie aminokwasów, przy modyfikacjach tRNA, jak również podczas translacji białek.



**Rycina 3 Modele strukturalne białek Fe-S akonitazy i viperyny.**

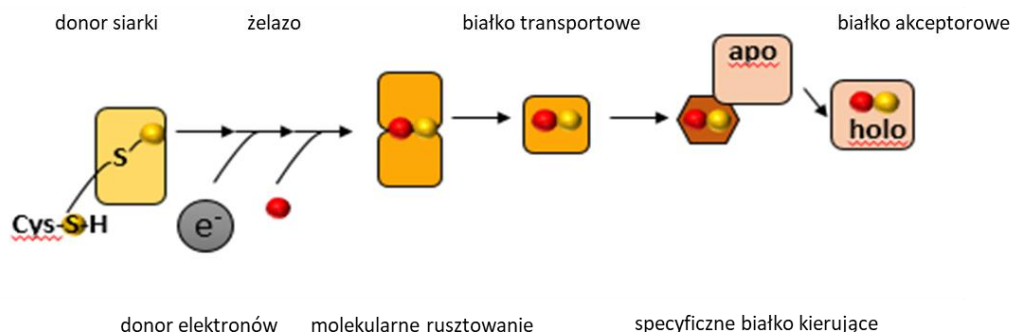
W obrębie struktur zaznaczone są centra żelazo-siarkowe, żelazo kolorem czerwonym, natomiast siarka kolorem żółtym. Źródło akonitaza : PDB id: 1ACO i viperyna PDB id: 5VSL

## 1.2 Biogeneza centrów żelazo-siarkowych

Prawdopodobnie na wstępie minerały siarczoków metali były wykorzystane podczas spontanicznego „dojrzewania” białek żelazo siarkowych w warunkach beztlenowych w pierwotnych komórkach. Obecnie proces biogenezy białek Fe-S we wszystkich współcześnie żyjących gatunkach wykorzystujących system centrów żelazo siarkowych wymaga asysty enzymatycznej. Liczne prace badawcze przeprowadzone w wielu laboratoriach na przestrzeni prawie 3 dekad wykazały, że biogenezę ułatwiają dość złożone maszyny wielu dynamicznie współpracujących białek. Zidentyfikowano i scharakteryzowano dedykowane systemy biosyntezy białek żelazo siarkowych w różnych gałęziach drzewa ewolucyjnego. Zaangażowane są one w syntezę *de novo* centrów Fe-S, które następnie dostarczają do białek docelowych. Około 1- 5% białek kodowanych przez genom prokariotyczny zawiera centra żelazo-siarkowe (9).

Do tej pory zidentyfikowano trzy różne białkowe systemy biogenezy centrów Fe-S. Pierwszy z nich, system NIF jest szczególnie zaangażowany w formowanie centrów Fe-S w obrębie złożonego białka - nitrogenazy, które pełni istotną rolę podczas asymilacji azotu i dlatego występuje głównie u bakterii azototroficznych, czyli wiążących azot. Drugi system to system SUF (*ang. Mobilization of SUIFur*), który występuje w wielu Archaea i u bakterii, zależnie od gatunku jako główny system biogenezy Fe-S lub drugorzędny aktywowany w warunkach stresowych. Trzeci system - maszyna ISC (*ang. Iron-Sulfur Cluster*) odpowiedzialna jest za syntezę centrów Fe-S w warunkach fizjologicznych i jest to system, który charakteryzuje się niską odpornością na stres wywołany niedoborem żelaza i obecnością wolnych rodników. Organizmy prokariotyczne zwykle zawierają system ISC oraz SUF. Niektóre gatunki bakterii jak *Escherichia coli* wykorzystują oba systemy, jednak białka tych dwóch systemów wykazują zróżnicowaną ekspresję w różnych warunkach środowiskowych i fizjologicznych.

Pierwsze ogólne koncepcje dotyczące molekularnego mechanizmu, który wyjaśniałby sposób biosyntezy centrów Fe-S, zakładały istnienie dawcy siarki i białka pełniącego rolę „molekularnego rusztowania”, w obrębie którego dochodzi do syntezy centrum Fe-S. (Rycina 4). Koncepcje te zostały pierwotnie potwierdzone podczas badań dotyczących wyspecjalizowanego systemu NIF, ale później okazało się, że mają one zastosowanie praktycznie w przypadku wszystkich innych systemów (10) (11) (12) (13) (14).



**Rycina 4** Ogólny model działania systemów białkowych zaangażowanych w biogenezę centrów Fe-S.

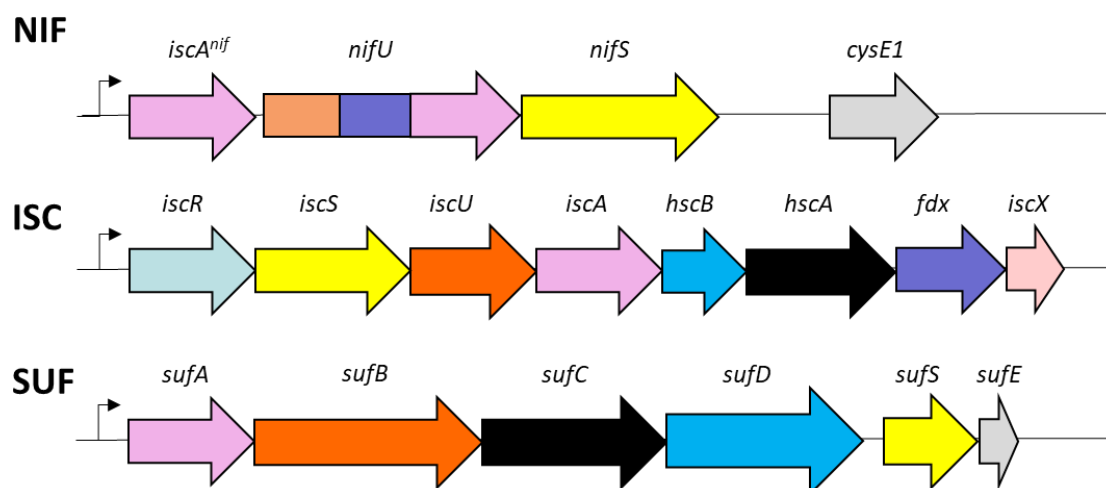
Praktycznie w obrębie wszystkich systemów biogenezy białek Fe-S możemy wyróżnić białko o aktywności desulfurazy cysteinowej, które dostarcza siarki – donor siarki (żółte kulki), białko zdolne

do transferu elektronów - donor elektronów (e<sup>-</sup>). Ponadto proces syntezy *de novo* centrum Fe-S w obrębie białka pełniącego funkcję „molekularnego rusztowania” wymaga żelaza (czerwone kulki). Kolejny etap wymaga udziału specyficznych białek transportowych, które przenoszą utworzone centrum Fe-S bezpośrednio do białek akceptorowych lub do specyficznych czynników kierujących, które uczestniczą we wbudowaniu centrów Fe-S poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkami docelowymi.

Z wyjątkiem niektórych Archaea, donor siarki jest członkiem rodziny desulfuraz cysteinowych zależnych od fosforanu pirydoksalu (PLP), której przodkiem jest białko NifS bakteryjnego systemu NIF (10). Bakteryjne białko IscS i mitochondrialne NFS1 systemu ISC, jak również SufS i Csd systemu SUF są blisko spokrewnione z NifS (15). Te dimeryczne enzymy przekształcają cysteinę w alaninę, towarzyszy temu uwolnienie siarki, która tworzy przejściową cząsteczkę nadsiarczku (-SSH) w obrębie konserwowanej reszty cysteinowej (Cys) w miejscu aktywnym enzymu. Cysteina przyjmująca nadsiarczek znajduje się na elastycznej pętli, która może się przemieszczać z miejsca syntezy nadsiarczku w pobliże miejsca wiązania PLP przez enzym (16) (17) (18) (19). Stamtąd siarka może zostać przeniesiona bezpośrednio lub poprzez białko przekaźnikowe (Rycina 4) do białka pełniącego rolę „molekularnego rusztowania”, tworząc w ten sposób nadsiarczek na konserwowanej reszcie cysteinowej rusztowania.

### 1.3 Systemy biogenezy centrów Fe-S u organizmów prokariotycznych

Badania genetyczne, biochemiczne i biologii komórki w latach 90. dostarczyły mocnych dowodów na to, że dojrzewanie białek Fe-S w żywych komórkach jest kontrolowanym procesem, w którym uczestniczy kilka złożonych maszyn białkowych. Badania te pozwoliły na identyfikację trzech różnych systemów, które są zaangażowane w biogenezę bakteryjnych białek Fe-S. System NIF, który odpowiada za specyficzne dojrzewanie nitrogenazy u bakterii azotoficznych (5,6) oraz systemy ISC i SUF, które generują białka Fe-S w warunkach normalnych i stresowych (7,8)(Rycina5). Analizy genomowe ujawniły, że liczba i rodzaj operonów kodujących te systemy różni się u poszczególnych mikroorganizmów. Niektóre zawierają wszystkie systemy, inne dwa lub tylko jeden, a niektóre zawierają tylko część jednego systemu (8-10). Wszystkie jednak mają te same podstawowe kluczowe składniki molekularne, które współpracują ze sobą w celu utworzenia centrów Fe-S.



**Rycina 5** Porównanie organizacji genów w operonach systemów NIF, ISC i SUF zaangażowanych w biogenezę centrów Fe-S. Geny lub regiony posiadające sekwencje homologiczne zostały oznaczone tymi samymi kolorami. W systemie NIF w obrębie genu *nifU* 3 kolory wskazują na różne domeny w obrębie białka modułowego.

### 1.3.1 NIF

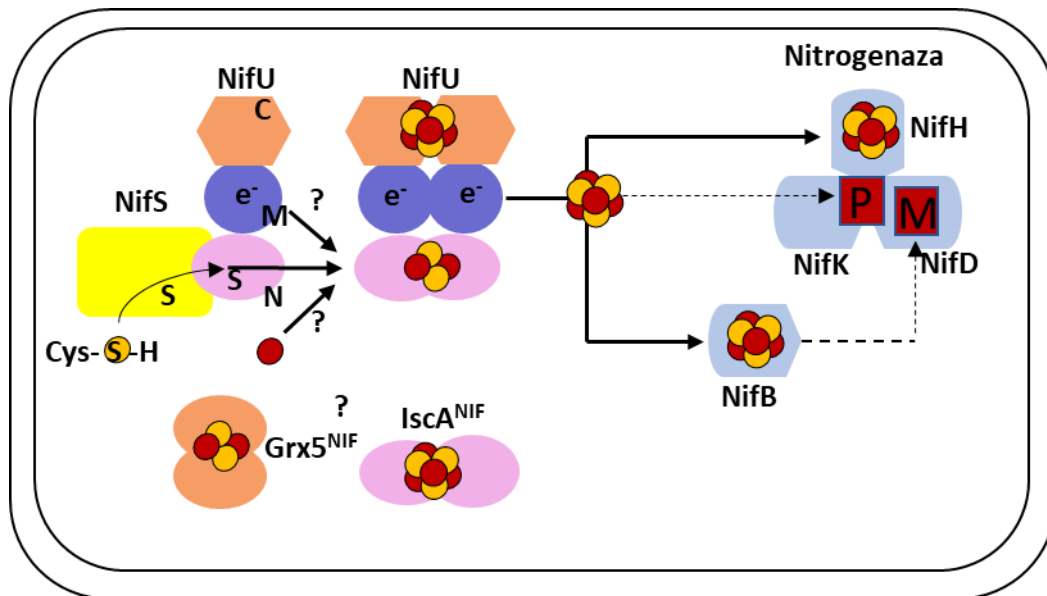
System NIF jest to pierwsza wielobiałkowa maszyna odkryta pod koniec lat 80 (20), która u bakterii wiążących azot odpowiada za wytwarzanie centrów 4Fe4S. Podstawowymi białkami biorącymi udział w procesie biogenezy są białka NifU (molekularne rusztowanie) i NifS (desulfuraza cysteinowa) (21) (22). NifS należy do I klasy desulfuraz zależnych od fosforanu pirydoksalu. (10) (13) (23). NifU jest białkiem modułowym, składającym się z trzech unikalnych domen funkcjonalnych; N-końcowej (NifU-N), centralnej domeny (NifU-M) i C-końcowej domeny (NifU-C) (24)(Rycina 6).

N-końcowy moduł NifU jest podobny do białka IscU zachowuje się jak typowe rusztowanie typu U, gdzie początkowo tworzy się centrum [2Fe-2S], które może być redukcyjnie sprzężone z drugim centrum [2Fe-2S], tworząc centrum [4Fe-4S]. Centra te są związane w sposób labilny. N-końcowe centrum jest wykorzystywane przede wszystkim podczas „dojrzewania” nitrogenazy, podczas gdy C-końcowe centrum może pełnić rolę pomocniczą w transferze centrum do innych docelowych apoprotein (25).

Chociaż podstawowy system NIF najwyraźniej wymaga znacznie mniejszej ilości białek do wytworzenia i transferu centrów [2Fe-2S] i [4Fe-4S] niż systemy ISC i SUF, to interesujące pytania pozostają otwarte, szczególnie te dotyczące pełnego zrozumienia funkcjonowania unikalnych domen białkowych NifU.

Dodatkowo w obrębie tego systemu znajdują się również inne czynniki odpowiedzialne za dojrzewanie centrów Fe-S enzymu nitrogenazy o bardziej skomplikowanej strukturze M[MoFe<sub>7</sub>S<sub>9</sub>C] i P[Fe<sub>8</sub>S<sub>7</sub>]. System NIF obejmuje także białka strukturalne enzymu nitrogenazy (heksamer składający się z NifH-NifDK), które są jednocześnie zaangażowane w proces powstawania enzymu (Rycina 6) (20) (26). Nitrogenaza jest złożonym enzymem bakteryjnym, który odpowiedzialny jest za katalizę reakcji redukcji azotu (N<sub>2</sub>) do amoniaku (NH<sub>3</sub>) w obecności ATP. Składa się ona z dwóch białek, katalitycznego białka molibdenowo-żelazowego (MoFeP) i jego specyficznej reduktazy, białka żelazowego (FeP). Procesy

przenoszenia elektronów i protonów związane z redukcją substratu są zsynchronizowane ze zmianami konformacyjnymi napędzanymi przez zależne od ATP interakcje FeP-MoFeP.

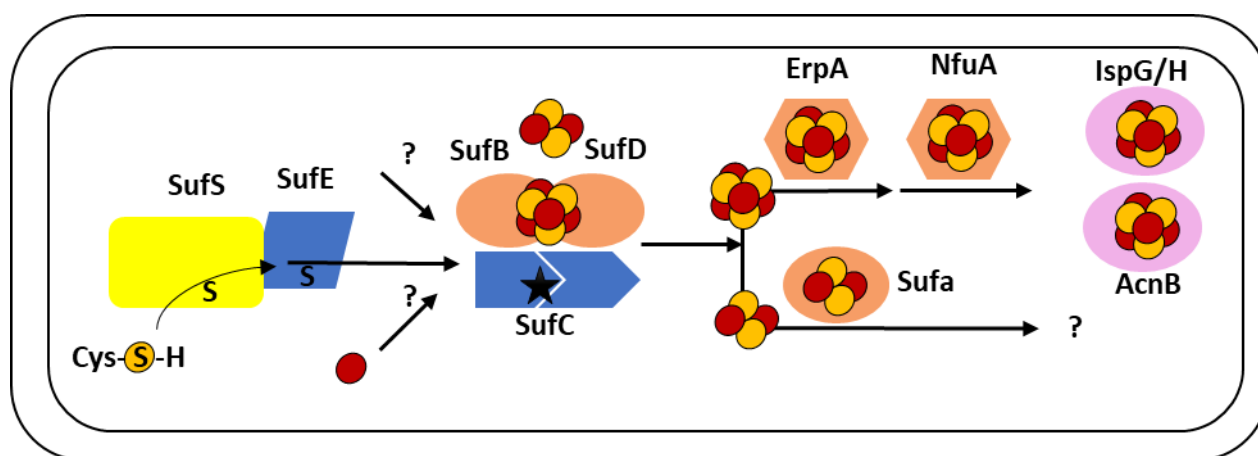


**Rycina 6 Model syntezy centrów Fe-S u bakterii azototroficznych w oparciu o białka systemu NIF.** Minimalnymi składnikami białkowymi potrzebnymi do wytwarzania centrów [4Fe4S] przez system NIF są desulfuraza cysteinowa NifS i trójmodułowe białko NifU. W obrębie NifU możemy wyróżnić N-końcowy fragment pełniący funkcję „rusztowania” dla nowo syntezowanych centrów Fe-S (N), centralny fragment pełniący funkcję ferredoksyny (M) i C-końcowy fragment, który stanowi domenę docelową dla centrum [4Fe4S] (C). Po syntezie centrum Fe-S w obrębie NifU jest ono następnie przekazywane do wiążącego ATP białka NifH lub jest dalej modyfikowane przez wyspecjalizowane czynniki systemu NIF w celu utworzenia centrów P i M (czerwone prostokąty), które są wbudowywane do podjednostek NifK i NifD. Enzym nitrogenazy składa się z dwóch kopii NifH i dwóch heterodimerów NifDK. Ponadto zidentyfikowano także inne składniki systemu NIF jak glutaredoksynę monotiolową Grx5<sup>NIF</sup>, czy białko typu A, które jest zaangażowane w transport centrów Fe-S, IscA<sup>NIF</sup>. Oba białka są również kodowane przez geny znajdujące się w operonach nif, ale ich miejsce działania nie jest jasne i wciąż jest kwestią debat środowiska naukowego. (27)

### 1.3.2 SUF

System SUF, zidentyfikowany we wszystkich trzech królestwach życia, jest szczególnie dobrze przystosowany do syntezy centrów Fe-S i dojrzewania białek docelowych w warunkach tlenowych i podczas ograniczonego dostępu żelaza. System SUF *E. coli* jest kodowany przez operon *sufABCDSE* w genomie bakteryjnym (28) (29) (30). Od momentu jego identyfikacji u *E. coli* stanowi on modelowy system badawczy w analizach, których celem jest poznanie molekularnych mechanizmów w oparciu o które działają systemy SUF (31) (32) (33). W porównaniu ze szlakiem ISC, system SUF ma inne pochodzenie filogenetyczne (34), jednak cały proces biogenezy centrów Fe-S w obrębie białek przebiega zgodnie z podobnymi zasadami biochemicznymi (Rycina 7). Funkcjonowanie co najmniej SUF lub ISC u *E. coli* jest niezbędne

do dojrzewania białek Fe-S IspG-IspH, które biorą udział w biosyntezie izoprenoidów, co czyni szlak biogenezy białek Fe-S niezbędnym szlakiem biosyntezy (35).



### Rycina 7 Model dojrzewania białek Fe-S u bakterii w oparciu o białka systemu SUF.

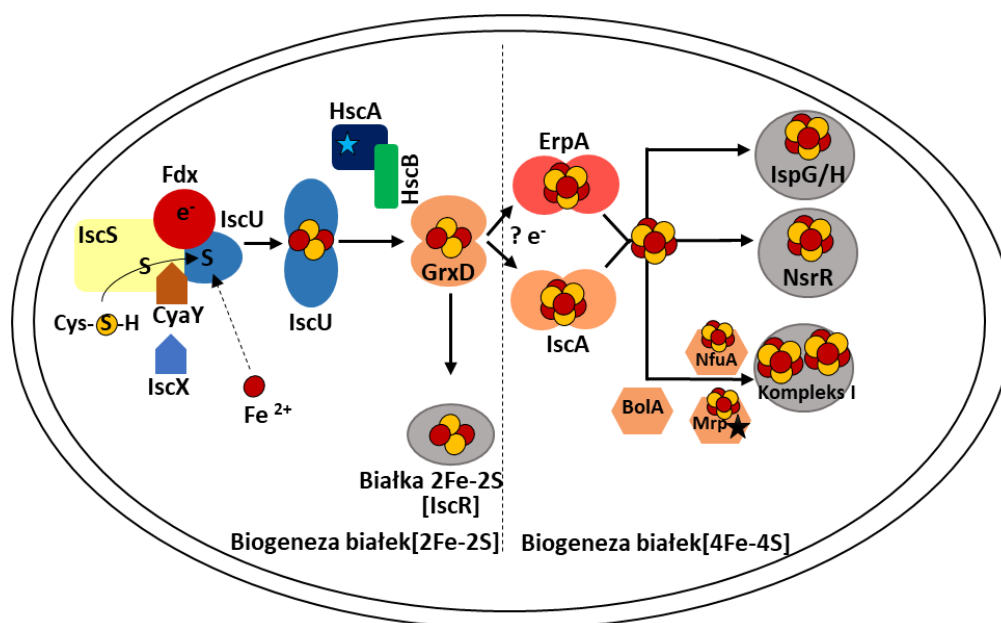
W bakteryjnym systemie SUF siarka jest uwalniana przez desulfurazę cysteinową SufS i przekazywana do białka SufB pełniącego rolę „molekularnego rusztowania”. W transferze siarki uczestniczy białko SufE. Synteza centrów Fe-S zachodzi w obrębie kompleksu białkowego SufBC<sub>2</sub>D. Wciąż nieznane jest źródło elektronów i żelaza w procesie biosyntezy centrów Fe-S, w który zaangażowane są składniki systemu SUF. Białko SufC, które ma aktywność ATPazową (★), reguluje syntezę lub uwalnianie centrów Fe-S. W zależności od gatunku bakterii, przemieszczanie centrów Fe-S i kierowanie do białek docelowych jest realizowane przy udziale białek typu A SufA i ErpA, które współpracują z białkiem NfuA (lub Nfu). Białka ErpA i NfuA są szczególnie wymagane w warunkach stresu oksydacyjnego (ROS) u bakterii *E. coli*. (27)

System SUF funkcjonuje w następujący sposób: na wstępie białko SufS uwalnia siarkę z cysteiny, która zostaje związana w centrum aktywnym białka w postaci nadsiarczku, w następnej kolejności siarka zostaje związana przez białko SufE, który jako przekaźnik przekazuje ugrupowanie siarkowe do białka pełniącego funkcję „molekularnego rusztowania”, w tym przypadku białka SufB (36) (37) (38). SufB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> jest tetramerycznym kompleksem białkowym złożonym z białek SufB oraz SufC, które jest ATPazą typu ABC. Niektóre organizmy, takie jak *E. coli*, zawierają również białko homologiczne do SufB - białko SufD, które tworzy tetramer SufBC<sub>2</sub>D. Źródłem elektronów w procesie syntezy centrów Fe-S, w który zaangażowane są komponenty systemu SUF, może być FADH<sub>2</sub> lub system tioredoksyny zależny od NADPH (38) (39) (40) (41). Eksperymenty genetyczne sugerują, że SufD ułatwia dostarczanie żelaza do miejsca montażu centrum Fe-S (41) (42) (43). Z drugiej strony nie zaobserwowano jednak wiązania żelaza z SufD *in vitro*. Centra [2Fe2S] albo [4Fe4S] mogą być składane w obrębie białka SufB lub kompleksu SufBCD *in vitro* (37) (44) (41) (45). W przypadku białka SufC zaproponowano, że hydroliza ATP może odgrywać istotną rolę podczas cyklu reakcji uczestniczących w regulacji zmian konformacyjnych kompleksu białkowego Suf (33) (38). Jeden model sugeruje, że hydroliza ATP otwiera powierzchnię dimeru SufB(D) podczas syntezy centrów Fe-S, podczas gdy drugi proponuje, że hydroliza ATP napędza uwalnianie centrum Fe-S. Nowo syntetyzowane centra Fe-S są następnie przenoszone do białek transportujących. Dobrze zbadanym przykładem takiego białka systemu SUF jest SufA, które jest białkiem typu A. Białko SufA zostało scharakteryzowane spektroskopowo jako białko

wiążące centrum 2Fe2S. Ponadto wykazano, że w obecności sztucznego czynnika redukującego DTT (ditiotreitola) może dostarczyć centrum Fe-S do docelowych białek, takich jak ferredoksyna Fdx, czy akonitaza (46) (47).

### 1.3.3 ISC

Klonowanie pierwszego bakteryjnego operonu *isc* z bakterii wiążących azot *A. vinelandii* otworzyło furtkę do scharakteryzowania bakteryjnej maszyny ISC jako systemu „porządkującego” biosyntezę białek Fe-S (48). Operon *isc* wyizolowano podczas poszukiwania drugiego białka o aktywności desulfurazy cysteinowej oprócz NifS, które jest wyspecjalizowane w „dojrzywaniu” nitrogenazy. To pozwoliło na identyfikację białka IscS. Oprócz IscS, operony *isc* z różnych bakterii kodują około siedmiu innych komponentów ISC, które w kolejnych latach zostały uzupełnione o dodatkowe czynniki ISC, które nie są kodowane w obrębie operonu *isc* (Rycina 8).



**Rycina 8 Model biogenezy białek [2Fe2S] i [4Fe4S] u bakterii w oparciu o białka bakteryjnego systemu ISC.**

Ścieżkę biosyntezy centrów Fe-S, która funkcjonuje w oparciu o składniki systemu ISC można podzielić na trzy etapy: i) syntezę *de novo* centrum [2Fe-2S] na białku rusztowania typu U (IscU), ii) dyslokację centrum i przeniesienie go na białko transportujące (GrxD), po czym następuje dojrzywanie białek [2Fe-2S] oraz iii) syntezę centrum [4Fe-4S] w obrębie białek ISC podobnych do IscA, po czym następuje transport i skierowanie centrum Fe-S do białek docelowych. Szlak biogenezy jest inicjowany przez uwolnienie siarki (żółte kółko) z wolnej cysteiny przez desulfurazę cysteinową (IscS), która przenosi nadsiarcezek na rusztowanie. Przeniesienie może być stymulowane przez białko frataksynę CyaY. W wyniku przeniesienia elektronów przez układ białek składający się z ferredoksyny (Fdx) i jej reduktazy (Fpr) powstaje siarczki, który łączy się z żelazem (czerwony okrąg), tworząc centrum [2Fe-2S],

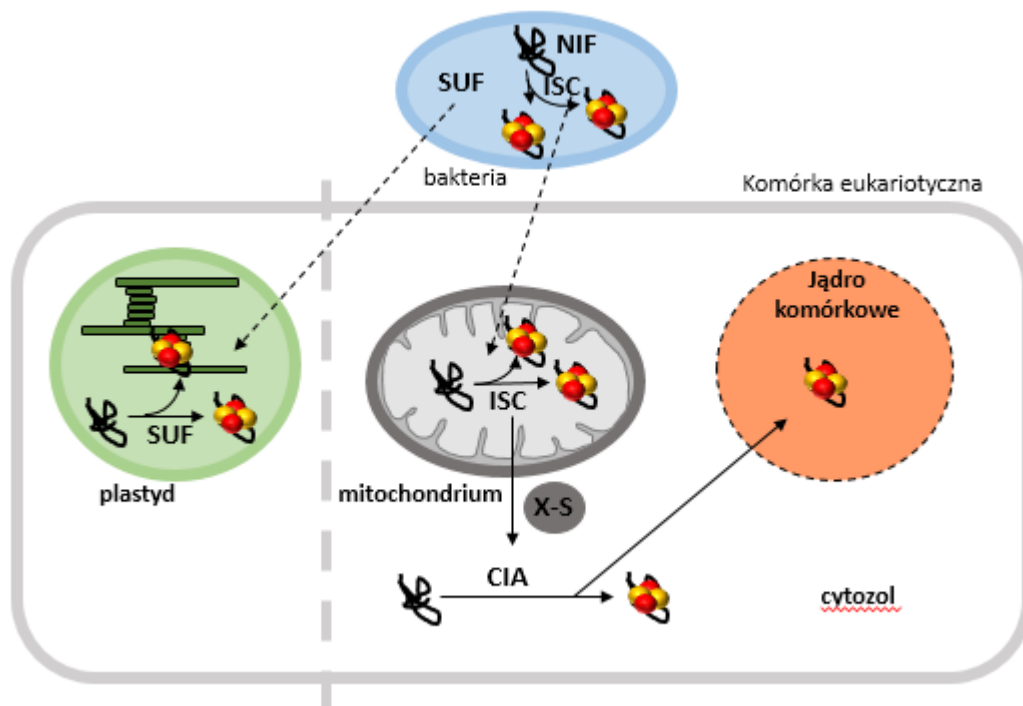


związane z dimerem białka IscU. Na drugim etapie, białko opiekuńcze Hsp70 wiążące ATP (★) (HscA) i jego dedykowane białko typu J (HscB) ułatwiają transfer centrum i jego przejściowe związanie z monotiolołą glutaredoksyną GrxD. Nie są znane żadne dodatkowe czynniki potrzebne do dojrzewania białek [2Fe-2S]. Na trzecim etapie synteza centrów [4Fe-4S], jest katalizowana przez bakteryjne białka typu A: ErpA i IscA poprzez redukcyjną fuzję centrów [2Fe-2S] pochodzących z GrxD. Centrum [4Fe-4S] jest następnie transportowane bezpośrednio lub za pośrednictwem różnych specyficznych czynników do docelowych białek w formie apo (27)

Proces biosyntezy centrów Fe-S w obrębie białek docelowych, w którym uczestniczą komponenty maszynerii ISC można podzielić na trzy etapy: i) synteza *de novo* centrum 2Fe2S na białku typu U – IscU, które pełni rolę „molekularnego rusztowania”, ii) przeniesienie centrum 2Fe-2S z IscU do białek docelowych przy współdziałaniu białek transportujących, takich jak glutaredoksyna monotioloła GrxD oraz iii) synteza centrów 4Fe4S w obrębie białek systemu ISC takich jak IscA, a następnie ich transfer do białek, które wymagają obecności centrum 4Fe4S (27). Podczas drugiego etapu, białko opiekuńcze z rodziny Hsp70 – HscA wraz z dedykowanym białkiem współpracującym typu J, HscB ułatwiają transfer centrum Fe-S oraz jego przejściowe wiązanie z monotiolołą glutaredoksyną GrxD. Do tej pory nie zidentyfikowano innych dodatkowych czynników, które byłyby potrzebne w trakcie „dojrzewania” białek 2Fe-2S. Trzeci etap, podczas którego ma miejsce synteza centrów 4Fe4S, wymaga redukcyjnej fuzji centrów 2Fe-2S. Proces ten jest katalizowany przez bakteryjne białka typu A ErpA i IscA, które mają swoje eukariotyczne odpowiedniki w mitochondriach. Elektrony do fuzji centrów są prawdopodobnie dostarczane poprzez łańcuch transportu elektronów, który obejmuje ferrodoksynę Fdx i jej reduktazę Fpr.

#### 1.4 Systemy biogenezy centrów Fe-S u organizmów eukariotycznych

W organizmach eukariotycznych około 1% białek zawiera centra żelazo siarkowe głównie typu 4Fe4S (około 70%) (49). Białka te zostały zlokalizowane w mitochondriach, plastydach, cytozolu, jądrze oraz w retikulum endoplazmatycznym, dlatego dla każdego z nich wymagane są specyficzne systemy maszynerii białkowych (rycina 10).



**Rycina 10 Model przedstawiający zależności pomiędzy różnymi eukariotycznymi systemami biogenezy centrów Fe-S oraz ich przypuszczalne pochodzenie ewolucyjne.**

Eukarionty zawierają białka Fe-S w mitochondriach, cytozolu i jądrze. Maszyna ISC zaangażowana w składanie centrów Fe-S w obrębie mitochondriów została prawdopodobnie odziedziczona z  $\alpha$ -proteobakterii, które są ewolucyjnymi przodkami tych organelli. System SUF obecny w plastydach komórek roślinnych (lewa część komórki eukariotycznej) został prawdopodobnie odziedziczony przez komórki eukariotyczne również w wyniku endosymbiozy, niemniej w tym przypadku bakterii zdolnej do fotosyntezy. Dojrzewanie cytozolowych i jądrowych białek Fe-S wymaga mitochondrialnej maszyny ISC, mitochondrialnego systemu eksportu ISC oraz cytozolowej maszyny biogenezy centrów żelazo-siarkowych (CIA). Te trzy systemy są wysoce konserwowane u eukariontów, od drożdży po ludzi i rośliny. Z kolei bakteryjny system NIF jest wyspecjalizowany w tworzeniu centrów Fe-S w obrębie nitrogenazy w bakterii azototroficznych. Na czerwono zaznaczone są atomy żelaza, na żółto atomy siarki, które wspólnie tworzą centra Fe-S. (27)

Badania które prowadzone są już od ponad 20 lat sugerują, że eukariotyczne maszyny biogenezy centrów Fe-S nie zostały opracowane *de novo*, ale zostały odziedziczone w procesie ewolucyjnym od różnych bakterii.  $\alpha$ -proteobakterie uznawane są za endosymbiotycznych przodków mitochondriów i to dzięki nim powstał mitochondrialny system ISC. Natomiast cyjanobakterie zdolne do fotosyntezy były punktem wyjścia w trakcie powstania plastydów podczas drugiego zdarzenia endosymbiotycznego „przenosząc” w ten sposób system SUF do eukariotycznych organelli. W innych gatunkach jak na przykład gatunki ameboidalne system NIF pozyskany został poprzez poziomy transfer genów prawdopodobnie z  $\epsilon$ -proteobakterii, najwyraźniej zastępując mitochondrialny system ISC (50). Za dojrzewanie poza mitochondrialnych białek Fe-S, włączając te znajdujące się w jądrze odpowiada powszechnie konserwowana maszyna CIA (*ang. cytosolic iron sulfur protein assembly*) w organizmach eukariotycznych. Większość składników maszyny CIA jest bardziej spokrewniona z białkami pochodzącymi z bakterii, niż z ich endosymbiotycznym gospodarzem (51) (52) (53).

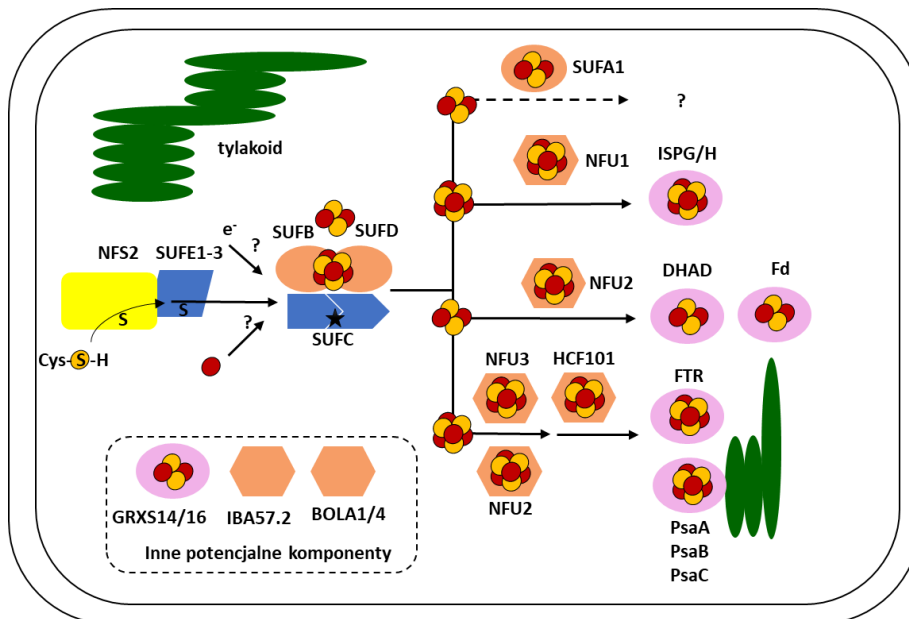
Systemy NIF, ISC i SUF są dobrze zbadane w bakteriach takich jak *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Mnogość sekwencji genomu wykazała ich wyraźną dystrybucję w różnych gałęziach filogenetycznych bakteryjnego drzewa ewolucyjnego (31) (32) (54). W przeciwieństwie do wersji bakteryjnych system SUF obecny w Archea jest nadal słabo poznany. Natomiast systemy mitochondrialne ISC i SUF badano głównie w grzybach (*Saccharomyces cerevisiae* i *Yarrowia lipolytica*), komórkach ludzkich, trypanosomach i roślinach. Większość białek z tych systemów jest wysoce konserwowana u eukariontów. Niemniej jednak biochemiczna analiza poszczególnych białek tych systemów ujawniła uderzające funkcjonalne cechy wspólne dla niektórych białek. Podobieństwa funkcjonalne dotyczyły między innymi ich zaangażowania w procesy syntezy centrów Fe-S *de novo*, transport centrów Fe-S, czy też w ich wbudowywanie do białek w formie apo. Ta wiedza umożliwiła zdefiniowanie nadrzędnych koncepcji mechanicznych leżących u podstaw złożonych biochemicznych szlaków biogenezy białek Fe-S.

W różnych organizmach lub przedziałach komórkowych maszynierie biogenezy centrów Fe-S zazwyczaj obejmują co najmniej 5, a czasem nawet do 18 różnych białek. Sama liczba białek uczestniczących w biosyntezie centrów Fe-S imponująco dokumentuje biochemiczną złożoność, która leży u podstaw syntezy prostych nieorganicznych grup prostetycznych jakimi są centra żelazo-siarkowe, a które są następnie specyficznym wbudowywane do łańcuchów polipeptydowych białka akceptorowego. Złożony szlak fizjologiczny kontrastuje z chemiczną rekonstrukcją białek żelazo-siarkowych, która jest stosunkowo prostą metodą *in vitro* wymagającą jedynie żelaza i siarki oraz odpowiednich warunków redukujących i beztlenowych (55).

### 1.4.1 SUF

Eukariotyczny system SUF znajduje się przede wszystkim w organizmach eukariotycznych zawierających plastydy. Do tej pory został on najlepiej poznany w chloroplastach, czyli w fotosyntetycznie aktywnych plastydach występujących w roślinach lądowych. Organelle te powstały na skutek pierwotnej endosymbiozy, podczas której eukariotyczna komórka gospodarza zawierająca mitochondria pochłonęła sinicę, która w trakcie dalszej ewolucji została zredukowana do pierwotnego plastydu (56) (57). W modelowym organizmie *Arabidopsis thaliana*, wszystkie geny *suf* zostały przeniesione do jądra, a zatem kodują N-końcowy peptyd, który ukierunkowuje syntetyzowane białko do chloroplastów (58) (59). Rdzeń plastydowego układu SUF jest prawie identyczny pod względem składu i funkcji z układem bakteryjnym, jednak z duplikacjami genów i pewnymi modyfikacjami w obrębie komponentów systemu biogenezy centrów Fe-S (jak np. dodatkowe moduły, czy domeny) (Rycina 10). System SUF uczestniczący w biogenezie centrów Fe-S *de novo* w plastydach *A. thaliana* obejmuje desulfurazę cysteinową NFS2 (homolog SufS; (60) (61), trzy izoformy SUFE, kompleks białkowy SUFBC<sub>2</sub>D, który pełni rolę „molekularnego rusztowania” dla nowo syntetyzowanych centrów Fe-S oraz białko SUFA1 (Rycina 11). Trzy izoformy białka SUFE ulegają zróżnicowanej ekspresji w różnych tkankach roślinnych i znacznie zwiększają aktywność białka NFS2 (62) (63). Co ciekawe, SUFE1 ma dodatkową C-

końcową domenę BOLA, a SUFE3 zawiera dodatkową C-końcową domenę NadA. Stwierdzono, że kompleksy białkowe SUFSE i SUFBC2D są zaangażowane w „dojrzewanie” Fe-S w chloroplastach (61) (64). Ponadto w skład eukariotycznego systemu SUF wchodzi szereg komponentów, które oddziałują z „molekularnym rusztowaniem”, SUFBC2D i mogą pełnić funkcje ukierunkowujące centra Fe-S do określonych białek docelowych. W obrębie tych białek można wyróżnić takie białka jak SUFA1, NFU1–3, BOLA1/4, GRXS14/16, IBA57.2, HCF101. Zidentyfikowane do tej pory tego typu czynniki są spokrewnione z białkami *E. coli*, Niemniej co ciekawe część jest homologiczna do bakteryjnych białek systemu ISC, a nie do ich wersji wchodzących w skład systemu SUF (Rycina 11).



**Rycina 11 Schemat działania systemu SUF w organizmach eukariotycznych**

Eukariotyczny system SUF przypomina system bakteryjny. Siarka jest uwalniana przez desulfurazę cysteinową NFS2 i przekazywana do SUFB pełniącego rolę „molekularnego rusztowania”. W transferze siarki uczestniczy białko SUFE1-3. Synteza centrów Fe-S zachodzi w obrębie kompleksu białkowego SUFBC<sub>2</sub>D. Wciąż nieznane jest źródło elektronów i żelaza w procesie biosyntezy centrów Fe-S, w który zaangażowane są składniki systemu SUF. Białko SUFC, które ma aktywność ATPazową (★), reguluje syntezę lub uwalnianie centrów Fe-S. Białka uczestniczące w przeniesieniu centrum do białka docelowego są inne niż w przypadku systemu bakteryjnego, mianowicie NFU2 wiąże zarówno [2Fe-2S] i [4Fe-4S], w przeciwieństwie do NFU1, który wiąże centra [4Fe-4S]. HCF101, zawierające zarówno domenę DUF59, jak i Mrp, działa w procesie dojrzewania reduktazy ferredoksyny-tioredoksyny (FTR) i fotosystemu I (PsaA/B/C). (27)

Eukariotyczny SUF system w chloroplastach przypomina system bakteryjny i funkcjonuje w oparciu o podobne etapy syntezy i transferu centrum Fe-S, jak system prokariotyczny. Niektóre elementy są duplikowane wielokrotnie (SUFE1–3 i NFU1–3), idealnym przykładem może być w tym przypadku modelowy organizm roślinny *A. thaliana*. Unikalną cechą trzech plastydowych homologów NFU1 (NFU1-3) *A. thaliana* jest obecność dwóch domen NFU1 w każdym homology, gdzie tylko domena N-końcowa wiąże centra Fe-S. *In vivo*, wiązanie centrów Fe-S w plastydach przez cząsteczki zwane sideroforami wydaje się być silnie uzależnione od białek NFU1 (NFU1-3) (Rycina 11) (65) (66) (67) (68). W podsumowaniu można stwierdzić, że system SUF jest „stary” ewolucyjnie i z czasem doszło do jego

zróznicowania. To zróznicowanie zostało wymuszone przez powstanie nowych białek docelowych u roślin i alg (34). Systemy SUF obecne w tych organizmach zostały tak zmodyfikowane, aby móc efektywnie katalizować „dojrzewanie” białek Fe-S w tych organizmach w różnych warunkach środowiskowych, korzystając z dostępnych źródeł składników odżywczych.

### 1.4.2 ISC

W ciągu ostatnich lat odkryto wiele dodatkowych białek, które biorą udział w procesie mitochondrialnej biogenezy białek Fe-S (Rycina 12). Większość podstawowych genów systemu ISC jest niezbędna do przeżycia drożdży, ponieważ biogeneza białek Fe-S jest jedną z podstawowych funkcji mitochondriów, a obecność tych grup prostetycznych jest istotna dla aktywności wielu kluczowych białek (69). Zależność żywotności komórek od obecności podstawowych genów ISC została przypisana roli mitochondrialnego systemu ISC, który współpracuje z systemem eksportu ABCB7 (odpowiednikiem drożdżowym jest białko Atm1). System ten niezbędny jest do wytwarzania związku zawierającego siarkę (i być może żelazo) krytycznego dla biogenezy poza mitochondrialnych białek Fe-S.

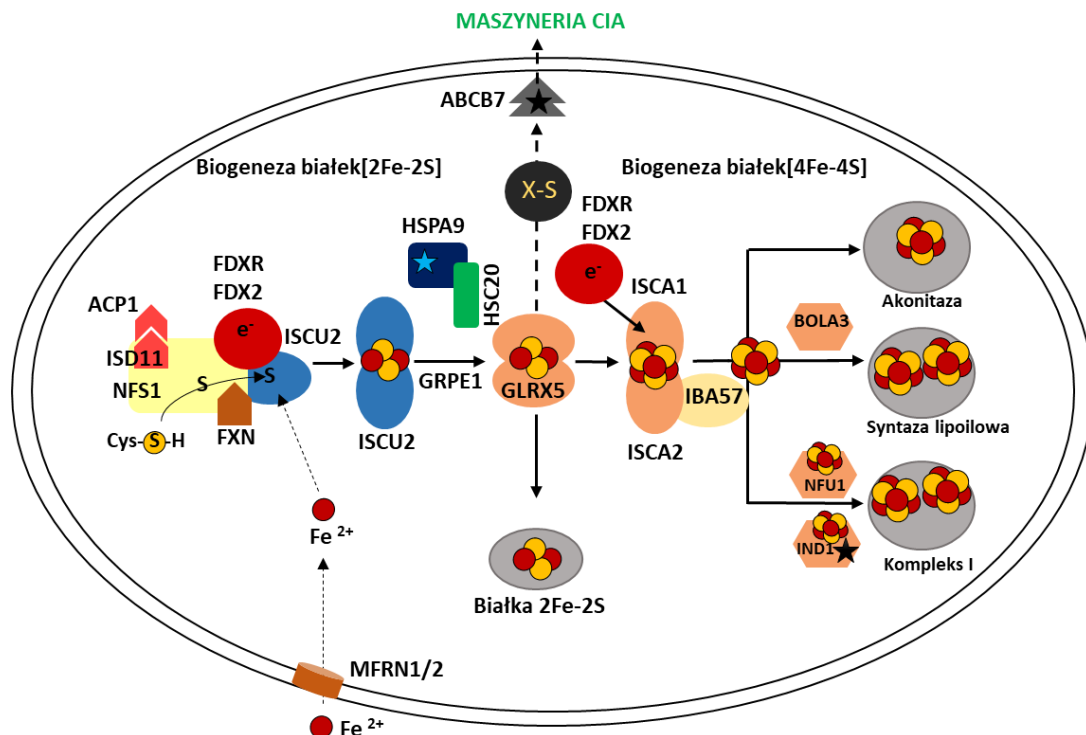
Mitochondrialna maszyneria ISC obejmuje do 18 białek (w zależności od organizmu), z których wszystkie są kodowane w jądrze, ulegają translacji w cytozolu i są importowane do macierzy mitochondrialnej (70). Lokalizacja białek systemu ISC jest determinowana poprzez N-końcowe presekwencje kierujące do mitochondrii. Większość z tych białek jest wysoce konserwowana, od drożdży po komórki ludzkie (Rycina 12), ale w obrębie drzewa ewolucyjnego eukariontów zidentyfikowano kilka interesujących wyjątków od „klasycznej” sytuacji (71). W głównej mierze ów wyjątki wiązały się z dopasowaniem analizowanego organizmu do funkcjonowania w odpowiedniej niszy ekologicznej lub z określonym stylem życia organizmu.

Proces ten rozpoczyna się od importu  $Fe^{2+}$  do macierzy mitochondrialnej przez białko nośnikowe mitoferrynę 1/2 (MFRN1/2; drożdże Mrs3/4) w sposób zależny od siły protonomotorycznej (pmf) (Rycina 11). Siarka do syntezy *de novo* [2Fe-2S] jest dostarczana przez desulfurazę cysteinową (NFS1), która jest podobna w budowie i funkcji do bakteryjnej desulfurazy, jednak dodatkowo tworzy ścisły kompleks z komponentami regulacyjnymi ISD11 i ACP1. ISD11 należy do rodziny białek LYRM, które biorą udział w montażu i stabilizacji kompleksów mitochondrialnych (49) (72) (73) (74) (75) (76), ale nie znaleziono do tej pory odpowiednika bakteryjnego. Kompleks ISD11-ACP1, wiążąc się z dimerem NFS1, stabilizuje desulfurazę i umożliwia wydajną syntezę centrów Fe-S. Na skuteczność wiązania ACP1 z ISD11, a tym samym na jego funkcję regulacyjną, ma wpływ wstawienie łańcucha acylowego do potrójnej helisy ISD11 (18). Długie łańcuchy acylowe (C12-16), syntetyzowane przy dużej dostępności źródła węgla, stabilizują kompleks NFS1-ISD11-ACP1, podczas gdy krótkie łańcuchy utrudniają wiązanie ACP1 do ISD11, zmniejszając tym samym aktywność syntezy centrów Fe-S (49) (74). Ten mechanizm regulacyjny zapewnia bezpośrednie sprzężenie zwrotne między stanem metabolicznym, a efektywnością biogenezy białek Fe-S.

W drugim etapie nowo utworzone centrum [2Fe-2S] jest uwalniane przy współpracy z białkami opiekuńczymi (HSC20, HSPA9; u drożdży są to odpowiednio Hsc20 i Ssq1) i przenoszone jest do monotiolowej glutaredoksyny GLRX5 (77) (78) (79). Cykl białek opiekuńczych wydaje się być dość podobny do cyklu systemu bakteryjnego z dwiema

znaczącymi różnicami (Rycina 11). Po pierwsze, wymiana ADP-ATP w obrębie mitochondrialnego Hsp70, która prawdopodobnie skutkuje uwolnieniem ISCU2 i powrotem Hsp70 do formy ze związanym ATP wymaga współpracy z czynnikiem wymiany nukleotydów GRPE1 (drożdżowy odpowiednik to białko Mge1), podczas gdy u bakterii białko Hsp70, HscA, nie wymaga współpracy z białkiem GrpE (odpowiednik GRPE1). Po drugie, u drożdży wykazano, że wspomagany przez białka opiekuńcze transfer [2Fe-2S] z Isu1 do Grx5 jest wspierany przez bezpośrednie oddziaływanie między Grx5 i Ssq1 (80). Jednoczesne wiązanie Isu1 oraz Grx5 w obrębie Ssq1 może zwiększać efektywność przenoszenia centrów Fe-S. Na ostatnim etapie centrum [2Fe-2S] związane z Grx5 jest wstawiane do białka docelowego (Rycina 12). Reakcja ta może zachodzić w ciągu sekund bez dalszej pomocy białek ISC, naśladując w ten sposób system bakteryjny (81).

Trzeci etap obejmuje syntezę centrów [4Fe-4S] oraz ich dostarczenie do białek docelowych. Badania *in vivo* przeprowadzone z wykorzystaniem różnych organizmów wykazały, że współdziałające białka ISCA1-ISCA2-IBA57 są niezbędne dla utworzenia mitochondrialnego centrum [4Fe-4S], ale nie do syntezy centrów [2Fe-2S] (Rycina 12) (82) (83) (84) (85). Potwierdziły to również przeprowadzone badania *in vitro*, które wykazały że dwa centra [2Fe-2S] pochodzące z GLRX5 mogą zostać przekształcane w centrum [4Fe-4S] w obrębie kompleksu ISCA1-ISCA2. Konwersja centrów wymagała obecności IBA57 i łańcucha białkowego FDXR-FDX2 zaangażowanego w przeniesienie elektronów z NADPH do sprzężenia redukcyjnego (81). Wbudowanie centrum [4Fe-4S] do akonitazy może nastąpić bez udziału dodatkowych białek, niemniej czynnik ukierunkowujący NFU1 może w pewnych warunkach odgrywać rolę pomocniczą (81). Z drugiej strony dojrzewanie większości innych mitochondrialnych białek [4Fe-4S] nie jest możliwe bez udziału białek pomocniczych jak np. NFU1 i BOLA3, które są szczególnie potrzebne do dojrzewania syntazy lipoilowej, czy IND1 (zwanego również NUBPL), które jest wymagane podczas dojrzewania I kompleksu oddechowego (86) (87) (27).



**Rycina 12 Model biogenezy białek [2Fe2S] i [4Fe4S] w oparciu o białka mitochondrialnego systemu ISC.**

Ścieżkę tę można podzielić na trzy etapy: i) syntezę *de novo* centrum [2Fe-2S] na białku typu U, które pełni rolę „molekularnego rusztowania” (ISCU2), ii) dyslokację centrum i przeniesienie go na białko transportujące (GLRX5), po czym następuje dojrzewanie białka [2Fe-2S] oraz iii) syntezę centrum [4Fe-4S] na białkach ISC podobnych do ISCA, po czym następuje transport i skierowanie centrum Fe-S do białek akceptorowych w formie apo. Szlak biogenezy jest inicjowany przez uwolnienie siarki (żółte kółko) z wolnej cysteiny przez desulfurazę cysteinową (NFS1), która przenosi nadsiarczek na rusztowanie. Przeniesienie może być stymulowane przez białko frataksynę FXN. W wyniku przeniesienia elektronów z NADPH przez system białkowy składający się z ferredoksyny (FDX2) i jej reduktazy (FDXR) powstaje siarczek, który łączy się z żelazem (czerwony okrąg), tworząc centrum [2Fe-2S], związany z dimerem białek ISCU2. Na drugim etapie, białko opiekuńcze Hsp70 (HSPA9) wiążące ATP (★) i jego dedykowane białko typu J (HSC20) ułatwiają transfer centrum i jego przejściowe związanie z monotiolową glutaredoksyną GLRX5. Nie są znane żadne dodatkowe czynniki potrzebne do dojrzewania białek [2Fe2S]. Ma trzecim etapie ma miejsce synteza centrów [4Fe-4S]. W mitochondriach jest katalizowana przez system białek ISCA1-2 i IBA57 poprzez redukcyjną fuzję centrów [2Fe-2S] pochodzących z GLRX5. Elektrony do fuzji centrów na ISCA1-ISCA2 są ponownie dostarczane przez mitochondrialną ferredoksynę FDX2 i jej reduktazę FDXR, a ich źródłem jest NADPH. Centrum [4Fe-4S] jest następnie transportowane bezpośrednio lub za pośrednictwem różnych specyficznych czynników do dedykowanych apobiałek. W mitochondriach podstawowa maszyna ISC jest niezbędna do wytworzenia zawierającego siarkę (i być może żelazo) składnika X-S, który jest eksportowany do cytozolu przez białko transportujące wewnętrznej błony mitochondrialnej - białko ABCB7. Białko to jednocześnie wspiera maszynę CIA i jest zaangażowane w regulację homeostazy żelaza w komórce. (27)

W przeciwieństwie do bakteryjnego systemu ISC, mitochondrialna frataksyna FXN odgrywa ważną rolę w biogenezie białek Fe-S, jednak u drożdży nie jest ona niezbędna dla ich

przeżycia, jak inne białka mitochondrialnego systemu ISC. Z kolei u myszy delecja genu jest śmiertelna podczas rozwoju embrionalnego, natomiast u ludzi zmniejszona ilość funkcjonalnego białka FXN powoduje chorobę neurodegeneracyjną - ataksję Friedreicha (88) (89). W oparciu o ostatnie badania zaproponowano funkcję frataksyny w ułatwianiu transferu nadsiarczku z NFS1 do ISCU2 (90) (91). Wcześniejsze doniesienia sugerowały rolę FXN w dostarczaniu żelaza, jednak ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że żelazo może bezpośrednio wiązać się z ISCU2. Zaangażowanie łańcucha przenoszenia elektronów składającego się z ferrodoksyny i jej reduktazy (FDX2,FDXR) we wczesnym etapie syntezy centrów Fe-S zostało potwierdzone zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (90) (92) (93).

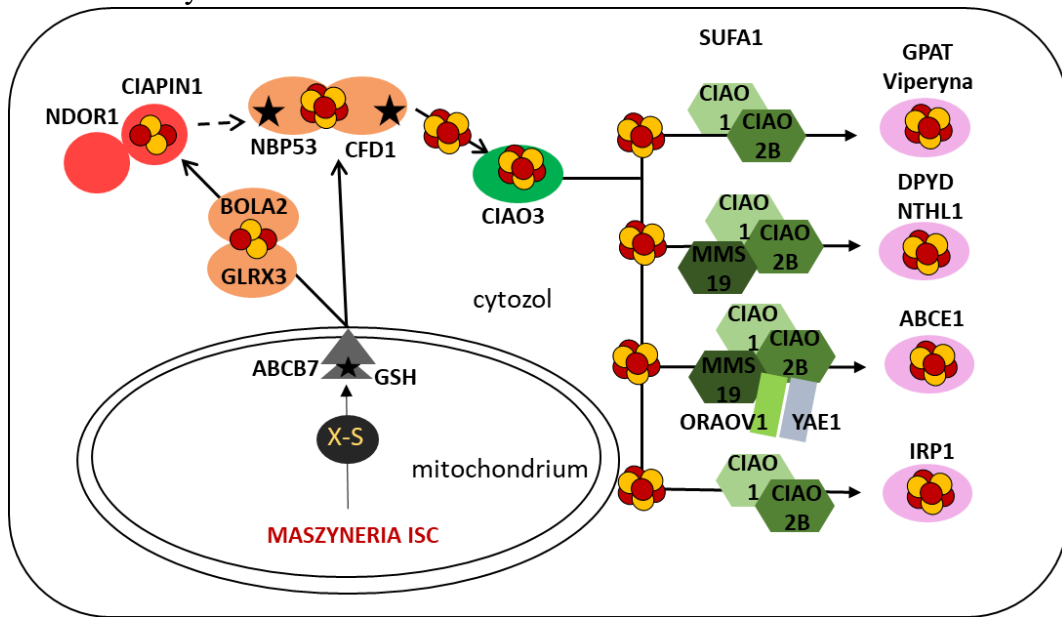
### 1.4.3 CIA

Cytozolowa maszyneria CIA jest w pełni zależna od funkcjonalnego mitochondrialnego systemu ISC, który to generuje niezidentyfikowany do tej pory związek zawierający siarkę X-S w oparciu o siarkę uwolnioną z cysteiny w reakcji katalizowanej przez mitochondrialny kompleks desulfurazy cysteinowej (94) (95). Ostatnie badania *in vitro* sugerują, że również żelazo może być częścią związku X-S (96). W proces transportu związku X-S do cytozolu zaangażowany jest mitochondrialny transporter ABC – białko ABCB7. Transport ten jest zależny od obecności glutationu (GSH)(Rycina 13) (97).

W obrębie maszynerii CIA można wyróżnić maksymalnie 11 komponentów (plus białka GLRX3 i BOLA2), które są strukturalnie różne od większości mitochondrialnych białek systemu ISC (98) (99) (100) (101). Większość białek CIA jest kodowana przez geny drożdży i człowieka, które są niezbędne do przeżycia. Co koreluje z faktem, że białka te są zaangażowane w „dojrzewanie” licznych kluczowych cytozolowych i jądrowych białek Fe-S. Szlak biochemiczny, w który zaangażowane są białka systemu CIA, został przeanalizowany poprzez złożone analizy *in vivo*, których wyniki pomogły zaproponować funkcje biochemiczne oraz kolejność działania komponentów maszynerii CIA (102). Proces biosyntezy centrów Fe-S w oparciu o udział białek systemu CIA można podzielić na dwa główne etapy, i) syntezę centrum 4Fe4S w obrębie kompleksu białkowego, który pełni rolę „molekularnego rusztowania” CFD1-NBP35, ii) a następnie transfer i wbudowanie centrum 4Fe4S do docelowych białek, w który to proces są zaangażowane różne czynniki (103) (104) (105). Białka NBP35 i CFD1 należą do podrodziny NTPaz wiążących metale, które przejściowo wiążą różne kofaktory metali podczas składania metaloprotein. NBP35 i CFD1 tworzą heterodimery i -tetramery, które wiążą ATP lub GTP i posiadają powolnie działającą aktywność NTPazy (106). Pokazano, że nowo utworzone centrum 4Fe4S jest wiązane przez dwie konserwowane reszty Cys znajdujące się w odsłoniętej pętli w obrębie każdego z białek (103) (107). Ta architektura wydaje się idealna zarówno dla syntezy, jak i transferu przejściowo związanego centrum. Synteza centrów [4Fe-4S] na rusztowaniu NBP35-CFD1 wymaga, oprócz zaangażowania mitochondrialnego systemu ISC oraz białka transportującego ABCB7, także stałego dopływu elektronów. Źródłem elektronów jest NADPH i są one dostarczane przez oksydoreduktazę NDOR1, która współpracuje z białkiem Fe-S - CIAPIN1 (odpowiednikami zidentyfikowanymi w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* są białka Tah18 i Dre2) (108) (109). Przepływ elektronów między drożdżowymi białkami Tah18 i Dre2 został bezpośrednio zademonstrowany, niemniej dokładna rola zredukowanego Dre2 jako potencjalnego donora elektronów oraz cel jego działania nie zostały do tej pory zbadane. CIAPIN1-Dre2 zawiera dwa centra Fe-S, jedno typu



[2Fe-2S], podczas gdy drugie może być zarówno 2Fe2S (CIAPIN1) lub [4Fe-4S] (Dre2) (110). Synteza tych centrów jest w pełni zależna od obecności funkcjonalnych komponentów mitochondrialnej maszyny ISC, ale również wymaga udziału cytozolowego kompleksu GLRX3-BOLA2 u ludzi. Natomiast homologiczne białko drożdżowe Bol2 do białka BOLA2 jest zbędne w tym procesie (111). Centrum [4Fe-4S] związane z CFD1-NBP35 jest następnie uwalniane i przekazywane do większości cytozolowych i jądrowych docelowych białek Fe-S. W procesie tym uczestniczy białko CIAO3 (wcześniej opisywane jako IOP1 lub NARFL; drożdżowym odpowiednikiem jest białko Nar1) oraz kompleks CTC (CIAO1, CIAO2B i MMS19; drożdżowymi odpowiednikami są białka Cia1, Cia2 i Mms19). Główną rolą tych białek jest ułatwienie wbudowania centrum Fe-S w obrębie białek docelowych poprzez bezpośrednie oddziaływanie z nimi.



**Rycina 13 Model biogenezy cytozolowych i jądrowych białek Fe-S w oparciu o białka cytozolowego systemu CIA**

Pierwszy etap biogenezy polega na utworzeniu centrum [4Fe-4S] w obrębie kompleksu NBP35-CFD1, który może wiązać ATP lub GTP (★). Do tej reakcji niezbędny jest czynnik zawierający siarkę (i być może żelazo) X-S, eksportowany z mitochondrium w sposób zależny od glutationu (GSH) przez białko transportujące ABC ABCB7 (Rycina 12). Ponadto proces ten wymaga udziału białkowego łańcucha, składającego się z białek NDOR1 i CIAPIN1, zaangażowanego w przenoszenie elektronów z NADPH. Dwa centra Fe-S niezbędne do funkcjonowania CIAPIN1 są montowane w jego obrębie z udziałem kompleksu GLRX3-BOLA2. W drugim etapie centrum [4Fe-4S] jest transportowane przez białko Fe-S CIAO3 do kompleksu CIA (CTC), składającego się z CIAO1, CIAO2B i MMS19, które oddziałują w różnych kombinacjach z docelowymi białkami w formie apo w celu wbudowania centrów [4Fe-4S] do ich struktury. Dojrzewanie białka Fe-S ABCE1 wymaga dodatkowo kompleksu adaptacyjnego ORAOV1-YAE1. Białko Fe-S IRP1 (iron regulatory protein 1) nie jest zależne od funkcji CTC ale wykorzystuje kompleks CIAO1-CIAO2 do wbudowania centrum [4Fe-4S]. (27)

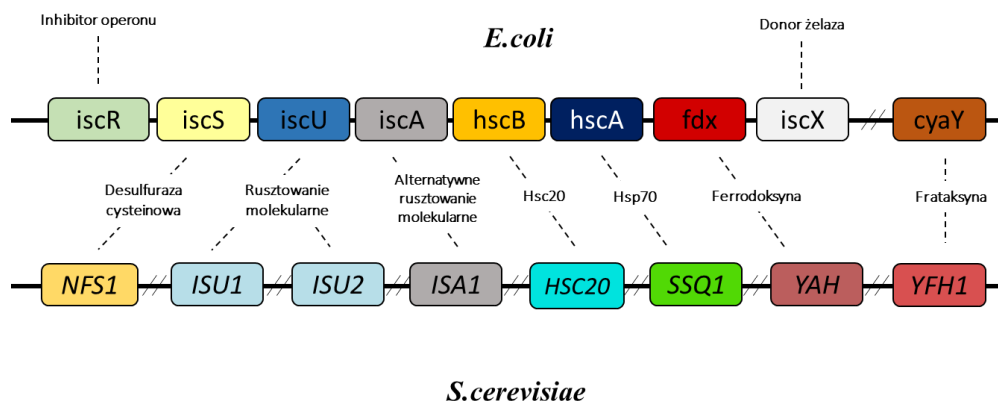
## 1.5 Mitochondrialna biogeneza białek Fe-S pełni kluczową rolę podczas regulacji homeostazy żelaza w komórkach

Do tej pory wykazano, że biogeneza białek Fe-S odgrywa rolę regulacyjną w komórkowym metabolizmie żelaza. Ma to sens fizjologiczny, ponieważ podaż tego metalu jest bezpośrednio kontrolowana przez proces zużywający żelazo. Ten mechanizm regulacyjny jest godny uwagi, ponieważ synteza hemu nie ma bezpośredniego wpływu na regulację podaży żelaza, przynajmniej nie w komórkach nieerytroidalnych. Kluczową rolę w homeostazie żelaza w komórce odgrywa mitochondrialny system ISC. Defekt funkcjonalny podstawowych składników mitochondrialnego systemu ISC wiąże się ze zwiększonym wychwytem żelaza przez komórki i zwykle z akumulacją żelaza w obrębie mitochondrii. Zjawisko to jest podobne w komórkach drożdży i komórkach ludzkich, mimo że mechanizmy regulacyjne leżące u jego podstaw różnią się zasadniczo. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* funkcja regulacyjna żelaza jest realizowana głównie przez aktywację transkrypcyjną genów, których produkty zaangażowane są w homeostazę żelaza, a która to zależy od czynników transkrypcyjnych Aft1-Aft2, podczas gdy u innych grzybów wykorzystywane są systemy represorowe (8) (112) (113). W komórkach ludzkich główny wpływ na dostarczanie i rozmieszczenie żelaza w komórce mają dwa białka regulacyjne IRP 1 i 2, działające za pośrednictwem złożonych mechanizmów potranskrypcyjnych (114) (115). Wiele szczegółów tego szlaku regulacyjnego jest wciąż słabo poznanych na poziomie molekularnym. W drożdżach defekt któregośkolwiek ze składników podstawowej mitochondrialnej maszyny ISC lub systemu eksportu ISC, w tym transportera ABC Atm1, prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych Aft1-Aft2 wrażliwych na żelazo i indukcji genów znajdujących się po ich kontrolą. Do tej pory scharakteryzowano około 30 genów, których produkty są zaangażowane w komórkowe pozyskiwanie żelaza i prawidłową wewnątrzkomórkową dystrybucję metalu do różnych przedziałów, w tym do mitochondriów i wakuoli. Jaka jest molekularna rola mitochondrialnego systemu ISC w regulacji gospodarki żelazem? Prawdopodobnie podstawowa maszyna ISC wytwarza, a transporter Atm1 eksportuje do cytozolu cząsteczkę sensoryczną, która jest następnie wykorzystywana przez Aft1-Aft2 do „śledzenia” statusu żelaza w mitochondriach. Można także przypuszczać, że cząsteczka X-S jest wykorzystywana przez maszynę CIA do „dojrzewania” białek Fe-S i prawdopodobnie jej struktura jest identyczna bądź przynajmniej bardzo podobna pod względem chemicznym do cząsteczki pełniącej funkcję sensoryczną. Czynniki transkrypcyjne Aft oddziałują z monotiolowymi glutaredoksynami Grx3-Grx4 oraz białkiem Bola Fra2 (116) (117). Delecja Grx3-Grx4 prowadzi do silnej aktywacji regulonu żelaza zależnego od czynnika Aft i prowadzi do komórkowego wychwytem żelaza. W tym przypadku obserwowano, że żelazo gromadzi się w cytozolu, a nie w mitochondriach, co odróżnia tę sytuację od defektów białek ISC, w przypadku których poziom żelaza silnie wzrasta w mitochondriach. Glutaredoksyny wiążą centrum[2Fe-2S] i można przypuszczać, że to właśnie jest ugrupowanie rozpoznawane przez czynniki Aft1-Aft2, ale brakuje dowodów *in vivo* potwierdzających tę hipotezę. W komórkach ludzkich wewnątrzkomórkowa regulacja żelaza jest realizowana przez białka IRP1 i IRP2. IRP1 jest cytozolowym białkiem Fe-S o aktywności akonitazy, ale w swojej apofornie może wiązać się z elementami reagującymi na żelazo (IRE) w obrębie matrycowego RNA (mRNA), które to kodują białka zaangażowane w transport żelaza (receptor transferyny i ferroportyna), jego przechowywanie (ferrytyna) i białka, które wymagają obecności żelaza do swojej aktywności (akonitaza i eALAS), regulując w ten sposób wydajność translacji lub stabilność mRNA (114) (115) Równowaga między apo- i holoformą IRP1 zależy od biosyntezy centrów Fe-S, a ta z kolei zależy zarówno od mitochondrialnego systemu ISC, jak i od

maszynie CIA, która wykorzystuje eksportowaną przez mitochondria cząsteczkę X-S do syntezy centrów Fe-S. Tak więc, inaczej niż u drożdży wykorzystujących czynniki Aft, defekt zarówno elementów ISC, jak i CIA w komórkach ludzkich wpływa na komórkową homeostazę żelaza za pośrednictwem białek IRP. Z drugiej strony, podobnie jak u drożdży, w przypadku gdy ma miejsce zaburzenie działania systemu ISC żelazo gromadzi się w mitochondriach. Ponadto pobór żelaza przez komórki i jego dostarczanie do macierzy mitochondrialnej zależy w dużej mierze od wydajności mitochondriów w generowaniu centrów Fe-S.

## 1.6 Porównanie prokariotycznych i eukariotycznych systemów ISC

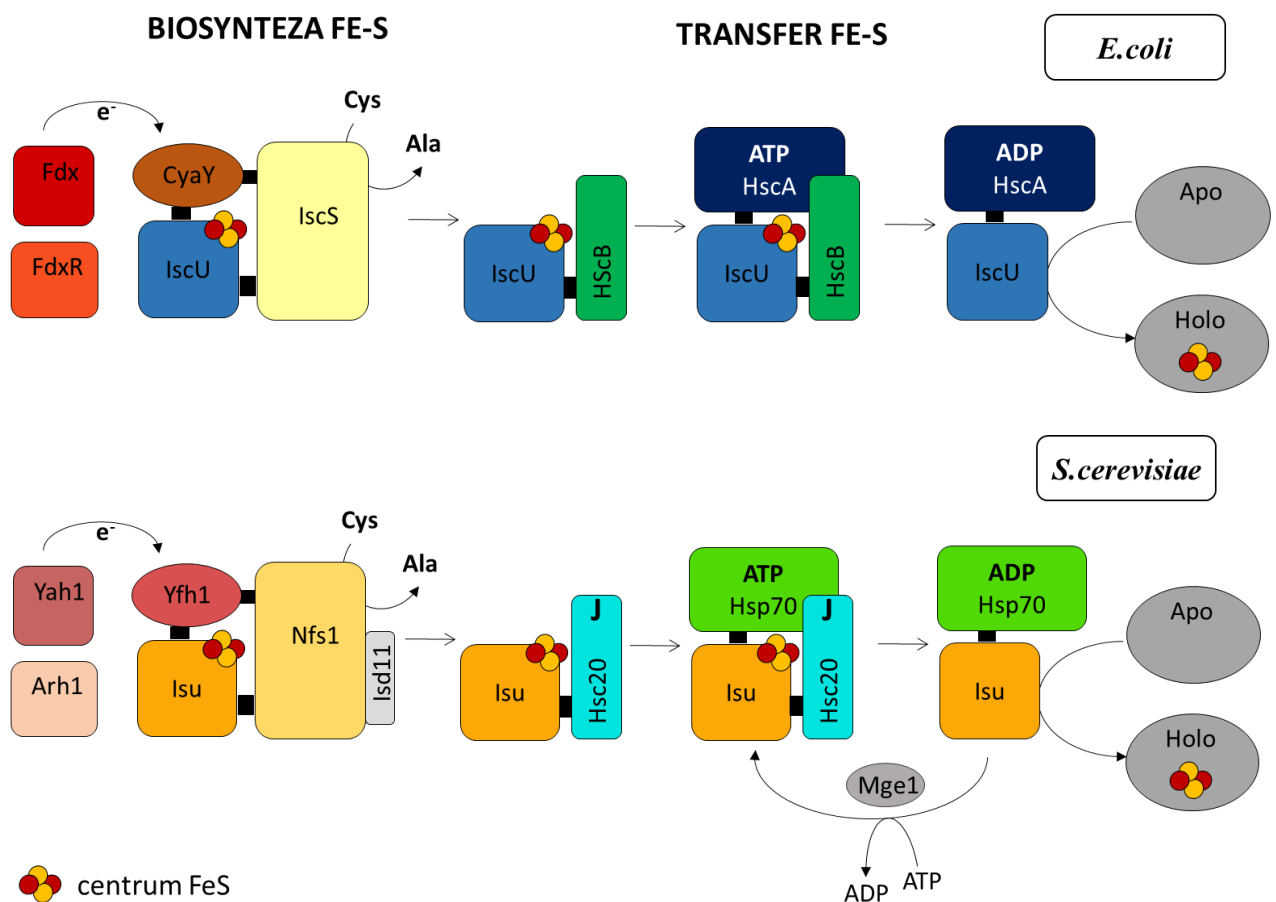
Podczas wykonywania mojej pracy doktorskiej do odtworzenia w warunkach *in vitro* procesu biogenezy centrów Fe-S korzystałam z oczyszczonych bakteryjnych i drożdżowych białek. Głównie skoncentrowałam się na analizie systemów ISC z dwóch modelowych organizmów *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*. Aby móc łatwiej dostrzec podobieństwa i różnice w działaniu tych obu systemów poniżej przedstawiłam zestawienie genów kodujących białka zaangażowane w biogenezę centrów Fe-S z tych dwóch organizmów (Rycina 14).



**Rycina 14 Porównanie genów kodujących białka systemu ISC u bakterii *E.coli* i drożdży *S.cerevisiae***

Pierwszą różnicą jest obecność genu *iscR* w bakteryjnym operonie *isc*, który koduje czynnik transkrypcyjny regulujący poziom ekspresji wszystkich genów operonu jak również gen *iscX* kodujący białko potencjalnie będące donorem żelaza. W przypadku pozostałych genów operonu *isc* to posiadają one swoje drożdżowe odpowiedniki. Drożdżowy gen *NFS1* koduje desulfurazę cysteinową, która jest donorem siarki. *ISU1* i *ISU2* kodują białka, które pełnią rolę „molekularnego rusztowania”, w obrębie których to formowane są centra Fe-S. *ISA1* koduje białko, które pełni funkcję „molekularnego rusztowania”, które jest dedykowane podczas formowania centrów 4Fe4S z centrów 2Fe2S. *HSC20* koduje białko opiekuńcze typu J, które współpracuje z kodowanym przez *SSQ1* białkiem opiekuńczym z rodziny Hsp70, uczestniczącym w przenoszeniu centrum Fe-S z białka rusztowania na białka docelowe. *YAH* koduje ferredoksynę uczestniczącą w przenoszeniu elektronów potrzebnych do redukcji siarki. *YFH1* koduje frataksynę będącą regulatorem aktywności białka Nfs1 oraz potencjalnie może być także donorem żelaza. (Podwójne ukośne kreski oznaczają, że oddzielone nimi geny znajdują się w oddalonych od siebie pozycjach i nie tworzą operonu.) (118)

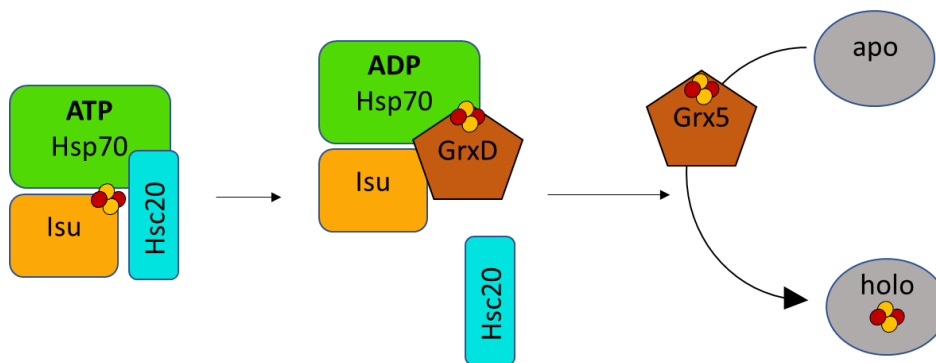
Zarówno u bakterii *E.coli*, jak i drożdży *S.cerevisiae* proces biogenezy wymaga obecności i interakcji wielu białek (119) z białkiem (IscU; Isu1), które pełni rolę molekularnego rusztowania w komórce (Rycina 15). Jest to białko, które jest silnie konserwowane ewolucyjnie, i to właśnie na nim syntetyzowane są centra żelazo-siarkowe, które później transportowane są do białek akceptorowych. Proces syntezy centrum Fe-S w obrębie białka IscU/Isu1 wymaga obecności białka IscS/Nfs1 o aktywności desulfurazy cysteinowej, które pełni rolę donora siarki, jak również białka frataksyny CyaY/Yfh1, które reguluje pracę desulfurazy. W komórkach eukariotycznych, ale nie u bakterii, Nfs1 funkcjonuje jako stabilny heterodimer w kompleksie z małym białkiem Isd11. Białko Isd11 działa stabilizująco na Nfs1 jak również reguluje jego aktywność katalityczną (120) (121). IscS/Nfs1 uwalnia nadsiarczek, który wiąże się do jednej z 3 konserwowanych reszt cysteinowych białka IscU/Isu1. Po etapie syntezy następuje proces transferu centrum Fe-S z białka IscU/Isu1 do białka akceptorowego w towarzystwie białek opiekuńczych z rodziny Hsp70. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* maszyna białek opiekuńczych składa się z białka Hsp70 Ssq1 i białka J – Hsc20, jak również z czynnika wymiany nukleotydów Mge1. Podobnie maszyna białek opiekuńczych wygląda w bateriach *E.coli*, to znaczy białko Hsp70, HscA wymaga współpracy z białkiem pomocniczym typu J - HscB. Jedyną kluczową różnicą jest to, że bakteryjny system Hsp70 nie wymaga obecności czynnika wymiany nukleotydów do wymiany ADP na ATP po hydrolizie ATP (122) (123).



### Rycina 15 Porównanie procesów biogenezy centrów Fe-S zachodzące w oparciu o białka systemów ISC u bakterii *E.coli* i drożdży

Na pierwszym etapie zarówno u bakterii jak i drożdży synteza centrum Fe-S wymaga interakcji „rusztowania” IscU/Isu z desulfurazą cysteinową IscS/Nfs1(Isd11) i frataksyną CyaY/Yfh1. Razem białka te tworzą kompleks katalizujący syntezę centrów Fe-S. Elektrony potrzebne do redukcji siarki zapewnia łańcuch przenoszenia elektronów składający się z ferredoksyny (Fdx/Yah1) i reduktazy ferredoksyny (Fpr/Arh1). Źródłem elektronów jest NADPH. Kolejnym etapem jest etap transferu: Po syntezie centrum Fe-S jest ono przenoszona z „rusztowania” IscU/Isu do białka docelowego. Transfer wymaga systemu białek opiekuńczych składającego się z Hsp70 (HscA/Ssq1), białka J (HscB/Hsc20) i czynnika wymiany nukleotydów Mge1 w przypadku drożdży *S.cerevisiae*. HscB/Hsc20 wiąże IscU/Isu tworząc kompleks; przez jego zdolność do konkurowania z IscS/Nfs1 o wiązanie IscU/Isu, HscB/Hsc20 odgrywa kluczową rolę w przejściu między syntezą Fe-S a transferem Fe-S. Kompleks białko J – „molekularne rusztowanie” oddziałuje z Hsp70 związanym z ATP; zaaranżowana interakcja IscU/Isu i domeny J HscB/Hsc20 z Hsp70 powoduje powstanie przejściowego kompleksu HscA-IscU-HscB lub Ssq1–Isu–Hsc20 i stymulację aktywności ATPazy HscA/Ssq1. Hydroliza ATP do ADP wywołuje zmiany konformacyjne Hsp70 w wyniku czego powstaje stabilny kompleks Hsp70-„molekularne rusztowanie”. W rezultacie, centrum Fe-S jest przenoszona do białka docelowego. Na ostatnim etapie IscU/Isu oddysocjowuje od HscA/Ssq1 w wyniku wymiany ADP na ATP i zmianę konformacji Hsp70. W przypadku systemu eukariotycznego na tym etapie wymagany jest udział dodatkowego czynnika - czynnika wymiany nukleotydów białka Mge1, który pozwala na wymianę ADP na ATP. Po wymianie ADP na ATP białko Hsp70 jest przygotowane na rozpoczęcie kolejnego cyklu ATPazowego.

Proces transferu centrum z białka rusztowania IscU/Isu1 wymaga dodatkowego białka, GrxD/Grx5 (glutaredoksyny), które umożliwia i przyspiesza transfer do białka docelowego. To sugeruje, że po utworzeniu centrum Fe-S w obrębie molekularnego rusztowania IscU/Isu1, jest ono transportowane do białka GrxD/Grx5 w asyście białek opiekuńczych z rodziny Hsp70 (124) (Rycina 16).



### Rycina 16 Dysocjacja centrum Fe-S z Isu1 jest prawdopodobnie wspomagana przez białko opiekuńcze i glutaredoksynę Grx5.

Monotiolowa glutaredoksyna Grx5 wiąże się do Ssq1 w bezpośrednim sąsiedztwie Isu1, umożliwiając prawdopodobnie w ten sposób transfer centrum Fe-S z molekularnego rusztowania Isu1 do Grx5. Następnie ADP jest wymieniany na ATP przez czynnik wymiany Mge1, co powoduje zmianę konformacji domeny wiążącej substrat Ssq1 ze stanu zamkniętego na otwarty. Następnie kompleks Ssq1-Isu1 rozpada się, umożliwiając komponentom wznowienie nowego cyklu. Niezaburzona synteza centrum Fe-S w obrębie Grx5 jest niezbędna podczas dojrzewania wszystkich białek Fe-S w komórce

i obejmuje między innymi mitochondrialne białka [2Fe-2S] i [4Fe-4S], jak i cytozolowo-jądrowe białka Fe-S

## 1.7 System białek Hsp70

Systemy białek Hsp70 można znaleźć we wszystkich przedziałach komórki eukariotycznej, gdzie pełnią funkcje w wielu istotnych procesach. Mechanizm działania Hsp70 opiera się na odwracalnym wiązaniu krótkich hydrofobowych sekwencji reszt aminokwasowych, eksponowanych na powierzchni białek, zwanych substratami. Taki uniwersalny mechanizm pozwala białkom Hsp70 pełnić wiele ważnych funkcji (125) (126) (127), m.in, fałdowanie łańcucha polipeptydowego nowo syntetyzowanych białek, modulowanie oddziaływań między białkami poprzez wpływ na ich konformację czy promowanie transportu polipeptydów przez błony komórkowe. Systemy Hsp70 ułatwiają również ponowne fałdowanie polipeptydów, które utraciły swoją natywną konformację w warunkach stresu, a jeśli ponowne zwijanie jest niewykonalne, przekierowują polipeptydy do wewnątrzkomórkowych systemów proteolitycznych.

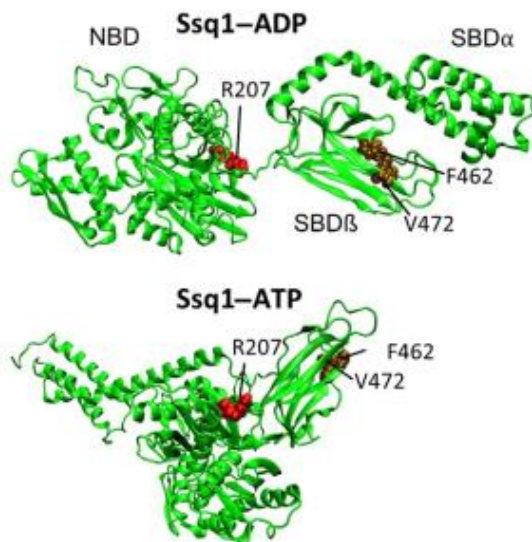
Tak więc białka Hsp70 są zaangażowane w różnorodne procesy komórkowe, podczas gdy ich podstawowa aktywność biochemiczna jest ograniczona do regulowanej przez wiązanie i hydrolizę ATP, cyklicznej interakcji z krótkimi fragmentami polipeptydowymi białek substratowych. Mechanizmy molekularne i ewolucja funkcjonalnego zróżnicowania systemów Hsp70 w mitochondriach zostaną omówione w kolejnych rozdziałach.

Do tej pory u ludzi zidentyfikowano co najmniej 8 homologów białka Hsp70 z których 2 są specyficzne dla organelli, podczas gdy pozostałe 6 znajduje się w cytozolu i jądrze. Podobnie w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* możemy wyróżnić dwa Hsp70 specyficzne dla organelli i 6 białek cytozolowych Hsp70. W obrębie drożdżowych cytozolowych białek Hsp70 można wyróżnić dwie klasy białek - Ssa(Ssa1 Ssa2 Ssa3 i Ssa4) oraz Ssb (Ssb1 i Ssb2). Białka Ssa1 i Ssb1 są w około 60 procentach identyczne i posiadają pewne nakładające się funkcje. W obrębie podrodziny Ssa lub Ssb podobieństwo sekwencji jest bliskie 100% i dlatego uważano, że białka w obrębie każdej podrodziny mają te same funkcje ale różnią się ekspresją (128). Wszystkie te białka charakteryzują się podobnym układem strukturalnym. Odkrywane są jednak funkcjonalne różnice między białkami Ssa1 i Ssa2, które są w 98 procentach identyczne podczas gdy identyczność między Ssa3 i Ssa4 wynosi już około 88%. Każde z tych białek może wspierać wzrost komórek, ale Ssb nie może kompensować zasadniczej funkcji Ssa, co jest przykładem nakładających się i odrębnych funkcji cytozolowych Hsp70 (129).

Podobnie, wiele organizmów prokariotycznych również posiada kilka Hsp70. Na przykład, *E.coli* K12 koduje trzy białka Hsp70: DnaK, HscA i HscC, także trzy białka Hsp70 zidentyfikowano u jednokomórkowej zielonej algi *Chlamydomonas reinhardtii* (130).

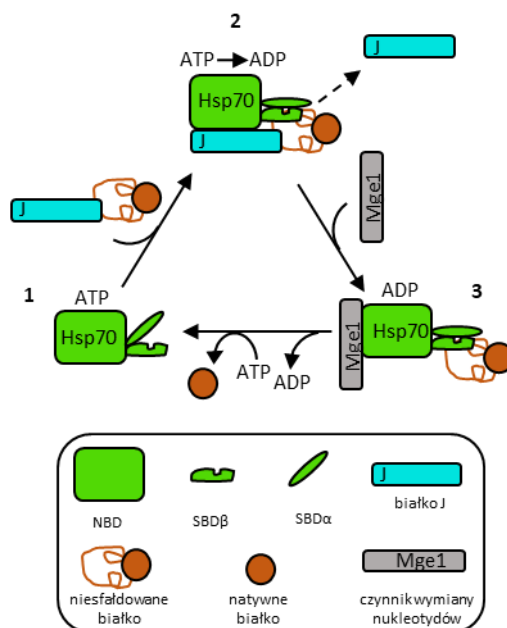
### 1.7.1 Cykl wiązania substratu białkowego

Struktura domenowa rodziny białek Hsp70 jest bardzo podobna u różnych organizmów. Każde z nich składa się z dwóch domen połączonych elastycznym łącznikiem. N-końcowa domena ATPazy (~ 44 kDa) składa się z dwóch części tworzących kieszeń z miejscem wiążącym ATP. C-końcowa część białka, domena wiążąca substraty (~ 26 kDa) (127), składa się z dwóch części: subdomeny obejmującej  $\beta$ -kartki która tworzy kieszeń wiążącą dla kilku hydrofobowych aminokwasów na odsłoniętej powierzchni substratu, oraz domeny o strukturze  $\alpha$ -helisy, która tworzy pokrywę nad miejscem wiązania substratu (Rycina 17). Łącznik między domeną ATPazową a domeną wiążącą substrat odgrywa ważną rolę w komunikacji allosterycznej między domenami (131).



**Rycina 17** Modele homologiczne Ssq1 (zielony) w konformacji związanej z ADP (góra, na podstawie PDB kod 2KHO) i ATP (na dole, na podstawie PDB kod 4JN4). Na rysunku zaznaczono reszty aminokwasowe (F462, V472) zaangażowane w wiązanie substratu w obrębie domeny SBD, które oddziałują z sekwencją LPPVK Isu oraz resztę R207 w obrębie domeny wiążącej nukleotyd (NBD), która jest zaangażowana w interakcję z motywem HPD domeny J Hsc20 (132).

Podstawową aktywnością biochemiczną Hsp70 jest cykliczne wiązanie białka-substratu. Jest ono regulowane przez hydrolizę ATP, która zmienia konformację obu domen (Rycina 18). Gdy ATP jest związany, domena ATPazy uzyskuje konformację, która umożliwia jej bezpośrednie oddziaływanie zarówno z sekwencją łączącą, jak i z domeną wiążącą substratu. Ponadto,  $\alpha$ -helikalna pokrywa otwiera się dzięki interakcji z domeną ATPazy, co z kolei powoduje odsłonięcie miejsca wiązania polipeptydu (133). Taka konformacja pozwala zarówno na szybkie wiązanie i uwalnianie białka substratowego. Po hydrolizie ATP do ADP, konformacja obu domen ulega znacznej zmianie. Domena wiążąca substrat odłącza się od domeny ATPazy, a helikalna pokrywa zamyka miejsce wiązania polipeptydu, stabilizując w ten sposób interakcję z białkiem substratowym (134). Z kolei zastąpienie ADP przez ATP wywołuje zmianę konformacyjną umożliwiającą oderwanie polipeptydu i tym samym nowy cykl wiązania substratu może zostać ponownie zainicjowany.



### Rycina 18 Schemat cyklu interakcji Hsp70-substrat.

Białko Hsp70 związane z ATP utrzymuje formę otwartą (1), dzięki czemu substrat może swobodnie przyłączyć się do kieszeni wiążącej peptyd w obrębie subdomeny  $\beta$  domeny SBD (SBD $\beta$ ). Jest to tak zwany „stan otwarty” lub „zadokowany”, ponieważ domena SBD $\alpha$  oddziałuje z domeną NBD. Domena SBD $\alpha$  zatrzymuje substrat poprzez zakrywanie kieszeni wiążącej w momencie kiedy do białka Hsp70 związane jest ADP (2). Kiedy substrat znajduje w kieszeni wiążącej białka Hsp70, domena J białka pomocniczego, wiążąc się na styku domeny NBD i SBD $\beta$ , stymuluje hydrolizę ATP do ADP. Ze względu na powstałe zmiany konformacyjne, domeny rozłączają się, tworząc stan „niezadokowany/zamknięty”, stabilizując oddziaływanie substratu z białkiem Hsp70. Czynniki wymiany nukleotydu kończy cykl (3). (133).

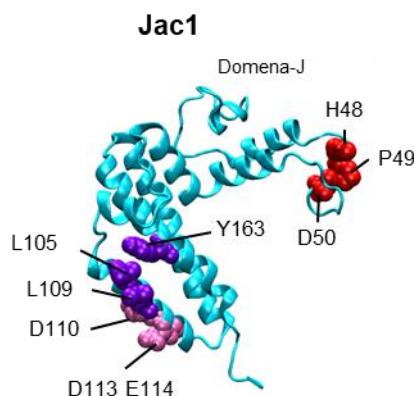
Białka Hsp70 nie funkcjonują niezależnie od siebie. Hydroliza ATP i wymiana ADP na ATP są kluczowymi czynnościami, stymulowanymi przez białko J i czynniki wymiany nukleotydu (135) (136).

## 1.7.2 Białka pomocnicze systemu Hsp70 – białka typu J i czynniki wymiany nukleotydu

### 1.7.2.1 Białka typu J

Cechą charakterystyczną wszystkich białek J jest domena J. Typowa domena J jest składowana z czterech  $\alpha$ -helis, z których dwie, helisa II i III, tworzą strukturę przypominającą palec z antyrównoległymi łańcuchami połączonymi przez elastyczną pętlę (Rycina 19). Pętla ta zawiera trzy reszty aminokwasowe (histrynę, prolinę i kwas asparaginowy, HPD), które występują we wszystkich domenach J (137).





### Rycina 19 Struktura białka Hsc20 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Kolorowymi kulkami oznaczono reszty aminokwasowe biorące udział w oddziaływaniach międzybiałkowych. Na modelu na niebiesko oznaczono reszty LLY, które odpowiadają za wiązanie Isu1, a na czerwono motyw HPD, który jest kluczowy dla stymulacji aktywności ATPazy Ssq1. Kolorem jasno-fioletowym oznaczono reszty odpowiedzialne za oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy Isu1 a Jac1 (137)

Białka J regulują tworzenie się kompleksów Hsp70-substrat na trzy sposoby (138) (139) (140). Po pierwsze, białka J mają domenę wiążącą peptyd, która oddziałuje z substratami białkowymi i dostarcza substraty do białek Hsp70 poprzez oddziaływanie z białkiem Hsp70. Po drugie, białka J stabilizują kompleks substrat-Hsp70 poprzez przyspieszenie aktywności ATPazy białek Hsp70. Wreszcie, białka J funkcjonują w różnych miejscach w komórce (140), w ten sposób różne białka należące do rodziny białek J oddziałują z jednym białkiem Hsp70 i umożliwiają tym samym wiązanie unikalnych substratów białkowych. W genomie drożdży zidentyfikowano i sklasyfikowano 22 geny kodujące białka typu J. W ich obrębie możemy wyróżnić trzy typy: I, II i III (141). Zostały one sklasyfikowane głównie na podstawie organizacji domenowej. Domena J jest umieszczona na N-końcu we wszystkich typach. Białka J typu I posiadają domenę J, region bogaty w glicynę i fenyloalaninę (bogaty w G/F), region bogaty w cysteinę i domenę podobną do palca cynkowego, po której następuje domena C-końcowa (CTD). Białka J typu II zawierają domenę J i region bogaty w G/F, a następnie CTD I i II. Białka J typu III zawierają tylko domenę J (140) (142). Do tej pory specyficzność substratowa *in vivo* wśród różnych typów białek J nie została dobrze zrozumiana. Dwa białka J, Ydj1 (typ I) i Sis1 (typ II), odgrywają kluczową rolę w cytozolu drożdżowym. Ostatnie badania wykazały, że Ydj1 bierze udział w tłumieniu agregacji białek, podczas gdy system Hsp70-Sis1 promuje degradację białek (143).

#### 1.7.2.2 Czynniki wymiany nukleotydów (NEF – ang. *Nucleotide Exchange Factor*)

Czynniki wymiany nukleotydów są ewolucyjnie zróżnicowaną grupą białek, których wspólną cechą jest zdolność do oddziaływania z Hsp70, co prowadzi do zmian konformacyjnych ułatwiających dysocjację ADP, powstającego w wyniku hydrolizy ATP (136). W ten sposób czynniki wymiany nukleotydów inicjują wiązanie innej cząsteczki ATP, co powoduje dysocjację białka substratowego związanego z Hsp70. Interakcja Hsp70 z

białkami pomocniczymi reguluje cykl wiązania białka substratowego. Z jednej strony, białka J promują tworzenie stabilnego kompleksu Hsp70-substrat poprzez stymulację aktywności ATPazy, a z drugiej strony, czynniki wymiany nukleotydów regulują częstotliwość cyklu wiązania substratów. Pomimo swojej heterogeniczności strukturalnej, NEF działają przez blokowanie dwóch fragmentów NBD białka Hsp70, w wyniku czego zostaje zmniejszone powinowactwo do ADP. Wiązanie ATP kończy reakcję wymiany i uwalnia NEF z białka Hsp70. Ponadto wymiana nukleotydów napędza allosteryczne międzysubdomenowe zmiany konformacyjne w obrębie Hsp70, tak, że domena SBD uwalnia związany substrat (144). Sse1, Sse2, Snl1 i Fe-S1 są członkami trzech strukturalnie niepowiązanych rodzin NEF obecnych w cytozolu drożdży (145). Wykazano, że każdy z czynników NEF oddziałuje z Hsp70 *in vivo* i *in vitro* (146). Dobrze znane czynniki NEF to GrpE w bakteriach *E.coli*, Fe-S1 i Sse1, Mge1 u drożdży *S.cerevisiae*, Bag1 u wyższych eukariontów oraz ludzki ortolog Fe-S1 HspBP1.

W mojej pracy do badań używałam białka Mge1 z drożdży *S.cerevisiae*. Białko to jest homologiem bakteryjnego GrpE i oddziałuje z wielofunkcyjnym mtHsp70, ułatwiając import przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Drożdżowe białko Mge1 wykazuje 57% podobieństwo do bakteryjnego GrpE i może funkcjonalnie zastąpić GrpE *Escherichia coli*, co świadczy o zachowanym mechanizmie działania tego białka w toku ewolucji. Funkcjonalne białko Mge1 działa jako dimer, a ta dimeryzacja wydaje się być krytyczna dla jego interakcji z mtHsp70, ponieważ forma monomeryczna Mge1 nie oddziałuje z mtHsp70, co powoduje spowolnienie cyklu ATPazy i tym samym funkcji opiekuńczej mtHsp70 (147).

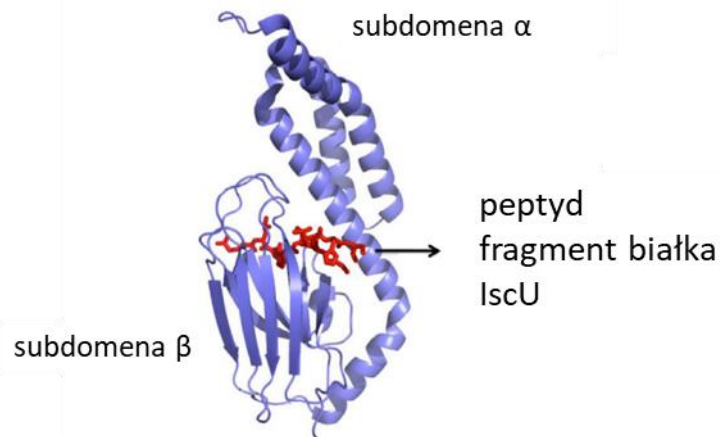
Oprócz działania jako wymiennik ATP-ADP, Mge1 działa jako termosensor u bakterii i drożdży (148) (149) (150). Na przykład w wysokich temperaturach Mge1 występuje jako monomer i nie oddziałuje z mHsp70 (147). Dodatkowo jest on również zaangażowany w sortowanie i degradację źle uformowanych białek, ale jest to także białko zaangażowane w proces biogenezy centrów żelazo-siarkowych (151).

## **1.8 Wyszczególnione systemy białek opiekuńczych HscA/HscB oraz Ssq1/Hsc20 zaangażowane w proces biogenezy centrów Fe-S**

### **1.8.1 Charakterystyka oddziaływania bakteryjnego systemu białek opiekuńczych HscA/HscB z białkiem IscU uczestniczącym w biogenezie centrów żelazo-siarkowych**

Reszty aminokwasowe w obrębie IscU, które są specyficznie rozpoznawane przez bakteryjne białko Hsp70, HscA, obejmują reszty LPPVK przypadające na pozycje 99-103 sekwencji IscU (152) (153). Ponadto wykazano, że ich wiązanie jest stabilizowane przez obecność białka opiekuńczego HscB, które dodatkowo zwiększa aktywność ATPazową białka HscA (154) (155). Dostępna jest struktura krystaliczna kompleksu, który obejmuje fragment domeny wiążącej substrat (SBD) HscA i peptyd zawierającego fragment IscU (98ELPPVKIHC106) (kod PDB kod 1U00 (152)). Struktura ta obejmuje miejsce wiązania białka IscU w obrębie struktury białka HscA (Rycina 20). Dodatkowo struktura ta przedstawia, że domena SBD składa się z dwóch odrębnych subdomen ( $\alpha$  i  $\beta$ -subdomeny) i jest podobna do domeny SBD białka DnaK (156), chociaż subdomena  $\alpha$  jest przesunięta w stosunku do

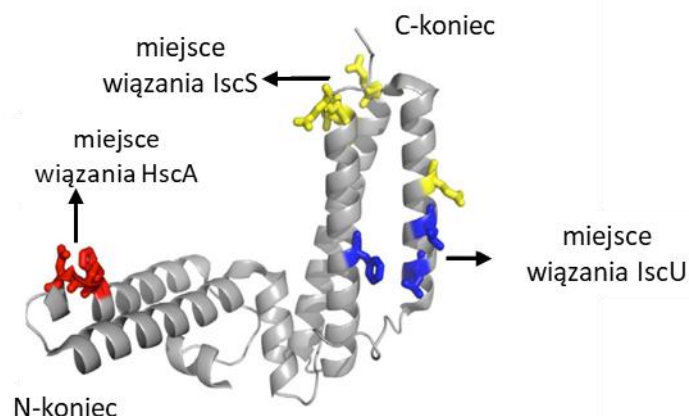
subdomeny  $\beta$ . Peptyd IscU wiąże się w hydrofobowej szczelinie znajdującej się w  $\beta$ -subdomenie, wykorzystując oddziaływania niepolarne i wiązania wodorowe.



### Rycina 20 Krystaliczna struktura domeny SBD białka HscA

W obrębie domeny SBD białka HscA widoczny jest podział struktury na subdomenę alfa i beta. Na czerwono został zaznaczony peptyd obejmujący fragment IscU o sekwencji ELPPVKIHC oraz jego miejsce wiązania w obrębie struktury białka HscA. (156)

W przypadku współpracującego białka J, HscB jest również dostępna struktura krystaliczna (kod PDB 1FPO (157)). Analiza tej struktury pozwala na wyróżnienie dwóch odrębnych domen: N-końcowej domeny J oraz C-końcowej domeny, która składa się z wiązki trzech helis (Rycina 21). Domena C-końcowa jest zaangażowana w wiązanie substratu, białka pełniącego rolę molekularnego rusztowania - IscU, poprzez reszty L92, M93 i F153 (158) (159) (160). Z kolei domena J białka HscB jest odpowiedzialna za interakcję z HscA poprzez reszty H32, P33 i D34 (161). Obie domeny kontaktują się ze sobą poprzez rozległą powierzchnię hydrofobową, której obecność sugeruje, że ich względna orientacja jest stała. Powyższe interakcje mogą sugerować również, że białko HscB może funkcjonować jako czynnik ułatwiający pozycjonowanie substratu względem HscA, i tym samym także odgrywać rolę w regulacji aktywności ATPazy (157).



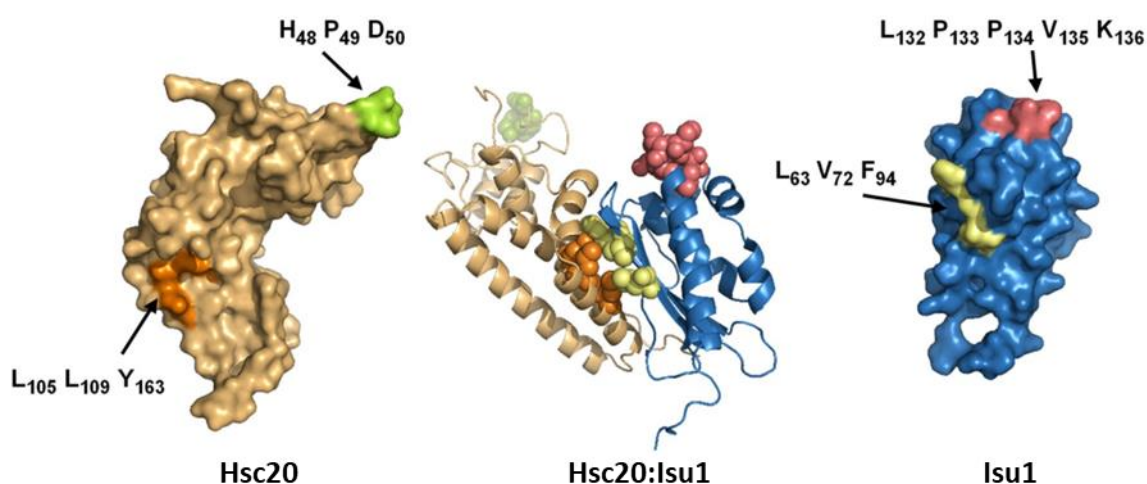
### Rycina 21 Krystaliczna struktura białka HscB

Widoczne są dwie domeny N-końcowa zawierająca domenę J oraz C-końcowa. Na czerwono zaznaczone zostały reszty aminokwasowe odpowiedzialne za oddziaływanie z HscA, na niebiesko z IscU, a na żółto z IscS. (157))

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

### 1.8.2.1 Oddziaływanie Isu: Hsc20

Specyfika tej interakcji jest dość wyjątkowa, ponieważ w oddziaływanie pomiędzy Isu i Hsc20 jest zaangażowanych wiele reszt aminokwasowych tworzących dużą powierzchnię wiążącą. Interakcja między Hsc20 i Isu jest krytyczna *in vivo*. Badania na drożdżach wykazały, że gdy białko Hsc20 jest defektywne w wiązaniu Isu1, komórki są niezdolne do życia. Natomiast obecność wariantów Hsc20 o obniżonym powinowactwie do Isu skutkuje powolnym wzrostem i zmniejszoną aktywnością enzymów mitochondrialnych (akonitazy i dehydrogenazy bursztynianowej), które wymagają do aktywności obecności funkcjonalnych centrów Fe-S (162).



**Rycina 22 Model kompleksu Hsc20-Isu1** (panel środkowy) na podstawie dokowania *in silico* struktury krystalicznej białka Hsc20 (kod PDB 3UO3, (lewy panel) i modelu homologicznego struktury Isu1 (prawy panel). Na modelu zaznaczone zostały reszty Hsc20 i Isu1 zaangażowane w ich wzajemne oddziaływanie (159)

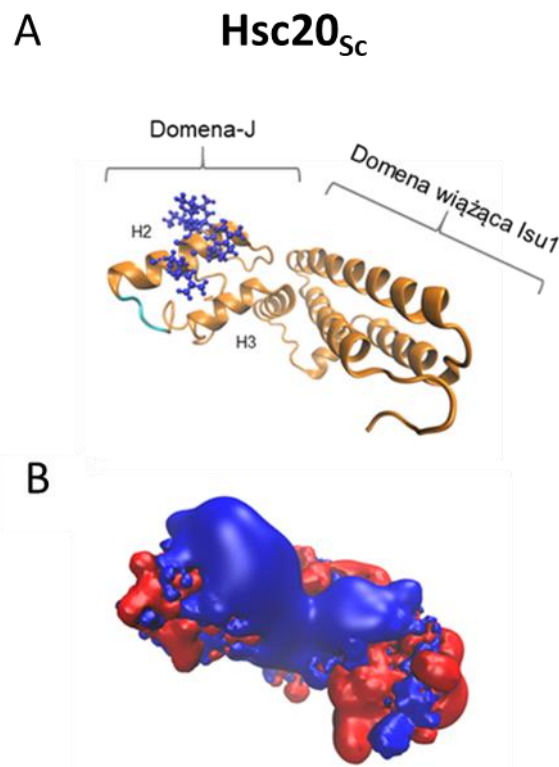
W obrębie C-końcowej domeny białka Hsc20 (Rycina 22) można wyróżnić trzy wysoce konserwowane reszty L105, L109, Y163 zaangażowane w oddziaływania o charakterze hydrofobowym i obszar mniej konserwowanych reszt naładowanych ujemnie (N110, N113, E114), które są zaangażowane w interakcję z Isu (159) (163) (159). Doświadczenia, w których wykorzystano wersje białka Hsc20 ze zmutowanymi resztami zaangażowanymi w oddziaływania hydrofobowe, jednoznacznie potwierdziły że te reszty odgrywają kluczową rolę, znacznie przyczyniając się do stabilności kompleksu Hsc20-Isu. Z kolei mutacje w obrębie reszt naładowanych miały mniejszy wpływ na zaburzenie formowanie kompleksu Hsc20-Isu,

niemniej mogą one odgrywać istotną rolę w prawidłowym wzajemnym zorientowaniu oddziałujących białek. Komplementarna powierzchnia wiążąca (Rycina 22), na trójniciowej antyrównoległej  $\beta$ -karcie białka Isu, również składa się z wysoce konserwowanych reszt hydrofobowych (L63, V72, F94), jak również można zidentyfikować komplementarny dodatnio naładowany obszar (L54, L55, R74) (164) (165).

Dalsza analiza wykazała, że reszty aminokwasowe w obrębie Isu zaangażowane w interakcję z Hsc20, są także zaangażowane w oddziaływanie z desulfurazą cysteinową (165). Możliwe jest, że sekwencyjne interakcje Isu, najpierw z Nfs1, a następnie z Hsc20, sterują uporządkowanym przejściem pomiędzy kompleksem białkowym systemu ISC wymaganym do syntezy centrów Fe-S, a kompleksem potrzebnym do transferu centrów Fe-S.

### 1.8.3 Oddziaływanie Hsc20:Hsp70

W oddziaływanie między białkiem Hsc20 i Hsp70 zaangażowane są dodatnio naładowane reszty aminokwasowe znajdujące się w domenie J białka Hsc20. Do weryfikacji potencjału reszt aminokwasowych w obrębie białka Hsc20 wykorzystano model białka Hsc20<sub>Sc</sub> utworzony w oparciu o strukturę kryształu (PDB id 3UO3) i poddano symulacjom dynamiki molekularnej. Uzyskane wyniki pozwoliły na obliczenie średniego potencjału elektrostatycznego wokół białka. W takich warunkach zaobserwowano dużą powierzchnię dodatniego potencjału elektrostatycznego wokół helisy II domeny-J Hsc20<sub>Sc</sub> (Rycina 223). Tworzyło ją pięć reszt aminokwasowych – lizyna K20, arginina R35, arginina R37, lizyna K38 oraz arginina R41 (166).



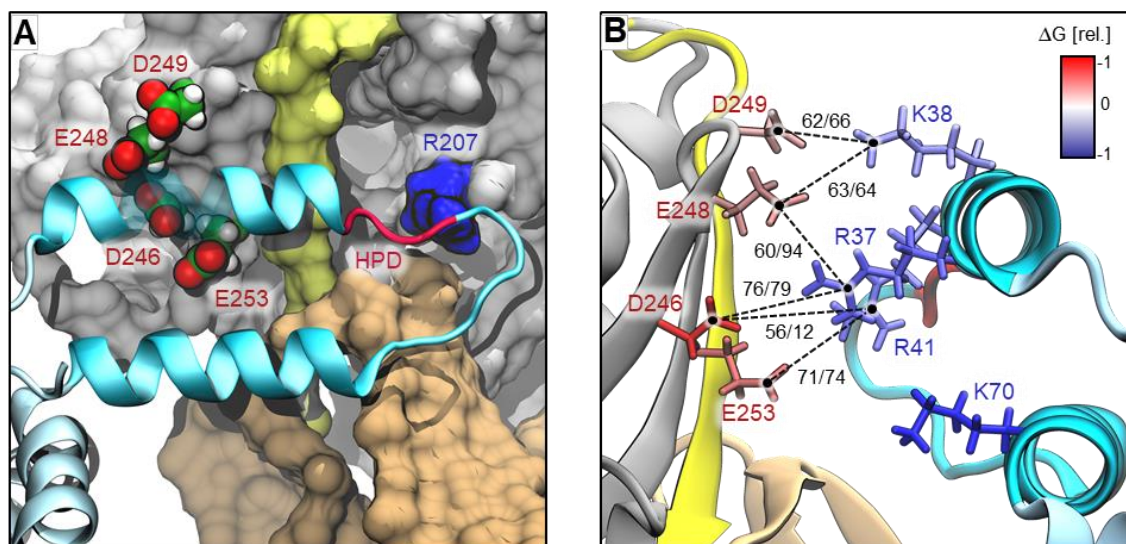
Rycina 23 Potencjał elektrostatyczny wokół domeny-J białka Hsc20<sub>Sc</sub>.

**A.** Model strukturalny białka Hsc20<sub>Sc</sub>. Reszty aminokwasowe w sekwencji domeny-J wchodzące w skład dodatnio naładowanej powierzchni (Hsc20<sub>Sc</sub> K20, R35, R37, K38, R41) oznaczono na strukturze kolorem niebieskim. Motyw HPD zaznaczono kolorem turkusowym.

**B.** Wykorzystując model przedstawiony na panelu A, obliczono średni potencjał elektrostatyczny wokół Hsc20<sub>Sc</sub>. Na modelu kolorem niebieskim oznaczono potencjał dodatni, a kolorem czerwonym potencjał ujemny ( $\pm 2$  kT/e, gdzie k – stała Boltzmanna; T – temperatura; e – ładunek elektronu) (166).

Domena-J białka Jac1<sub>Sc</sub> zawiera pięć dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych. W celu weryfikacji, czy wytypowane reszty są odpowiedzialne za wiązanie Hsc20 z Hsp70 powstał wariant Hsc20<sub>Sc</sub> KRKR/AASL, w którym cztery z pięciu reszt wymieniono na aminokwasy pozbawione ładunku. W doświadczeniu, w którym zmierzono stymulację aktywności ATPazy białka Ssq1 w obecności białka J, jego zmutowana wersja charakteryzowała się niższym powinowactwem do Hsp70. Natomiast wariant Jac1<sub>Sc</sub> KRKR/AASL + H/A, w którym dodatkowo wprowadzono substytucję w motywie HPD, był nieaktywny *in vitro* oraz letalny *in vivo*. Wyniki te sugerują, że „odporność” Jac1<sub>Sc</sub> na pojedyncze substytucje w motywie HPD oraz jego wysokie powinowactwo do Ssq1 są efektem obecności naładowanych reszt w domenie-J, które mogłyby oddziaływać z komplementarnie z naładowanymi resztami na powierzchni Ssq1 (166).

W celu sprawdzenia, które z tym pięciu aminokwasów są kluczowe do oddziaływania między tymi białkami wykorzystano ponownie modelowanie molekularne. Na podstawie wykonanej w ten sposób analizy wykazano, że pomiędzy Hsc20<sub>Sc</sub> a Ssq1 istnieje rozbudowana sieć oddziaływań elektrostatycznych (Rycina 24). W obrębie Hsc20<sub>Sc</sub> tworzą ją cztery dodatnio naładowane reszty argininy R37 i R41 oraz lizyny K38 i K70, położone w obrębie helisy II i III domeny-J. Z kolei w Ssq1 są to ujemnie naładowane reszty kwasu asparaginowego D246 i D249 oraz kwasu glutaminowego E248 i E253, zlokalizowane w obrębie domeny ATPazowej. Stabilne oddziaływania jonowe były tworzone przez pary R37-D246, K38-E248, K38-D249 oraz R41-D249, podczas gdy stabilne wiązania wodorowe tworzyły pary R37-E248, R37-D246, R41-E253, K38-D249, K38-E248 oraz R41-E248. (167)



**Rycina 24** Sieć oddziaływań elektrostatycznych w kompleksie Hsc20<sub>Sc</sub>:Ssq1.

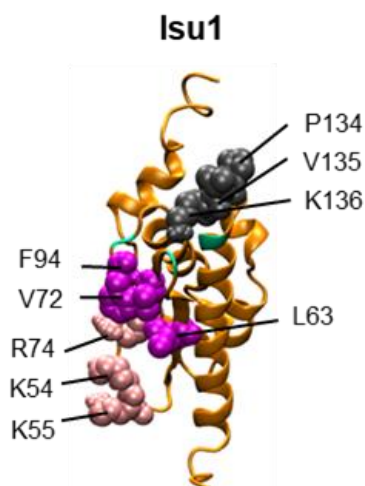
A. Domena-J Hsc20<sub>Sc</sub> (turkusowa) jest wiązana przez cztery ujemnie naładowane reszty położone w obrębie domeny ATPazowej Ssq1 (szara). Motyw HPD (czerwony) jest położony blisko konserwowanej ewolucyjnie reszty R207 (niebieska), znajdującej się powyżej łącznika międzydomenowego (żółty).

B. Sieć oddziaływań pomiędzy domeną-J Hsc20<sub>Sc</sub> a domeną ATPazową Ssq1. Najtrwalsze mostki solne oraz wiązania wodorowe oznaczono przerywanymi liniami. Wartości liczbowe ponad kreskami oznaczają obliczone prawdopodobieństwo powstania danego wiązania (p. mostka solnego / p. wiązania wodorowego). Ujemnie naładowane reszty aminokwasowe zaznaczono na czerwono, a dodatnio naładowane na niebiesko. Wkład energetyczny danej reszty w trwałość kompleksu Hsc20<sub>Sc</sub>:Ssq1 oznaczono przy pomocy gradientu koloru zgodnie ze skalą w prawym górnym rogu. (166)

Tak więc analiza modelu strukturalnego kompleksu Hsc20<sub>Sc</sub>:Ssq1 pozwoliła na wytypowanie ujemnie naładowanych reszt w sekwencji Ssq1 oddziałujących z Hsc20<sub>Sc</sub>. Model strukturalny potwierdził również wcześniej uzyskane , które pokazały że dodatnio naładowany region domeny-J Hsc20<sub>Sc</sub> oddziałuje z Ssq1.

#### 1.8.4 Oddziaływanie Isu:Hsp70

Miejszem rozpoznawanym przez mtHsp70 w obrębie Isu jest pentapeptyd LPPVK (przypadający na pozycje 132-136 w sekwencji Isu) zlokalizowany na elastycznej pętli w bliskiej odległości od miejsca wiązania centrum Fe-S (Rycina 25) (168) (169). Motyw LPPVK jest silnie konserwowany ewolucyjnie. Jest on obecny we wszystkich ortologach Isu, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, które jednocześnie posiadają system białek opiekuńczych Hsp70/J, a który to może uczestniczyć w transferze centrów Fe-S do białek docelowych. Dotychczasowe analizy biochemiczne sugerują, że Hsp70 wyspecjalizowane w biogenezie centrów Fe-S rozpoznają tylko tę sekwencję.



#### Rycina 25 Model molekularny Isu1.

Model homologiczny struktury Isu1 uzyskany w oparciu o strukturę krystaliczną bakteryjnego białka IscU (pomarańczowy, struktura krystaliczna IscU *E.coli* PDB 3LVL). Zaznaczono reszty zaangażowane w oddziaływanie z Hsc20 K54, K55, L63, V72, R74, F94 oraz kluczowe reszty motywu LPPVK (P134, V135, K136) zaangażowane w wiązanie Hsp70. (132)

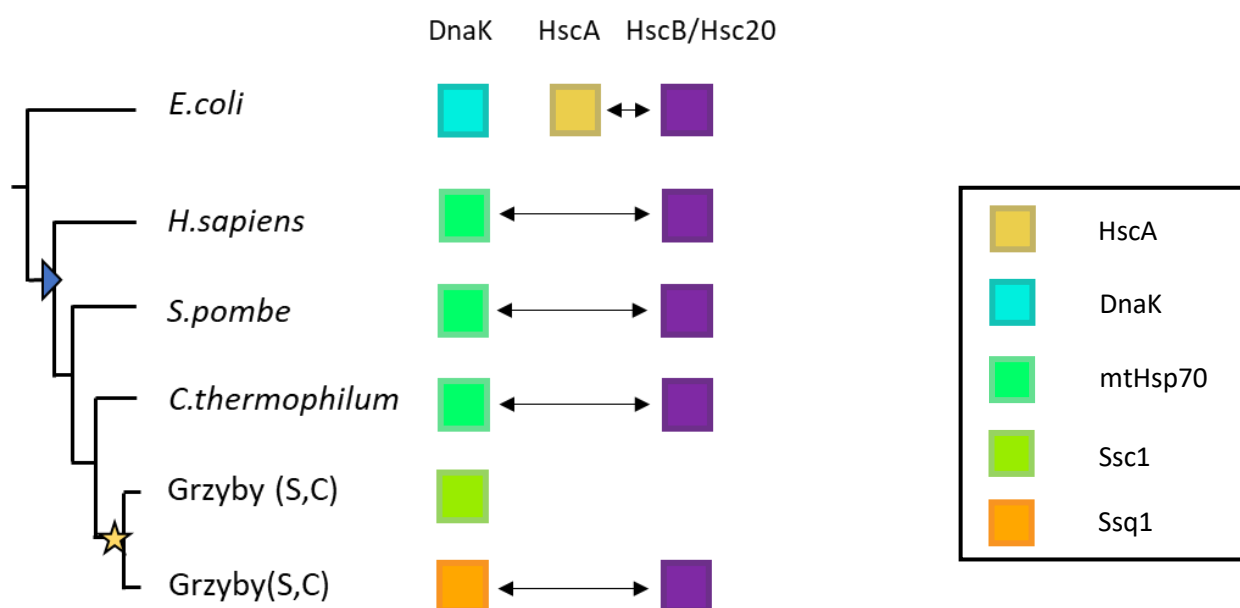
Zmiany w motywie LPPVK wpływają na wiązanie drożdżowego białka Isu z Ssq1. Wprowadzenie mutacji w obrębie motywu LPPVK powoduje również defekt wzrostu komórek

drożdżowych. W związku z tym aby określić, czy fenotypy wzrostu prezentowane przez komórki ze zmutowanymi wariantami białka Isu korelują z ich biochemicznymi właściwościami, oczyszczono zmutowane białka Isu i przetestowano ich zdolność do wiązania Ssq1 w doświadczeniach polegających na wirowaniu w gradiencie glicerolu w obecności ADP. Przeprowadzone eksperymenty jednoznacznie pokazały, że trzy reszty P134, V135 i K136 w motywie LPPVK mogą odgrywać kluczową rolę w tworzeniu stabilnego kompleksu z Ssq1. Aby dalej zweryfikować postawioną hipotezę, przeprowadzono analizę oddziaływania zmutowanych białek Isu z Ssq1 w obecności opiekuńczego białka J Hsc20 i ATP. Zgodnie z opisanymi wcześniej właściwościami biochemicznymi białek Hsp70, nie wykryto stabilnej interakcji między Isu i Ssq1 w obecności ATP przy braku Hsc20. Jednakże dodanie białka Hsc20 i ATP do mieszaniny reakcyjnej efektywnie stymulowała utworzenie stabilnego kompleksu Isu-Ssq1, który można było oddzielić przez wirowanie w gradiencie glicerolu od kompleksu Isu-Hsc20 (170). Na kolejnym etapie zbadano, czy zmutowane wersje białka Isu posiadające podstawienie jednej z reszt motywu LPPVK były zdolne do tworzenia stabilnego kompleksu z Ssq1 w obecności ATP i Hsc20. Uzyskane wyniki były w pełni zgodne z wynikami uzyskanymi dla oddziaływania Isu-Ssq1 w obecności ADP, to znaczy tworzenie kompleksu Isu-Ssq1 w obecności ATP i Hsc20 było także zaburzone, kiedy w doświadczeniu wykorzystano warianty Isu ze zmienionymi trzema ostatnimi aminokwasami w motywie LPPVK. Ponadto pokazano, że zmiany w motywie LPPVK wpływają na zdolność Isu do stymulacji aktywności ATPazy Ssq1. Zmiany P134A, V135A lub K136A w obrębie Isu zaburzały zdolność tego białka do stymulacji ATPazy Ssq1 w obecności białka Hsc20. Tak więc uzyskane wyniki analizy biochemicznej są zgodne z wynikami doświadczeń *in vivo* i wskazują że mutacje zaburzające prawidłowe funkcjonowanie szlaku biogenezy centrów Fe-S u drożdży korelują z ich defektem we wzroście.

## 1.9 Ewolucja mitochondrialnego systemu Hsp70

Historia organizmów eukariotycznych wiąże się z teorią endosymbiozy, w której mitochondria powstały z przekształcenia  $\alpha$ -proteobakterii w mitochondria (171). Mitochondria odziedziczyły większość białkowych składników szlaku ISC, zaangażowanego w biogenezę centrów Fe-S, po swoich bakteryjnych przodkach. Zarówno białko rusztowania (Isu w *S. cerevisiae*), jak i białko J (Hsc20 w *S. cerevisiae*) są obecne u wszystkich eukariontów, natomiast gen kodujący wyspecjalizowane białko Hsp70 (HscA) został utracony w trakcie ewolucji mitochondriów (Rycina 24). Jak dotąd jego ortolog nie został zidentyfikowany w żadnym z badanych genomów eukariotycznych (172). Większość genomów eukariotycznych, w tym ludzki, koduje tylko jedną kopię mitochondrialnego Hsp70, który jest blisko spokrewniony z bakteryjnym DnaK (Rycina 26) (173). Dotychczasowe analizy sugerują, że mitochondrialne wielofunkcyjne białko Hsp70 zastąpiło wyspecjalizowane białko bakteryjne w biogenezie centrów Fe-S (172), współpracując w tym procesie z wyspecjalizowanym białkiem J – Hsc20, umożliwiając w ten sposób transfer centrów Fe-S z białka rusztowania Isu do białek biorców.





**Rycina 26 Historia ewolucji systemów Hsp70 zaangażowanych w biogenezę centrów Fe-S.**

(Po lewej) Drzewo filogenetyczne przedstawiające ewolucję mitochondrialnych białek Hsp70 (mtHsp70) w wybranych organizmach. U bakterii wyspecjalizowane Hsp70 HscA działa w biogenezie Fe-S z dedykowanym białkiem J - HscB, podczas gdy wielofunkcyjne białko Hsp70 - DnaK odgrywa inne role biologiczne. U podstawy organizmów eukariotycznych zaznaczona została granatowa strzałka wskazująca gdzie HscA zostało utracone. Mitochondrialne Hsp70, potomek bakteryjnego DnaK, współpracując z ortologiem białka HscB zwanym Hsc20 zastąpiło go w biogenezie centrów Fe-S. Żółta gwiazdka znajdująca się w grupie grzybów oznacza moment zajścia duplikacji genu kodującego białko mtHsp70, który spowodował powstanie wielofunkcyjnego białka Ssc1 i wyspecjalizowanego Ssq1. Czarne strzałki wskazują funkcjonalne interakcje między ortologami HscB/Hsc20 a ich partnerami Hsp70. Grzyby oznaczone S i C to odpowiednio: *Saccharomyces cerevisiae* (S), *Candida albicans*(C) (174)

Biogeneza centrów Fe-S ma kluczowe znaczenie we wszystkich organizmach. U drożdży *S.cerevisiae* gen *SSC1*, który jest paralogiem genu *SSQ1*, koduje wielofunkcyjne białko Hsp70 zlokalizowane w mitochondriach, które oprócz funkcji w biogenezie centrów Fe-S pełni wszystkie pozostałe zadania „białka przodka”, będąc zaangażowane między innymi w transport polipeptydów przez błonę wewnętrzną mitochondriów i fałdowanie białek, a także utrzymanie mtDNA (175). Warto zaznaczyć, że przeprowadzone analizy filogenetyczne wykazały, że większość eukariontów, w tym ludzie, ma jedno, wielofunkcyjne mtHsp70. Tylko wąska grupa grzybów, w tym *Saccharomyces cerevisiae*, zawiera dodatkowe wysoce wyspecjalizowane mtHsp70 – Ssq1, które jest dedykowane do pełnienia roli w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych (Fe-S). Białko Ssq1 jest kodowane przez gen, który powstał w wyniku duplikacji genu mtHSP70 u wspólnego przodka *Candida albicans* i *S.*

*cerevisiae* (172) (176) około 300 milionów lat temu (177). W przeciwieństwie do Ssq1, Ssc1, wielofunkcyjne Hsp70 oddziałuje z różnymi polipeptydami, w tym z konserwowanym ewolucyjnie peptydem LPPVK znajdującym się na wyeksponowanej pętli białek Isu1/IscU, która jest selektywnie rozpoznawana przez wyspecjalizowane białka Hs70, Ssq1/HscA (178). Wszystkie Hsp70, w tym Ssc1 i Ssq1, wymagają współpracy z pomocniczymi białkami typu J. Dotychczasowa literatura wskazuje, że Ssc1 *S. cerevisiae* działa z dwoma białkami J: Pam18 i Mdj1 (179). Z drugiej strony ani Pam18, ani Mdj1 nie stymulują aktywności ATPazy Ssq1 (180), co odzwierciedla fakt, że białko Ssq1 utraciło zdolność do wykonywania czynności typowych dla białek Hsp70 jak translokacja białek, czy udział w ich prawidłowym zwijaniu. Ssq1 współpracuje tylko z jednym białkiem J, Hsc20. Natomiast aktywność ATPazy Ssc1 jest stymulowana przez Hsc20, ale znacznie mniej skutecznie niż w przypadku białka Ssq1, co sugeruje, że białko Hsc20 *S. cerevisiae* zachowało pewną szczątkową zdolność do funkcjonowania z Ssc1 (172). Szeroko zakrojone badania wykazały, że istnienie Ssq1 u gatunków grzybów koreluje ze zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi w domenie J Hsc20 (181). Systematyczna analiza regionu pętli domen J białek Hsc20 wykazała, że jest on krótszy niż ten obecny w ortologach bakteryjnych lub ludzkim. Sugeruje to, że dopiero po wystąpieniu delecji w obrębie genu *HSC20*, która zmniejszyła wielkość domeny J, interakcja z Ssc1 została osłabiona, ale nie wpłynęła na interakcję z Ssq1. Zdarzenie delecji mogło działać jak ewolucyjna zapadka, utrudniając odwrócenie relacji struktura-funkcja przodków, promując w ten sposób wspólną ewolucję Hsc20 i Ssq1. Z biegiem czasu wzajemne zmiany obejmujące sekwencję poza regionem pętli Hsc20 zaowocowały wysoce specyficzną i wydajną interakcją między Ssq1 i Hsc20, tworząc maszynię opiekuńczą dostrojoną do funkcjonowania wyłącznie w biogenezie centrów Fe-S. Ostatnio wykazano, że „odporność” na mutacje białka Hsc20 wzrosła, gdy zaczęło ono współpracować z wyspecjalizowanym Hsp70 Ssq1 (182). Kilka mechanizmów może wyjaśnić wyższą tolerancję mutacji białka Hsc20, które działa z wyspecjalizowanym Ssq1. Najprostszą możliwością jest taka, że koewolucja Ssq1 z Hsc20 spowodowała powiększenie ich powierzchni oddziaływania, zwiększając w ten sposób wydajność ich interakcji. Taka ekspansja mogłaby z kolei kompensować negatywne skutki substytucji w obrębie motywu HPD domeny J białka Hsc20. Ponieważ zarówno Ssq1, jak i Hsc20 ewoluują w porównywalnym tempie, mogą wpływać na siebie nawzajem i tym samym na tempo substytucji reszt aminokwasowych poprzez wzajemną indukcję zmian kompensacyjnych. Innym możliwym wyjaśnieniem wyższej tolerancji Hsc20 na mutacje jest to, że działając z wyspecjalizowanym Ssq1 doszło do pewnego rozluźnienia ograniczeń funkcjonalnych (166). W gatunkach przed duplikacją Hsp70 białko Hsc20 konkuruje z innymi białkami J: Mdj1 i Pam18 o wspólnego partnera Hsp70 (183). Taka konkurencja między nimi w zatłoczonym środowisku komórkowym może ograniczać zmiany reszt aminokwasowych na ich powierzchni i powierzchni Hsp70. Zatem brak takiej konkurencji w przypadku pary Hsc20-Ssq1 mogło umożliwić zwiększenie szybkości ewolucji w obrębie sekwencji Hsc20 i Hsp70.

## 2 Cel pracy

Pierwszym celem niniejszej pracy było porównanie właściwości biochemicznych bakteryjnych (*Escherichia coli*) oraz eukariotycznych (*Saccharomyces cerevisiae*) systemów białek opiekuńczych Hsp70, które pełnią kluczowe funkcje w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych (Fe-S). Drugim celem było zbadania roli bakteryjnych białek opiekuńczych podczas biogenezy centrów Fe-S w warunkach *in vitro*.

## 3 Wyniki

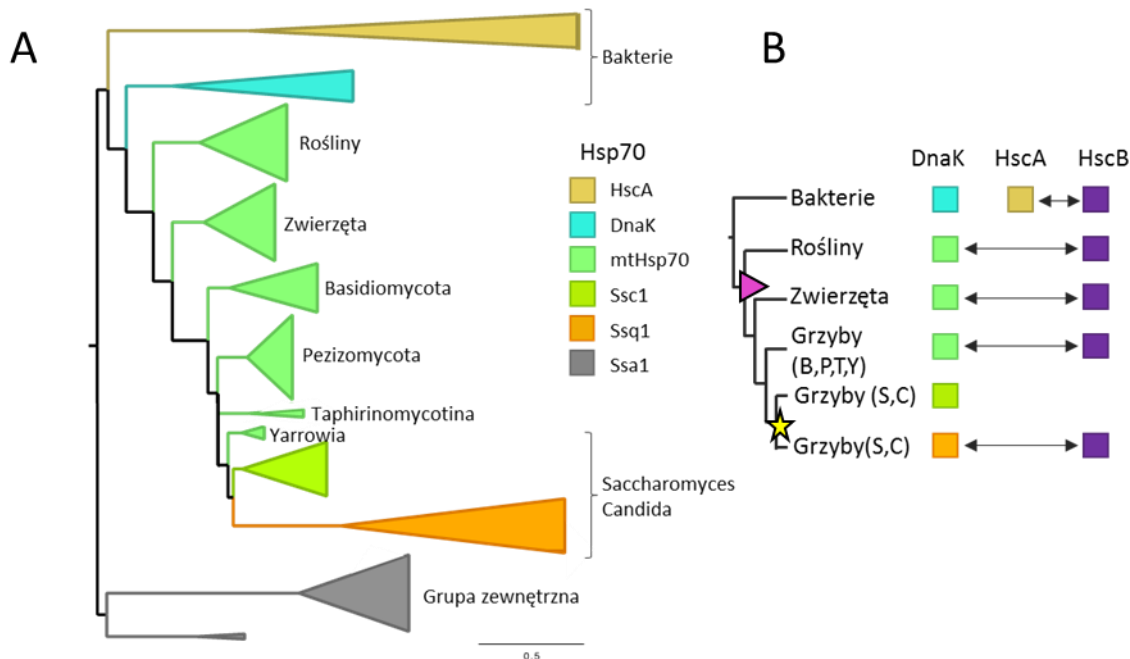
### 3.1 HscA jest daleko spokrewniony z Ssq1 i nie występuje w proteomach eukariotycznych

Pomimo wielu lat badań, ewolucyjne relacje pomiędzy systemami HscA/HscB i Ssq1/Hsc20 nie zostały w pełni zbadane (184) (172) (166) - nawet wyjaśnienie kluczowej kwestii, czy HscA występuje tylko u bakterii, czy też jego ortologi są również obecne u eukariotów wymagała kolejnych analiz. Aby zbadać zależności ewolucyjne pomiędzy HscA i Ssq1 zrekonstruowaliśmy filogenezę bakteryjnych oraz eukariotycznych Hsp70. Ponadto, aby poznać dystrybucję filogenetyczną HscA oraz HscB przeszukaliśmy, używając Ukrytych Modeli Markowa, bazę eukariotycznych proteomów.

Uzyskana przez nas filogeneza Maksymalnej wiarygodności (ang. *Maximun likelihood*) (Rycina 27) wskazuje, że mtHp70 jest bliżej spokrewnione z bakteryjnym białkiem DnaK, niż z HscA. Oznacza to, że wszystkie mitochondrialne Hsp70 mają wspólnego bakteryjnego przodka – DnaK. Mitochondrialne Hsp70 tworzą grupę monofiletyczną z DnaK z Alphaproteobacteria, co sugeruje ich endosymbiotyczne przejęcie od mitochondrialnego przodka (185). Wielofunkcyjne, eukariotyczne mtHsp70 tworzą kład z wielofunkcyjnym Ssc1 oraz wyspecjalizowanym białkiem Ssq1, które tworzą grupę monofiletyczną. To zgrupowanie Ssq1 jako siostrzanego do Ssc1 zgadza się z wcześniej opublikowanymi danymi (184) (172) wskazującymi, że Ssq1 powstało w wyniku duplikacji genu mtHsp70, która miała miejsce u podstawy kładu *Saccharomyces* i *Candida*.

Analiza dystrybucji filogenetycznej HscA i HscB u Eukariota przy użyciu Ukrytych Modeli Markowa (HMM) wykazała wszechobecność ortologów HscB w 1151 badanych proteomach eukariotycznych, co jest zgodne z ich kluczową rolą w biogenezie Fe-S (Rycina 28 A). Dla kontrastu, w proteomach eukariotycznych nie są obecne ortologi HscA. W wyniku przeszukiwania profilu HMM dla HscA zidentyfikowano tylko 9 potencjalnych ortologów, z których 7 na drzewie filogenetycznym grupowało się z DnaK, a 2 z mtHsp70 (Rycina 28 B). Ponadto, wyszukiwanie metodą zwrotnego BLAST wykazało, że wszystkie 9 jest bardziej podobnych do DnaK niż do HscA (Rycina 28 A). Podsumowując, nasze dane wskazują, że białko HscB obecne jest u wszystkich Eukariota, natomiast HscA nie zostało przekazane z komórki bakteryjnej do eukariotycznej, Ponadto Ssq1 jest bliżej spokrewniony z DnaK niż z HscA i że HscA został utracony podczas ewolucji mitochondriów (Rycina 27).

Podsumowując mogę stwierdzić, że mitochondrialny system biogenezy centrów Fe-S, jak również system Hsp70 mają swój początek w organizmie bakteryjnym. Przeprowadzona analiza ewolucyjna wykazała, że mitochondria odziedziczyły białko J od swoich bakteryjnych przodków, natomiast wyspecjalizowane białko Hsp70 – Ssq1 nie zostało odziedziczone, lecz powstało na drodze duplikacji genu w przypadku wąskiej grupy grzybów. Natomiast u większości eukariotów, również u grzybów, które są daleko spokrewnione z drożdżami *S.cerevisiae*, w mitochondriach występuje wielofunkcyjne białko Hsp70. To wielofunkcyjne białko, nazwane Ssc1 u grzybów, jest z kolei ortologiem białka DnaK, głównego białka opiekuńczego systemu Hsp70 *E.coli*. Białko Ssc1, dodatkowo prócz swojej funkcji w procesie biogenezy centrów Fe-S, bierze również udział między innymi w procesie fałdowania białek oraz imporcie białek do macierzy mitochondrialnej (186).



**Rycina 27 Relacje ewolucyjne między bakteryjnymi i mitochondrialnymi systemami Hsp70 zaangażowanymi w biogenezę białek Fe-S.**

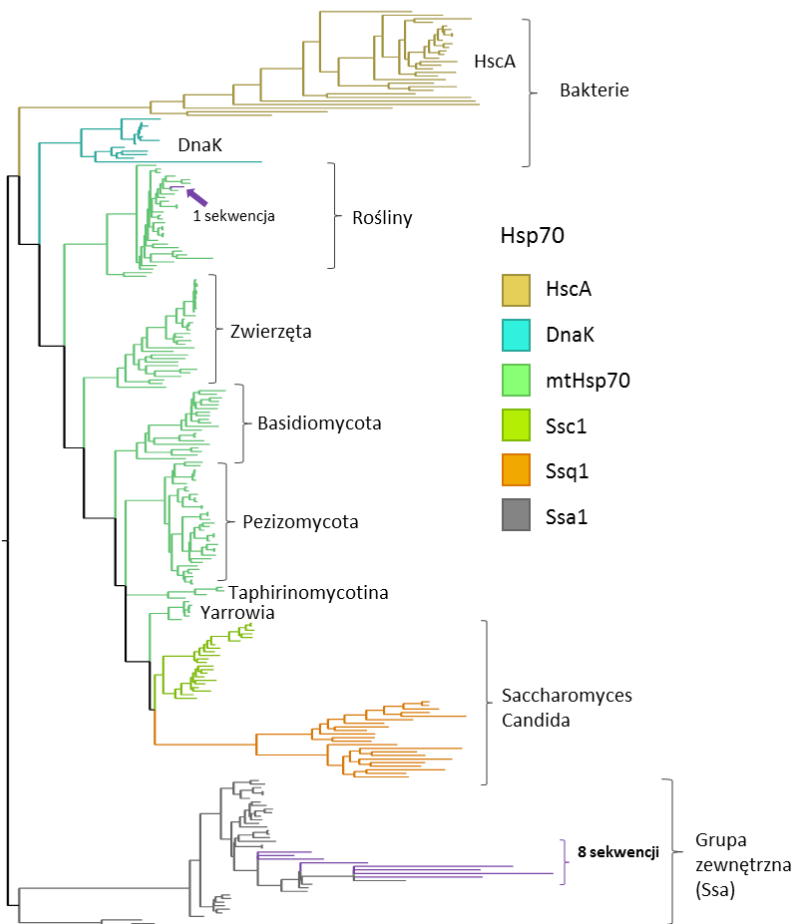
(A) Filogeneza Hsp70 biorących udział w biogenezie Fe-S, obliczona metodą największej wiarygodności (ang. *Maximum Likelihood*). Pasek skali: substytucje aminokwasowe na miejsce. Rozwiązane są tylko węzły ze wsparciem *bootstrap* > 0,7. Dla przejrzystości drzewo zostało ukorzenione na wspólnym przodku HscA i DnaK. (B) Historia ewolucji systemów Hsp70 zaangażowanych w biogenezę Fe-S. U bakterii wyspecjalizowany Hsp70 HscA funkcjonuje w biogenezie Fe-S z dedykowanym białkiem J HscB, podczas gdy wielofunkcyjne Hsp70 DnaK odgrywa inne role biologiczne. U podstawy linii Eukariotów (różowy trójkąt) HscA został utracony. Współpracując z ortologiem HscB, określanym jako Hsc20, mtHsp70, potomek DnaK, zastąpił HscA w mitochondrialnej biogenezie Fe-S. U podstawy kladu Saccharomyces i Candida (S,C), duplikacja genu mtHsp70 (żółta gwiazda) doprowadziła do powstania Ssq1, które następnie wyspecjalizowało się w biogenezie Fe-S, „odtworząc” wyspecjalizowany system bakteryjny HscA/HscB. Czarne strzałki wskazują na funkcjonalne interakcje między ortologami HscB/Hsc20 i ich partnerami Hsp70. Grupę zewnętrzną do tej analizy stanowią ortologiczne białka cytozolowe Ssa1. Na skali znajdują się przedstawienia aminokwasów na miejsce. Tylko węzły o wartościach *bootstrap* > 0,7 są informatywne i zostały brane pod uwagę podczas przeprowadzonej analizy. Strzałki wskazują funkcjonalne interakcje między ortologami HscB i ich partnerami Hsp70. Grzyby: Basidiomycota (B), Pezizomycota (P), Taphirinomycota (T), Yarrowia (Y), Saccharomyces (S), Candida (C). (174)

Analiza została przeprowadzona przez mgr Milenę Stolarską, Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed

A

Przeszukane proteomy	Pozytywne trafienia	
	HscA	HscB
Grzyby	0/661	661/661
Zwierzęta	2/339	339/339
Rośliny	7/113	113/113
Protisty	0/38	38/38

B

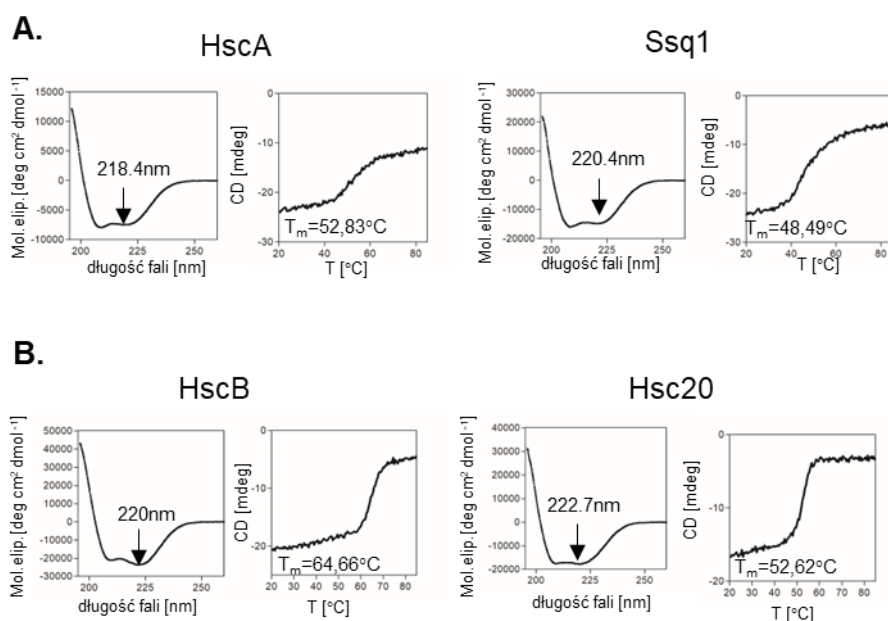


**Rycina 28 Dystrybucja filogenetyczna ortologów HscA i HscB w proteomach eukariotycznych.** (A) Liczba trafień podczas przeszukiwania proteomów eukariotycznych pod kątem obecności ortologów HscA i HscB przy użyciu ukrytych modeli Markowa (Hidden Markov Models) opartych na sekwencjach bakteryjnych; (liczba trafień/liczba proteomów). (B) Umieszczenie sekwencji zidentyfikowanych jako potencjalne ortologi HscA w filogenezie Hsp70. Skala obejmuje podstawienia aminokwasów na miejsce. (174)

Analiza została przeprowadzona przez mgr Milenę Stolarską, Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed

### 3.2 HscA i Ssq1 mają porównywalne wartości maksymalnej stymulacji aktywności ATPazowej

Biochemiczną analizę porównawczą bakteryjnego systemu Hsp70 z *E.coli* z jego mitochondrialnym odpowiednikiem obecnym u drożdży *S.cerevisiae* rozpoczęłam od zbadania widm dichrozimu kołowego (CD, *ang. Circular Dichroism*) oczyszczonych białek Hsp70 – HscA oraz Ssq1 (Rycina 29A). W następnej kolejności wyznaczyłam temperatury topnienia ( $T_M$ ) uzyskanych preparatów białkowych. Podobną analizę przeprowadziłam również w stosunku do oczyszczonych białek J- HscB i Hsc20 (Rycina 29 B).



#### Rycina 29 Widma dichrozimu kołowego i temperatury topnienia dla oczyszczonych białek Hsp70: HscA, Ssq1 (A.) oraz białek J: HscB i Hsc20 (B.).

Pomiary zostały wykonane tak jak opisano w metodach [Metody 7.15 ] Stężenie białek HscA, HscB oraz Hsc20 wynosiło 5  $\mu$ M, natomiast dla Ssq1 stężenie wynosiło 2.5  $\mu$ M. Dla każdego białka pomiar temperatury topnienia został wykonany przy długości fali zaznaczonej na rycinie strzałką. (174)

Widma dichrozimu kołowego dla HscA i Ssq1 (Rycina 29 A) wskazują że oba białka są prawidłowo zwinięte. Kształt uzyskanych widm sugeruje, że oczyszczone białka charakteryzują się strukturą drugorzędową zawierającą mieszaninę struktur  $\alpha$ -helis i  $\beta$ -kartek (Rycina 29 A). Widma CD (*ang. Circular Dichroism*) białek HscA i Ssq1 są podobne do opublikowanych wcześniej widm CD bakteryjnego białka DnaK z *E.coli* (187) i bydłęcego hsc70 (188).

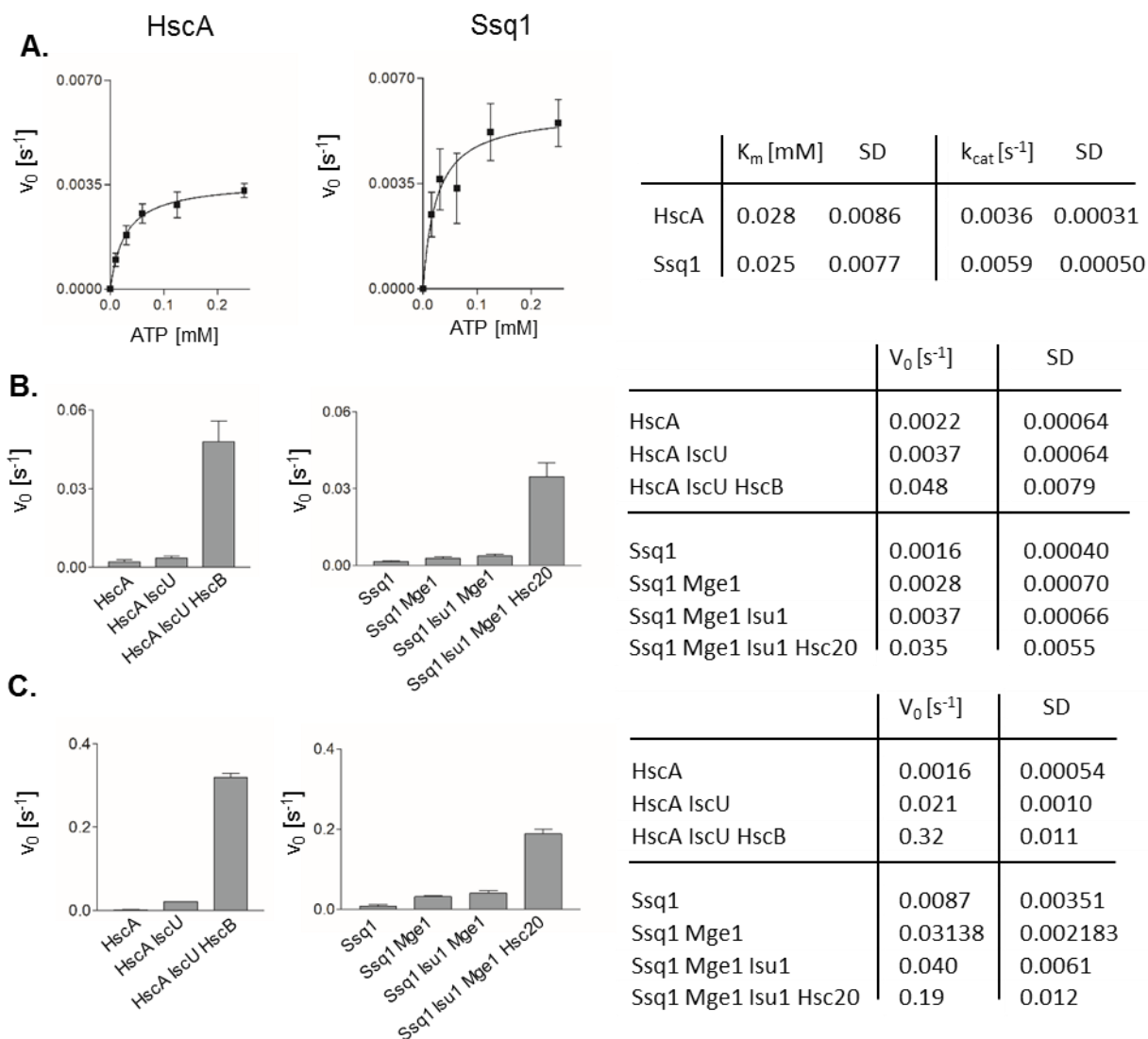
Widma CD, które uzyskałam dla obu współpracujących białek J, HscB i Hsc20 (Rycina 29 B), przypominają kształt widma białka charakteryzującego się obecnością w swojej strukturze jako dominującej struktury  $\alpha$ -helikalnej. Białka, które należą do rodziny białek J, są definiowane przez obecność „domeny J” (137). Struktura krystaliczna drożdżowego Hsc20 jest

bardzo podobna do struktur białek ortologicznych: HscB z *E. coli* (189) (ID PDB: 1FPO), HscB z *Vibrio cholerae* (ID PDB: 3HHO) i hHSC20 z *Homo sapiens* (PDB ID: 3BVO) przy identyczności sekwencji wynoszącym odpowiednio 29, 31 i 28%. Struktura Hsc20 i HscB ma kształt litery L i składa się z dwóch odrębnych domen  $\alpha$ -helikalnych: N-końcowej domeny J i C-końcowej domeny C wiążącej „molekularne rusztowanie”. Te dwie domeny są połączone łącznikiem. Rdzeń domeny J zawiera trzy  $\alpha$ -helisy, gdzie helisy H2 i H3 zawierają antyrównoległą spiralę połączoną pętlą z konserwatywnym motywem histydyna:prolina:kwas asparaginowy (HPD), który jest charakterystyczny dla domeny J (137). Domena J oddziałuje z Hsp70 związanym z ATP i stymuluje jego aktywność ATPazy, ale szczegóły molekularne tej przejściowej interakcji nie są dobrze poznane.

Dichroizm kołowy zastosowałam także do oceny stabilności HscA i HscB lub Ssq1 i Hsc20 podczas denaturacji termicznej. Na podstawie widm CD wybraliśmy długość fali odpowiadające obserwowanym szczytom: 220 nm dla HscB, 218,4 nm dla HscA, 222,7 nm dla Hsc20 i 220,4 nm dla Ssq1 do określenia temperatury topnienia określonego białka (Rycina 29 A i B). Zmiany sygnału CD przy ustalonej długości fali dla każdego białka opiekuńczego monitorowałam jako zmianę w mili stopniach (mdeg) wraz ze wzrostem temperatury od 20 do 85°C z szybkością 0,5°C/min. Analiza ta wykazała, że bakteryjne białka opiekuńcze, HscA ( $T_m=52,83^\circ\text{C}$ ) i HscB ( $T_m=64,66^\circ\text{C}$ ) mają wyższą stabilność termiczną w porównaniu z drożdżowymi odpowiednikami Ssq1 ( $T_m=48,49^\circ\text{C}$ ) i Hsc20 ( $T_m=52,62^\circ\text{C}$ ). (Rycina 29 A i B). Co zaskakujące, oba białka Hsp70 dedykowane do biogenezy centrów Fe-S charakteryzują się tylko jednym przejściem temperaturowym, a nie dwoma jak w przypadku wielofunkcyjnego Hsp70, kiedy to obserwowano jedno przejście dla domeny NBD i drugie dla domeny SBD. Jednym wyjaśnieniem zaobserwowanej różnicy dotyczącej przejść temperaturowych może być fakt, że w przypadku HscA i Ssq1 może mieć miejsce nakładanie się przejść temperaturowych rozfałdowanych domen SBD i NBD, jak to wcześniej zaobserwowano dla białka Ssc3 z *S.cerevisiae* (190). Co więcej analiza stabilności białek systemów Hsp70 w funkcji temperatury wykazała, że zarówno w przypadku systemu bakteryjnego jak i drożdżowego białka współpracujące typu J charakteryzują się większą stabilnością w stosunku do ich partnerskich białek Hsp70.

W następnej kolejności przeprowadziłam eksperymenty, których celem było porównanie powinowactwa białek Ssq1 i HscA do ATP. Aby wyznaczyć precyzyjnie wartości dla obu białek Hsp70 przeprowadziłam pomiary ich aktywności ATPazowej, miareczkując ATP. Do pomiarów podstawowej aktywności ATPazowej obu białek Hsp70 wykorzystałam metodę Nørby'ego (191) [Metody 7.12]. Dodatkowo dla białka Ssq1 pomiary były wykonane w obecności czynnika wymiany nukleotydów Mge1, aby zapobiec spowolnieniu reakcji poprzez powolną wymianę ADP/ATP. Otrzymana wartość  $K_m$  oznacza takie stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie maksymalnej szybkości tej reakcji. Czyli im jest mniejsza, tym jest większe powinowactwo do substratu, a im większa wartość tym powinowactwo enzymu do substratu jest mniejsze. Otrzymane wartości dla białek Hsp70 są bardzo podobne i wynoszą odpowiednio, 25  $\mu\text{M}$  dla Ssq1 i 28  $\mu\text{M}$  dla HscA, czyli ich powinowactwo do ATP jest niemal takie samo (Rycina 30 A).





### Rycina 30 Aktywność ATPazy HscA i Ssq1.

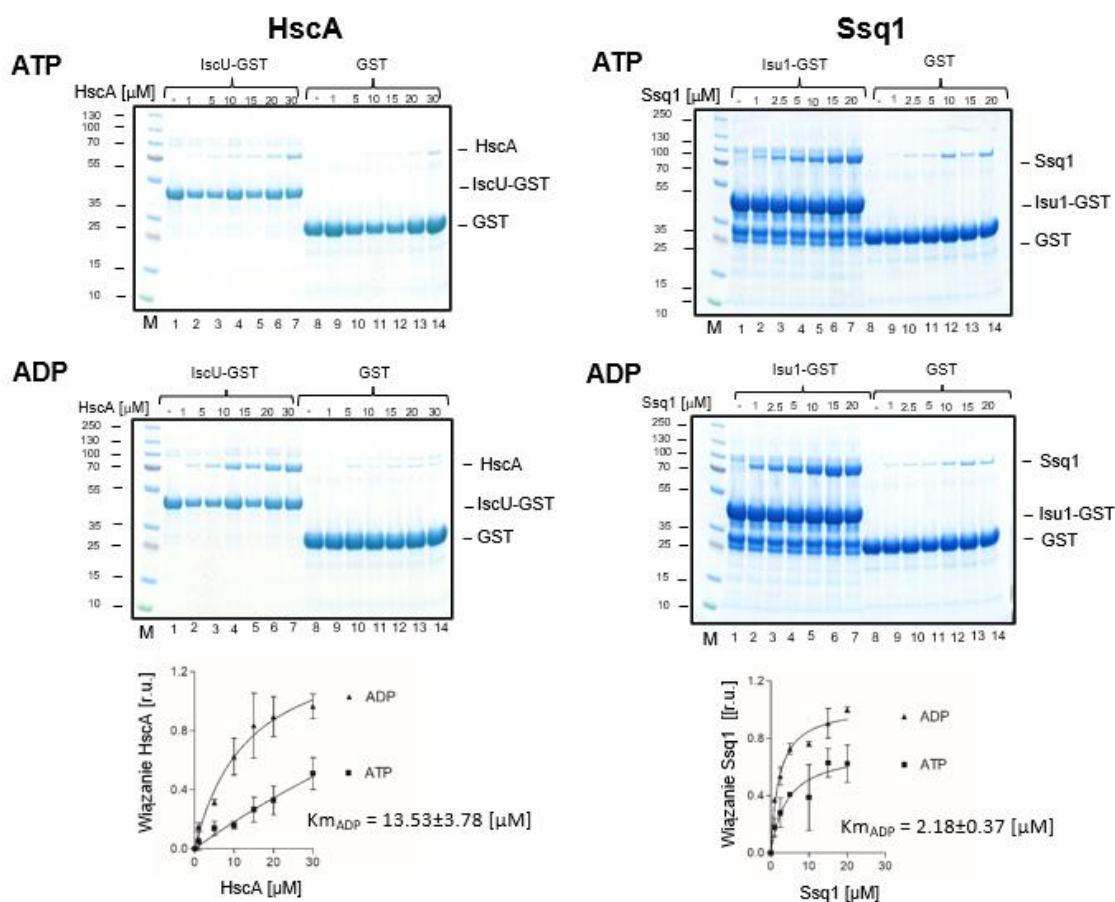
(A) Powinowactwo HscA i Ssq1 do ATP. Mieszanki reakcyjne zawierały 1  $\mu$ M HscA lub 2,5  $\mu$ M Ssq1 i Mge1. Szybkości ATPazy białka Hsp70 mierzyłam przy różnych stężeniach ATP [Metody 7.12]. Uzyskane krzywe są najlepszym dopasowaniem danych do równania Michaelisa-Mentena. Słupki błędów reprezentują błąd standardowy (SD, standard deviations) dla trzech niezależnych pomiarów. (B,C) Stymulacja aktywności ATPazy HscA i Ssq1 w obecności substratów białkowych i białek typu J. Średnie szybkości ATPazy dla trzech niezależnych pomiarów wraz z słupkami błędów przedstawione są formie tabeli po prawej. (B) Mieszanki reakcyjne zawierały 120  $\mu$ M ATP, 0,5  $\mu$ M HscA, 2  $\mu$ M HscB, 10  $\mu$ M IscU lub 0,5  $\mu$ M Ssq1, 2  $\mu$ M Hsc20, 10  $\mu$ M Isu1 i 0,5  $\mu$ M Mge1. Przeprowadziłam pomiar ilości uwolnionego radioaktywnego nieorganicznego fosforanu [ $\gamma$ - $^{33}$ P] z ATP [Metody 7.11] (C) Mieszanki reakcyjne zawierały 1 mM ATP, 0,5  $\mu$ M HscA, 50  $\mu$ M HscB, 50  $\mu$ M IscU lub 0,5  $\mu$ M Ssq1, 50  $\mu$ M Hsc20, 50  $\mu$ M CtIsu1 i 0,5  $\mu$ M Mge1. Uwolnienie nieorganicznego fosforanu mierzyłam za pomocą zestawu EnzChek firmy Themofisher zgodnie z procedurą opisaną w metodach [Metody 7.13] (174)

W następnej kolejności przystąpiłam do porównania aktywności ATPazowych obu białek Hsp70. Na wstępie zmierzyłam podstawową aktywność ATPazową białek Ssq1 i HscA. W tym celu wykorzystałam metodę pomiaru ilości uwalnianego radioaktywnie znakowanego fosforu  $^{33}\text{P}$  z ATP wyznakowanego  $^{33}\text{P}$  w pozycji  $\gamma$  (180). Dla obydwu białek uzyskałam wartości ich bazowych aktywności. W przypadku białka Ssq1 jego aktywność wynosi  $0,0016\text{ s}^{-1}$ , natomiast HscA  $0,0022\text{ s}^{-1}$  (Rycina 30 B). Są to wartości bardzo zbliżone, tak więc oba wyspecjalizowane białka Hsp70 charakteryzują się podobną podstawową aktywnością ATPazową. Ponadto otrzymane wartości są porównywalne z danymi doświadczalnymi uzyskanymi dla innych białek rodziny Hsp70 (192) (193). Następnie zadałam pytanie jak stymulowana jest aktywność obu białek przez substrat. W obu przypadkach aktywność ATPazy wzrosła tylko około 2-krotnie w obecności substratu białkowego (IscU dla HscA; Isu1 dla Ssq1 w obecności Mge1). Dopiero gdy mieszaniny reakcyjne zawierały zarówno substraty białkowe, jak i białka typu J (Rycina 30 B), szybkość obu ATPaz jest znacznie wyższa i wynosi odpowiednio  $0,035 \pm 0,0055\text{ s}^{-1}$  dla Ssq1 i  $0,048 \pm 0,0079\text{ s}^{-1}$  dla HscA. Dla reakcji, w których stymulacja aktywności Ssq1 i HscA jest maksymalna, występuje między nimi różnica wynosząca około 30%. Analizując dane literaturowe spodziewałam się 10-krotnie wyższych wartości szybkości ATPazy HscA w obecności IscU i HscB (154). Jednak podczas eksperymentów, opisanych w analizowanej literaturze, zastosowano wyższe stężenia IscU i HscB. Zdecydowałam się zatem na porównanie szybkości ATPazy Ssq1 i HscA, stosując wcześniej opublikowane warunki eksperymentalne:  $50\ \mu\text{M}$  Isu/Isu i  $50\ \mu\text{M}$  Hsc20/HscB. Ponadto, aby te pomiary były porównywalne z wcześniej opublikowanymi danymi, wykorzystałam dostępny komercyjnie zestaw EnzChek do pomiarów ilości uwalnianego Pi i tym samym do określenia szybkości hydrolizy ATP przez białka Hsp70 (154). Ponieważ nie byłam w stanie oczyścić *S. cerevisiae* Isu1 w wystarczająco wysokich stężeniach, w jego miejsce zastosowałam białko Isu1 oczyszczone z termofilnego grzyba *Chaetomium thermophilum* (CtIsu1). Podczas wcześniejszych badań wykazaliśmy, że CtIsu1 bardzo skutecznie stymuluje ATP-azę Ssq1 (166). Ponadto dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że CtIsu1 może zastąpić natywny Isu1 w *S. cerevisiae* (194) *in vivo*. Wykorzystując opisane wyżej warunki eksperymentalne, uzyskane wartości szybkości ATPazy HscA i Ssq1 w obecności substratu i białka J są około 6-krotnie wyższe, niż te zmierzone w teście radioaktywnym i wynosiły odpowiednio  $0,32 \pm 0,011\text{ s}^{-1}$  i  $0,19 \pm 0,012\text{ s}^{-1}$  (Rycina 30 C). W tym układzie eksperymentalnym obserwowana różnica między wartościami aktywności przy maksymalnej stymulacji aktywności ATPazy pomiędzy białkami HscA i Ssq1 wynosiła 40 %, czyli zmieniła się nieznacznie w stosunku do różnicy między wartościami szybkości zmierzonych w teście radioaktywnym. Moje pomiary wskazują, że białko HscA charakteryzuje się wyższymi wartościami aktywności ATPazowej, niż Ssq1 w obecności substratu i białka J. Niemniej obserwowana przeze mnie różnica nie jest tak dramatyczna jak można się było spodziewać, analizując wcześniej opublikowane dane.

### 3.3 Ssq1 ma wyższe powinowactwo do substratu niż HscA

Dotychczasowa literatura jednoznacznie pokazuje, że zarówno HscA, jak i Ssq1 bardzo skutecznie oddziałują ze swoimi substratami odpowiednio z IscU oraz Isu. Niemniej wciąż bez odpowiedzi pozostała kwestia, jak różne lub podobne są powinowactwa wyspecjalizowanych Hsp70 do tych substratów (169) (180). Aby porównać oddziaływanie obu białek Hsp70 z „molekularnym rusztowaniem”, wykorzystałam w tym celu białko fuzyjne, które obejmowało odpowiednio białko IscU lub Isu w fuzji z fragmentem glutationowej S-transferazy (GST). Wykorzystanie tego typu konstruktów umożliwiło mi w następnej kolejności przeprowadzenie eksperymentów polegających na precypitacji kompleksów białkowych, dzięki zastosowaniu złoża agarozowego z przyłączonym zredukowanym glutationem, do którego fragment GST w obrębie białka fuzyjnego wykazuje wysoką zdolność wiązania (132). Na wstępie przeprowadziłam eksperymenty, w których zmieniałam stężenie Ssq1/HscA w obecności stałego stężenia białka fuzyjnego Isu1/IscU-GST. Przygotowane mieszaniny reakcyjne były inkubowane, tak aby kompleks Hsp70-substrat mógł się utworzyć. Następnie po inkubacji do reakcji dodawane było złożo z przyłączonym glutationem, do którego wiązały się białka IscU/Isu poprzez znacznik GST wraz ze związanym z nimi białkami Hsp70. Analizę tworzenia kompleksu białko Hsp70-substrat przeprowadziłam w obecności ATP lub ADP. Dotychczasowa literatura jednoznacznie wskazuje (195) (196), że w stanie związanym z ATP szczelina wiążąca substrat Hsp70 jest „otwarta”, w związku z tym wiązanie i uwalnianie substratu zachodzi z dużą szybkością i odzwierciedla niskie powinowactwo białka Hsp70 do substratu, podczas gdy w stanie związanym z ADP szczelina wiążąca substrat jest zamknięta, co z kolei przekłada się na wysokie powinowactwo białka Hsp70 do substratu. Wyniki uzyskane dla obu Hsp70 - Ssq1 i HscA są zgodne z opisanym powyżej modelem. Skuteczne wiązanie Isu1/IscU-GST obserwowałam dla obu białek Hsp70 w obecności ADP, podczas gdy mniej wydajne wiązanie miało miejsce w obecności ATP.

Uzyskane wartości  $K_m$  w obecności ADP podczas miareczkowania stężeniem białek Hsp70 w obecności stałego stężenia substratu wynoszą odpowiednio  $2,18 \pm 0,37 \mu\text{M}$  dla Ssq1 i  $13,53 \pm 3,78 \mu\text{M}$  dla HscA. W tym przypadku wartość  $K_m$  uzyskana dla stanu związanego z ADP jest wygodną miarą powinowactwa Hsp70 do substratu białkowego. Tak więc zgodnie z tym moja analiza wskazuje, że drożdżowe białko Ssq1 ma ~6-krotnie wyższe powinowactwo do substratu niż bakteryjne białko HscA(Rycina 31).

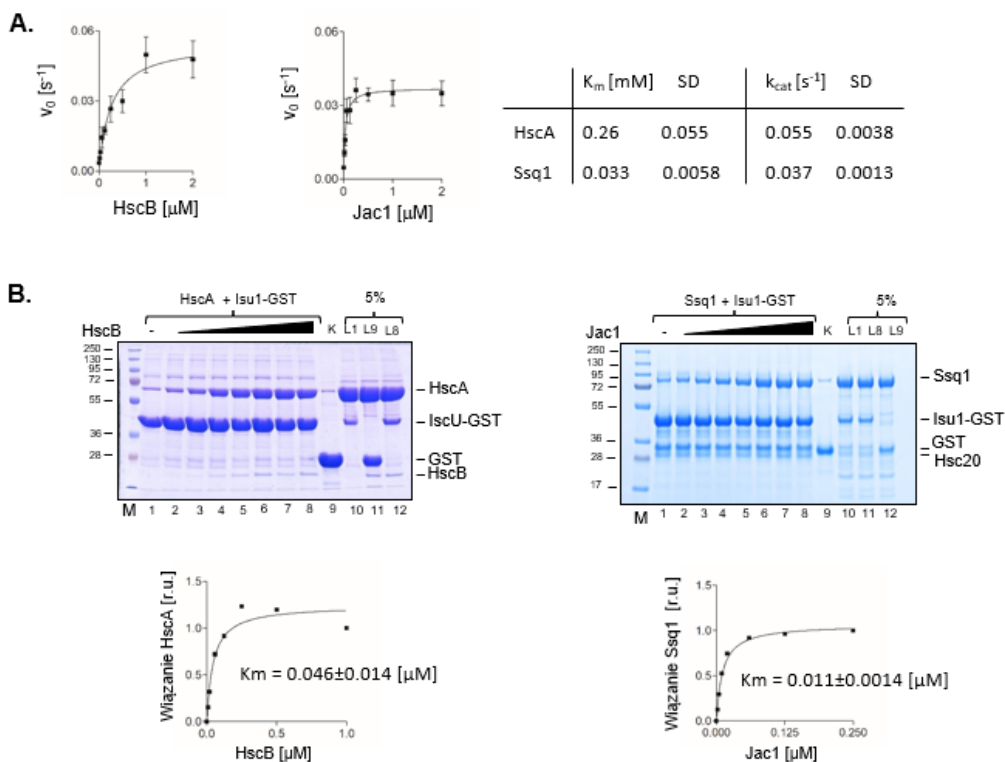


**Rycina 31 Wiązanie HscA i Ssq1 do substratu białkowego (IscU/Isu1) w obecności ATP lub ADP.** (po lewej) IscU-GST (15 μM) lub GST (15 μM) inkubowałam w obecności ATP lub ADP (4 mM) ze wzrastającymi stężeniami HscA, zgodnie z opisem na rycinie. Następnie dodawałam żłozę agarozowe opłaszczone zredukowanym glutationem, do którego przyłączają się białka posiadające znacznik GST. W następnej kolejności powstałe kompleksy analizowałam na żelu poliakrylamidowym poprzez rozdział próbek metodą SDS-PAGE i barwienie błękitem Coomassie. Związane HscA oznaczałam ilościowo poprzez analizę densytometryczną. Uzyskane wartości, odpowiadające ilości Hsp70 w kompleksie, na wykresach przedstawiłam jako jednostki względne (r.u.). Krzywe reprezentują najlepsze dopasowanie danych do równania hiperbolicznego Michaelisa-Mentena. Na wykresach przedstawiłam wartości  $K_m$  uzyskane w obecności ADP ( $K_{m_{ADP}}$ ). Słupki błędów reprezentują błąd standardowy (SD, standard deviations) dla trzech niezależnych pomiarów.

(po prawej) Isu1-GST lub GST (30 μM) inkubowałam w obecności ATP lub ADP (4 mM) ze wzrastającymi stężeniami Ssq1. Procedura była taka, jak opisałam powyżej podczas analizy oddziaływania HscA/IscU. „M” wskazuje ścieżki, na które naniesiono marker masy cząsteczkowej. (174)

### 3.4 Ssq ma wyższe powinowactwo do współpracującego białka z domeną J niż HscA

Pomiar powinowactwa Hsp70 do współpracującego z nim białka J jest trudne ze względu na fakt, że ich interakcja jest bardzo przejściowa (197). Niemniej wcześniej w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej zostały opracowane dwa podejścia eksperymentalne (129) pozwalające na wyznaczenie wartości  $K_m$ , które opisują powinowactwo białka Ssq1 do oddziałującego z nim białka Hsc20. W pierwszym typie doświadczeń zbadalam stymulację aktywności ATPazy białka Ssq1 poprzez wzrastające stężenie białka Hsc20 w obecności nadmiaru Isu1. Druga metoda, którą wykorzystałam, opierała się na wykorzystaniu techniki precypitacji kompleksów białkowych poprzez białko fuzyjne IscU/Isu-GST (ang. *pull-down*), którą to opisałam w poprzednim rozdziale. Kiedy doświadczenie precypitacji kompleksów białkowych przeprowadziłam w obecności ATP wydajność interakcji HscA/IscU-GST oraz Ssq1/Isu1-GST znacznie wzrasta wraz ze wzrostem stężenia białka współpracującego typu J – odpowiednio HscB lub Hsc20. Analiza densytometryczna obserwowanych prążków Hsp70 tworzących kompleks z substratem w obecności ATP i białka J, a następnie dopasowanie uzyskanych wartości z densytometrii do modelu Michaelisa-Menten umożliwia określenie wartości  $K_m$ , która opisuje powinowactwo Hsp70 do współpracującego z nim białka J. W doświadczeniu precypitacji kompleksów białkowych obecność czynnika wymiany nukleotydów – białka Mge1 nie jest wymagana podczas analizy powinowactwa białka eukariotycznego Ssq1 w odróżnieniu do doświadczeń polegających na pomiarze szybkości hydrolizy ATP przez Ssq1. W związku z tym doświadczenie precypitacji kompleksów białkowych postanowiłam także wykorzystać, chcąc równolegle porównać systemy Ssq1/Hsc20 oraz HscA/HscB.



### **Rycina 32 Oddziaływanie białek Hsp70 HscA/Ssq1 z białkami współpracującymi typu J - HscB/Hsc20.**

(A) Stymulacja aktywności ATPazy HscA/Ssq1 w obecności wzrastających stężeń białek J. Aktywność ATPazy mierzyłam za pomocą testu radioaktywnego, zgodnie z opisem zamieszczonym pod Ryciną 30, ale z rosnącymi stężeniami HscB lub Hsc20. Krzywe przedstawiają najlepsze dopasowanie danych do równania Michaelisa-Menten. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy SD dla trzech niezależnych pomiarów.

(B) Interakcja HscA/Ssq1 z IscU/Isu1-GST w obecności białek J i ATP. **(po lewej)** IscU-GST (30  $\mu$ M) inkubowałam z HscA (30  $\mu$ M) w obecności ATP (4 mM) i wzrastających stężeń HscB (0,01; 0,02; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1  $\mu$ M). Złoże agarozowe z immobilizowanym glutationem dodawałam do reakcji w celu precypitacji IscU-GST i związanych z nim białek, które następnie rozdzielałam przeprowadzając elektroforezę poliakrylamidową SDS-PAGE i barwienie błękitem Coomassie. Ścieżka 9: kontrola, w której IscU-GST zastąpiłam GST, ponadto w mieszaninie reakcyjnej znajdowały się 1  $\mu$ M HscB + 30  $\mu$ M HscA ("K"). Ścieżki 10-12: kontrole reakcji (5% objętości mieszanin reakcyjnych pobranych z doświadczeń analizowanych na ścieżkach: L1, L9, L8 żelu poliakrylamidowego), M: ścieżki z wzorcem masy cząsteczkowej. Związany HscA oznaczyłam ilościowo metodą densytometryczną. Uzyskane wartości przedstawiłam jako jednostki względne (r.u.) Krzywa przedstawia najlepsze dopasowanie danych do równania Michaelisa-Menten.

**(po prawej)** Isu1-GST (2,5  $\mu$ M) inkubowałam z Ssq1 (4  $\mu$ M) w obecności ATP (4 mM) i wzrastających stężeń Hsc20 (0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,06; 0,125; 0,25  $\mu$ M). Złoże agarozowe opłaszczony zredukowanym glutationem dodawałam do reakcji w celu precypitacji Isu1-GST i związanych z nim białek, które następnie rozdzielałam, przeprowadzając elektroforezę SDS-PAGE. Po rozdzielaniu żele barwiłam błękitem Coomassie. Ścieżka 9: kontrola, w której Isu1-GST zastąpiłam GST, ponadto mieszanina reakcyjna zawierała 0,25  $\mu$ M Hsc20 + 4  $\mu$ M Ssq1 ("K"). Ścieżki 10-12: kontrole reakcji (5% objętości mieszanin reakcyjnych pobranych z doświadczeń analizowanych na ścieżkach: L1, L8, L9 żelu poliakrylamidowego) M: ścieżka z wzorcem masy cząsteczkowej. Związany z Isu1-GST Ssq1 oznaczyłam ilościowo metodą densytometryczną. Uzyskane wartości przedstawiłam jako jednostki względne (r.u.). Krzywa przedstawia najlepsze dopasowanie danych do równania Michaelisa-Mentena. (174)

Wartości  $K_m$  określone w oparciu o uzyskane wyniki z doświadczeń pomiaru szybkości ATPazy obu białek Hsp70 (Rycina 32 A) wykazały, że powinowactwo Ssq1 do Hsc20 jest około 8-krotnie wyższe niż powinowactwo HscA do HscB. Jednakże,  $k_{cat}$  zmierzone w tym teście było około 30% wyższe dla ATPazy HscA niż dla Ssq1, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi na Rycinie 30. Aby połączyć te dwa parametry w jedną miarę, która reprezentuje wydajność interakcji Hsp70/białko J, obliczyliśmy stosunek  $k_{cat}/K_m$ . Stosunek  $k_{cat}/K_m$  wynosił 1,21 s<sup>-1</sup>· $\mu$ M dla Ssq1 i 0,21 s<sup>-1</sup>· $\mu$ M dla HscA. Tak więc, również według tej miary, wydajność systemu Ssq1/Hsc20 była około 5-krotnie wyższa niż systemu HscA/HscB.

Z kolei wartości  $K_m$  uzyskane w oparciu o analizę doświadczeń precypitacji kompleksów białkowych były niższe (Rycina 32 B) niż te uzyskane z eksperymentów w których mierzyłam szybkości ATPazy. Jednak ogólna tendencja była taka sama, to znaczy powinowactwo Ssq1 do Hsc20 było ~4-krotnie wyższe niż bakteryjnego HscA do HscB. Tak więc podsumowując uzyskane wyniki wskazują, że zarówno Ssq1, jak i HscA oddziałują ze swoimi partnerami – białkami J bardzo wydajnie i są w stanie stymulować zależne od aktywności ATPazy białka Hsp70 cykle wiązania substratów w stężeniach poniżej stechiometrycznych. Warto jednak zauważyć, że w obu testach eukariotyczna wersja

wyspecjalizowanego białka Hsp70 - Ssq1 miało wyższe powinowactwo do Hsc20, niż bakteryjne HscA do HscB.

#### **4. Rekonstrukcja procesu biogenezy centrów Fe-S**

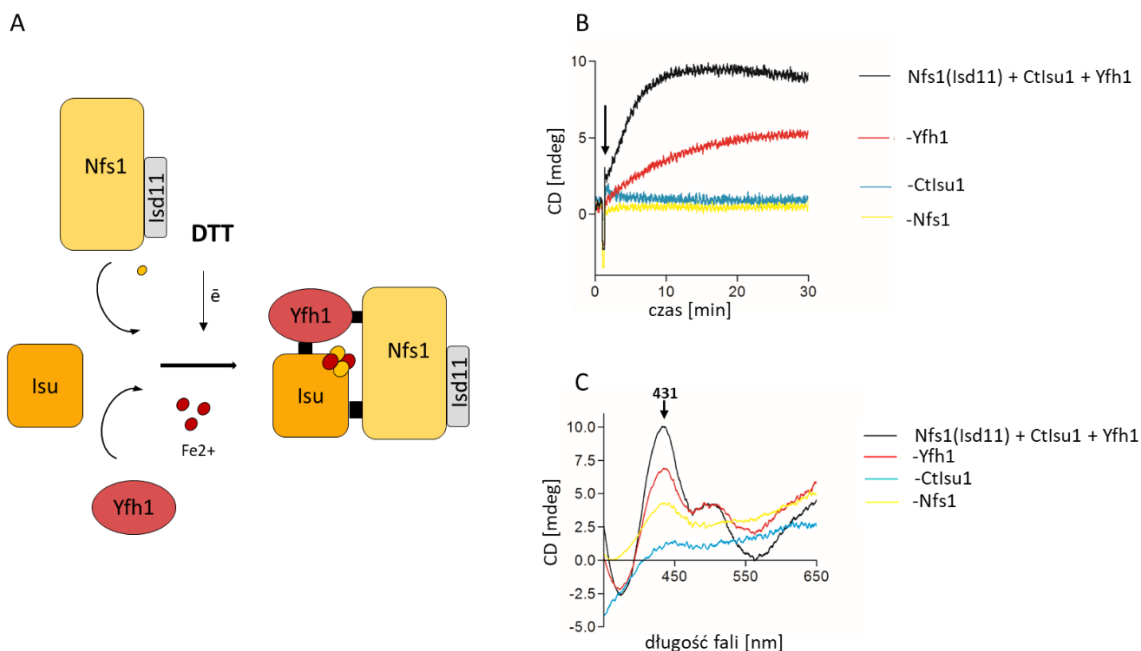
##### **4.1 Rekonstrukcja centrum Fe-S w obrębie białek pełniących rolę „molekularnego rusztowania” - Isu/IscU**

###### **4.1.1 Biochemiczna rekonstrukcja centrum Fe-S w obrębie eukariotycznego białka Isu1 z termofilnego grzyba *Chaetomium thermophilum* w obecności ditiotretolu (DTT)**

Przystępując do rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie eukariotycznego „molekularnego rusztowania” na wstępie przygotowałam w dużych ilościach preparat Isu1 o wysokim stężeniu. Białko Isu jest centralnym komponentem procesu i stanowi molekularne rusztowanie w obrębie, którego centrum Fe-S jest syntetyzowane *de novo*. Ponieważ nie uzyskaliśmy wysoce stężonych preparatów białka Isu *S. cerevisiae* zdecydowaliśmy się na zastosowanie białka Isu1 ze spokrewnionego z drożdżami termofilnego grzyba *C. thermophilum*. Na wstępie potwierdziliśmy w doświadczeniu typu precypitacja kompleksów białkowych, że białko Isu1 w fuzji z GST z *C. thermophilum* oddziałuje ze wczesnymi komponentami kompleksu syntezy Fe-S z *S. cerevisiae* z desufurazą cysteinową – Nfs1 (donor siarki) oraz z drożdżowym homologiem frataksyny – białkiem Yfh1 (dane nie pokazane).

Ponadto moje wcześniejsze analizy opisane w rozdziale 3.2, wykazały że białko CtIsu1 jest w pełni funkcjonalne w oddziaływaniu z drożdżowym systemem białek opiekuńczych Ssq1/Hsc20 w przeprowadzonych pomiarach stymulacji aktywności ATPazowej drożdżowego białka Hsp70. Dodatkowo również potwierdziłam, przeprowadzając eksperymenty typu precypitacja kompleksów białkowych, że drożdżowe białka opiekuńcze tworzą tak samo wydajnie kompleks z białkiem Isu1 *C. thermophilum*, jak z oczyszczonym z *S. cerevisiae*.

Na wstępie zadałam pytanie czy jest możliwe uzyskanie fizjologicznej postaci centrum Fe-S w obrębie białka CtIsu1 – formy 2Fe-2S podczas rekonstrukcji *in vitro* w warunkach beztlenowych w oparciu o oczyszczone wcześniej białka systemu ISC. Aby odpowiedzieć na to pytanie przeprowadziłam eksperymenty *in vitro* rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie CtIsu1, przygotowując mieszaninę reakcyjną, która zawierała białka: 100  $\mu$ M Isu1, 5  $\mu$ M Yfh1, 5  $\mu$ M desufurazę cysteinową Nfs1(Isd11), jak również źródło żelaza, czyli cytrynian amonu żelaza III (FAC, *ang. Ferric Ammonium Citrate*) oraz 5 mM DTT (ditiotretiol), który stanowił źródło elektronów (Rycina 33A). Reakcja ma charakter tylko częściowo fizjologiczny, ponieważ w tym przypadku mieszanina reakcyjna nie zawierała fizjologicznego źródła elektronów w postaci NADPH oraz łańcucha przenoszenia elektronów, czyli ferrodoksyny (Yah1) i jej reduktazy (Arh1).



### Rycina 33 Reakcja rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie białka CtlSu1

A. Schematyczna reprezentacja mieszaniny reakcyjnej przedstawia, białka które wykorzystałam podczas rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie Isu1. Źródłem elektronów podczas reakcji redukcji siarki S<sup>0</sup> do S<sup>2-</sup> był ditiotreitol (DTT).

B. Pomiar kinetyki reakcji syntezy centrum Fe-S przy długości fali 431 nm, która przypada na szczyt świadczący o obecności centrum Fe-S w obrębie „molekularnego rusztowania”. Start reakcji był inicjowany poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej roztworu cysteiny i został on zaznaczony na wykresie strzałką. Czarna linia: mieszanina reakcyjna zawierała białka Isu1, Yfh1 oraz kompleks Nfs1(Isd11); czerwona linia w mieszaninie pominęłam białko Yfh1; niebieska linia reakcja nie zawierała białka Isu1, natomiast żółta linia: kompleksu Nfs1(Isd11)

C. Widma CD zarejestrowane po przeprowadzonym pomiarze kinetyki reakcji rekonstrukcji centrum Fe-S, po 30 min inkubacji. Kolory widm przedstawionych na panelu C są zgodne z kolorami linii przedstawiających szybkość reakcji na panelu B ryciny

W celu detekcji centrum Fe-S w obrębie CtlSu1 wykorzystałam spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), rejestrując widmo w zakresie widzialnym (300 nm- 650 nm). Widmo jakie uzyskałam po 30 minutowej inkubacji mieszaniny reakcyjnej (czarna linia) było w pełni zgodne z danymi literaturowymi i widmem dichroizmu kołowego, które zostało opublikowane dla bakteryjnego białka IscU, w obrębie którego zrekonstruowano centrum 2Fe-2S (198)(Rycina 33C). W następnej kolejności zadałam pytanie z jaką szybkością dochodzi do syntezy centrum Fe-S w obrębie CtlSu1 W tym celu przeprowadziłam pomiar zmiany sygnału CD przy długości fali 431 nm, czyli przy długości fali przy której pojawia się charakterystyczny szczyt odpowiadający uformowanemu centrum Fe-S w obrębie CtlSu1(Rycina 33B). Ta analiza wykazała, że efektywna synteza centrum ma miejsce podczas pierwszych 10 minut od zainicjowania reakcji nstrzykiem cysteiny (czarna linia). Kolejne pytanie jakie się pojawiło dotyczyło specyficzności obserwowanego sygnału w związku z tym przeprowadziłam doświadczenia, w których mieszaniny reakcyjne nie zawierały określonego białkowego składnika, jak CtlSu1, Nfs1(Isd11) lub Yfh1. Pominięcie w mieszaninie reakcyjnej CtlSu1 lub



kompleksu desulfurazy cysteinowej Nfs1(Isd11) powodowało, że nie rejestrowałam charakterystycznej zmiany widma CD dla białka Isu (odpowiednio niebieska i żółta linia). Natomiast kiedy w reakcji pominęłam białko Yfh1 reakcja zachodziła, ale wolniej i mniej wydajnie (czerwona linia), co jest w pełni zgodne z założeniem, które sugeruje że frataksyna może pełnić rolę regulatora desulfurazy cysteinowej. W podsumowaniu mogę stwierdzić, że opracowana metoda rekonstytucji centrów Fe-S w obrębie eukariotycznego białka CtIsu1, pozwala na efektywne uzyskanie formy holo-Isu1, która może być wykorzystana podczas analiz transferu centrum z „molekularnego rusztowania” do białek docelowych.

#### **4.1.2 Biochemiczna rekonstytucja centrum Fe-S w obrębie bakteryjnego białka IscU z *E.coli***

W trakcie realizacji projektu pojawiły się sprzeczne doniesienia literaturowe dotyczące mechanizmu syntezy centrum w obrębie molekularnego rusztowania IscU/Isu. Dyskutowano, czy stosowany powszechnie ditiotreitól (DTT) podczas rekonstytucji centrów Fe-S nie prowadzi do generowania artefaktów doświadczalnych. Warto zwrócić uwagę, że dotychczas opublikowane wyniki dotyczące roli bakteryjnych systemów HscA/HscB w procesie transferu Fe-S z IscU na białko docelowe prowadzono wyłącznie w obecności DTT (199) (200).

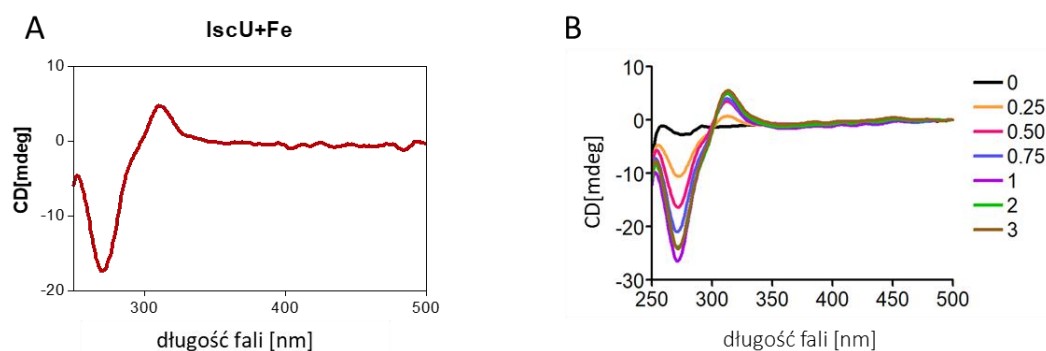
W ramach międzynarodowej akcji COST (European Cooperation in Science and Technology CA15133 - The Biogenesis of Iron-sulfur Proteins: from Cellular Biology to Molecular Aspects (Fe-SBioNet)), miałam możliwość współpracować z dr Benoit D'Autréaux (Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud), który opracował metodę rekonstytucji centrum Fe-S w obrębie białka Isu funkcjonującego w mitochondriach myszy, stosując warunki zbliżone do fizjologicznych- mieszaniny reakcyjne nie zawierały DTT (90).

W związku z tym na kolejnym etapie postanowiłam zmienić system badawczy z drożdżowego na bakteryjny *E.coli*, ponieważ ten umożliwił nam uzyskanie w dużej ilości kompletu białek z jednego organizmu. Ponadto opublikowane wyniki pokazują, że bakteryjny system Hsp70, składający się z białek HscA (bakteryjne białko Hsp70) oraz HscB (białko J), w obecności ditiotreitolu (DTT) stymuluje transfer centrum Fe-S z IscU(Fe-S) do glutaredoksyny monotiolowej oraz do ferrodoksyny (201) (202). Przyjęliśmy założenie, że powtórzenie opublikowanych wyników z zastosowaniem białek bakteryjnych pomoże nam w opracowaniu warunków reakcji optymalnych do badania udziału systemu Hsp70 w procesie transferu centrów FeS z białkowego rusztowania do białek docelowych.

Do rekonstytucji centrum Fe-S w obrębie IscU zastosowaliśmy metodę w pełni opartą o działanie enzymów, która wykorzystuje mieszaninę oczyszczonych białek bakteryjnych niezbędnych do biosyntezy centrum Fe-S. W Gdańsku opracowaliśmy procedury umożliwiające otrzymanie oczyszczonych preparatów bakteryjnych białek, które uczestniczą w tym procesie: IscU (molekularne rusztowanie), IscS (desulfuraza cysteinowa), CyaY (bakteryjny homolog frataksyny), Fdx (ferrodoksyna), FdxR (reduktaza ferrodoksyny) oraz preparat białka akceptorowego GrxD (glutaredoksyna monotiolowa). Wspólnie z dr Benoit D'Autréaux opracowaliśmy procedurę efektywnej rekonstytucji centrum Fe-S w obrębie IscU.

Na pierwszym etapie niezbędne było odpowiednie przygotowanie białek do eksperymentów. Ponieważ białko IscU oczyszczone z bakterii zawiera śladowe ilości cynku (Zn) w miejscu aktywnym, pierwszym etapem było jego usunięcie. W tym celu oczyszczone białko było inkubowane z kwasem dietylenotriaminopentaoctowym (DTPA) i ditiotretiolem (DTT) przez 1,5 h w temperaturze pokojowej. Następnie białko nakładałam na kolumnę Hi trap 16/60 Superdex 75, aby zmienić bufor i pozbyć się zredukowanych jonów metali. Do usunięcia DTT z próbki użyłam kolumny P5, na którą nałożyłam zagęszczone białko w komorze betlenowej. Następnie po zebraniu frakcji próbkę zagęściłam, dodałam do niej glicerol i zamroziłam w ciekłym azocie.

Na kolejnym etapie sprawdziłam zdolność wiązania się jonów żelaza do białka IscU oraz możliwość izolacji formy IscU zawierającej żelazo. W tym celu inkubowałam wcześniej przygotowane białko IscU z żelazem ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Aby móc ocenić, czy żelazo związało się do molekularnego rusztowania, przeprowadziłam pomiar widma dichroizmu kołowego. W wyniku pomiaru uzyskałam charakterystyczny kształt widma (Rycina 34A), który świadczył o tym, że IscU znajduje się w kompleksie ze związanym żelazem. Następnie zadałam pytanie jaka jest stechiometria wiązania żelaza przez białko IscU. W tym celu przeprowadziłam eksperyment, w którym miareczkowałam stężenie żelaza. Widma przestało się zmieniać, kiedy stosunek stężenia żelaza do białka w reakcji wynosił 1:1. Wyższe stężenia żelaza w reakcji nie prowadziły już do zmian widma, co sugeruje, że jedna cząsteczka IscU wiąże jeden jon żelaza (Rycina 34B). Podobny kształt widma oraz zależność od żelaza zaobserwowano wcześniej, charakteryzując wiązanie żelaza przez myszy wariant molekularnego rusztowania (90).

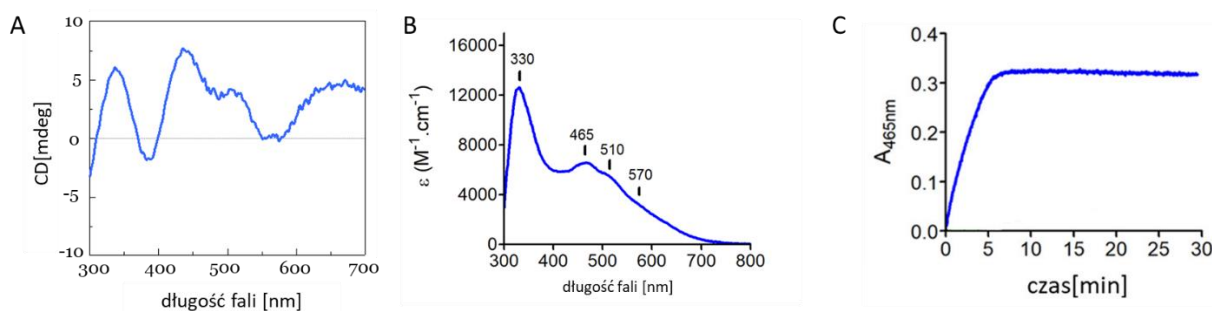


### Rycina 34 Charakterystyka spektroskopowa wiązania żelaza przez bakteryjne białko IscU

**A** Widmo CD białka IscU z przyłączonym żelazem. Insercja żelaza do bakteryjnego molekularnego rusztowania wymagała inkubacji apo-IscU z  $100 \mu\text{M}$  żelazem  $\text{Fe}^{2+}$  (Siarczan Amonu żelaza (II), sól Mohra). Pomiar CD został wykonany przy użyciu aparatu CD Jasco 650 w zakresie długości fali 250-500 nm. Stężenie IscU wynosiło  $100 \mu\text{M}$  w buforze reakcyjnym R (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 50mM NaCl).

**B** Zmiany widma dichroizmu kołowego białka IscU w obecności wzrastających ilości jonów  $\text{Fe}^{2+}$ . Ilości żelaza w mieszaninie reakcyjnej przedstawiłam jako stosunek molowy żelaza do IscU

Następnie zbadalam zdolność tak przygotowanego kompleksu Fe-IscU do wiązania centrum Fe-S. W tym celu opracowałam warunki eksperymentalne w warunkach beztlenowych, które pozwoliły mi na efektywną rekonstrukcję centrum Fe-S w obrębie IscU w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. W tym przypadku mieszanina reakcyjna zawierała następujące składniki bakteryjnej maszynerii ISC: IscS(10  $\mu\text{M}$ ), Fdx (5  $\mu\text{M}$ ), FdxR (5  $\mu\text{M}$ ), IscU(100  $\mu\text{M}$ ) oraz NADPH jako źródło elektronów(200  $\mu\text{M}$ ) i L-cysteinę (100  $\mu\text{M}$ ). Uzyskane widmo dichrozimu kołowego jednoznacznie potwierdziło, że w tym układzie rekonstrukcja centrum Fe-S IscU zakończyła się sukcesem i zarejestrowane widmo jest w pełni zgodne z widmem holo-IscU znanym z literatury (Rycina 35A). Obecność centrum potwierdziłam także, rejestrując widmo UV-Vis, po rekonstrukcji zaobserwowałam szczyty absorpcji w zakresie widzialnym przypadające na długość fali 330nm, 465nm, 510nm oraz 570nm (Rycina 35B). W następnej kolejności analizowałam szybkość tworzenia centrów Fe-S wykorzystując spektrofotometr UV-Vis i rejestrując zmianę sygnału przy długości fali 465 nm, a więc przy długości fali świadczącej o obecności zrekonstruowanego centrum Fe-S w obrębie IscU (Rycina 35C). Przeprowadzony pomiar wykazał, że proces syntezy centrum Fe-S w obrębie IscU w oparciu o w pełni zrekonstruowany system białek bakteryjnej maszynerii ISC zachodzi w czasie pierwszych 3 minut reakcji. W analizowanej reakcji zastosowałam fizjologiczne źródło elektronów w postaci NADPH oraz katalityczne stężenie białek Fdx oraz FdxR, w obu przypadkach zastosowane stężenie wynosiło 5  $\mu\text{M}$  i było znacznie niższe w stosunku do stężenia molekularnego rusztowania, które było obecne w stężeniu 100  $\mu\text{M}$  w mieszaninie reakcyjnej. Tak więc przeprowadzone pomiary jednoznacznie potwierdziły, że ma miejsce efektywna rekonstrukcja centrum w obrębie bakteryjnego białka IscU. Podobną zmianę absorbancji w czasie przy długości 465 nm zaobserwowano wcześniej, analizując mysie białko ISCU (90).



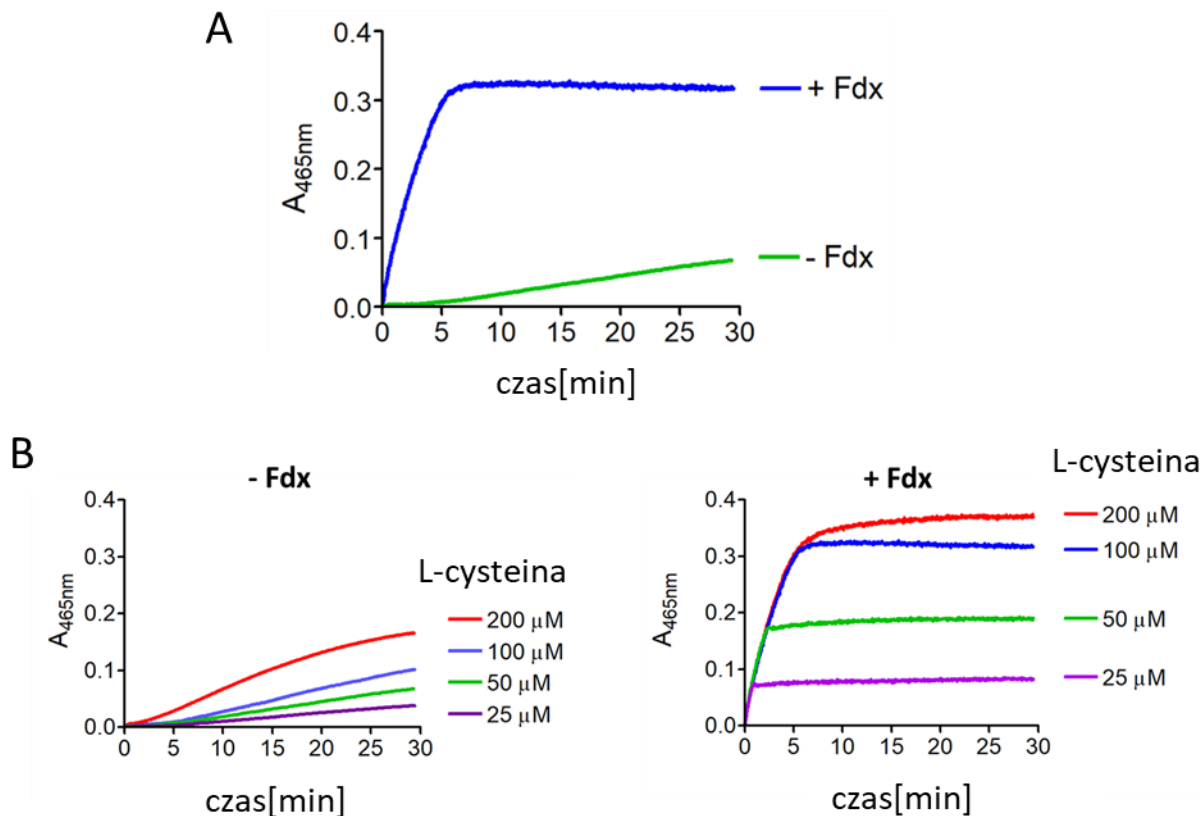
**Rycina 35 Rekonstrukcja centrum Fe-S w obrębie bakteryjnego białka IscU w warunkach *in vitro* w obecności oczyszczonego systemu białek bakteryjnej maszynerii ISC**

**A** widmo CD po rekonstrukcji centrum Fe-S białka holo IscU o stężeniu 100  $\mu\text{M}$  ( bufor 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ )

**B** widmo UV-Vis białka holo IscU po rekonstrukcji centrum Fe-S – zaznaczone zostały szczyty absorpcji w zakresie widzialnym przypadające na długości fali 330nm, 465nm, 510nm oraz 570nm. Stężenia białek w reakcji wynosiły odpowiednio: IscU 100  $\mu\text{M}$ , IscS 10  $\mu\text{M}$ , Fdx 10  $\mu\text{M}$ , FdxR 10  $\mu\text{M}$ , dodatkowo w reakcji było obecne 100  $\mu\text{M}$  żelazo, 100  $\mu\text{M}$  L-cysteina oraz 200  $\mu\text{M}$  NADPH.

**C** Pomiar kinetyki reakcji przy użyciu spektrofotometrii UV-Vis przeprowadzony w obecności białek maszynerii ISC: IscS(10  $\mu\text{M}$ ), Fdx (5  $\mu\text{M}$ ), FdxR (5  $\mu\text{M}$ ), IscU (100  $\mu\text{M}$ ) oraz NADPH jako źródła elektronów(200  $\mu\text{M}$ ), L-cysteiny (100  $\mu\text{M}$ ) oraz żelaza (100  $\mu\text{M}$ ) . Reakcja była inicjowana nastrzykiem L-cysteiny

W następnej kolejności zadałam pytanie, czy bakteryjny system przenoszenia elektronów obejmujący ferredoksynę rzeczywiście odgrywa kluczową rolę podczas syntezy centrów Fe-S w obrębie białka IscU. Aby odpowiedzieć na to pytanie zmierzyłam szybkość rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie IscU, kiedy mieszanina reakcyjna nie zawierała ferredoksyny. W tym przypadku zarówno szybkość jak i efektywność syntezy centrum Fe-S była znacznie upośledzona w stosunku do doświadczenia, w którym ferredoksyna była obecna w reakcji. (Rycina 36 A) (90). Na kolejnym etapie przeprowadziłam serię eksperymentów, których celem była odpowiedź na pytanie czy zastosowanie nadmiaru L-cysteiny, czyli substratu dla desulfurazy cysteinowej, podczas rekonstrukcji centrum Fe-S w warunkach *in vitro* może zrekompensować brak ferredoksyny w mieszaninie reakcyjnej. Uzyskany wynik jednoznacznie wykazał, że nawet w obecności nadmiaru L-cysteiny szybkość rekonstrukcji centrum w obrębie IscU jest znacznie upośledzona przy braku ferredoksyny i może być kompensowana jedynie w ograniczonym zakresie (Rycina 36 B), co może sugerować, że L-cysteina w dużym stężeniu może też pełnić funkcję redukującą (90). To założenie zostało potwierdzone przez wcześniejsze dane (203) pokazujące, że L-cysteina jest w stanie redukować nadsiarczek znajdujący się w obrębie mysiego białka NFS1, i jest to proces stymulowany przez ferredoksynę. Sugeruje to, że obecność Fdx nie zmienia wyniku reakcji a moduluje jej szybkość. Celem kolejnej serii doświadczeń, była odpowiedź na pytanie jakie jest optymalne stężenie i tym samym stosunek L-cysteiny w stosunku do obecnej w reakcji ferredoksyny. Uzyskane wyniki eksperymentów, w których mierzona była stężenie L-cysteiny wykazały, że optymalne stężenie jest równe stężeniu w jakim było obecne molekularne rusztowanie – białko IscU i nadmiar L-cysteiny prowadził już do niewielkich zmian w kinetyce i efektywności tworzenia centrów w obrębie IscU w obecności białka Fdx (Rycina 36 C). W większości do tej pory opublikowanych procedur rekonstrukcji centrów Fe-S w warunkach *in vitro* wykorzystywano niefizjologiczny czynnik redukujący ditiotreitrol (DTT). Niemniej DTT jest czynnikiem, który pośredniczy w redukcyjnym uwalnianiu siarczku z IscS–SSH, w związku z tym prawdopodobnie proces rekonstrukcji w tym przypadku postępuje w oparciu o wolny siarczek, aniżeli w oparciu o nadsiarczek związany z IscS. W konsekwencji reakcje wspomagane przez DTT mogą w pełni nie odzwierciedlać sytuacji fizjologicznej. Niemniej wykorzystując NADPH oraz system białek ferredoksyna / reduktaza ferredoksyny z sukcesem opracowałam procedurę rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie bakteryjnego IscU, w której ditiotreitrol (DTT) był nieobecny.



### Rycina 36

(A) Kinetyka rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie bakteryjnego IscU w obecności ferredoksyny Fdx (niebieska linia) oraz kiedy Fdx było pominięte w mieszaninie reakcyjnej (zielona linia). Standardowa reakcja rekonstrukcji obejmowała 100 μM IscU, natomiast IscS, Fdx i FdxR były obecne w stężeniu 10 μM. Ponadto mieszanina reakcyjna zawierała 100 μM Fe, 100 μM L-cysteinę i 200 μM NADPH.

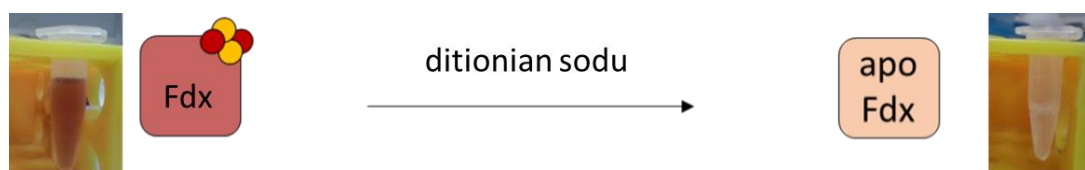
(B) Analiza zależności kinetyki rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie molekularnego rusztowania IscU od ilości L-cysteiny w reakcji przy braku (-Fdx) i w obecności (+Fdx). Standardowe stężenia białek w mieszaninie reakcyjnej wynosiły 100 μM IscU, natomiast IscS, Fdx i FdxR 10 μM. Ponadto mieszanina reakcyjna zawierała 100 μM Fe i 200 μM NADPH.

## 4.2 Transfer centrum Fe-S z holo-IscU do białka docelowego w formie apo

### 4.1.2 Charakterystyka spektroskopowa białek IscU, Fdx i GrxD w formie holo

Równolegle, opracowując metodę rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie molekularnego rusztowania, prowadziłam prace, których celem było oczyszczenie białek, które mogłabym wykorzystać w kolejnych badaniach dotyczących procesu transferu z molekularnego rusztowania do białek akceptorowych. W tym celu na wstępie postanowiłam wykorzystać oczyszczoną wcześniej bakteryjną ferredoksynę. Zarejestrowane widmo dichroizmu kołowego bakteryjnej ferredoksyny jest inne niż wcześniej zarejestrowane widmo białka IscU ze zrekonstruowanym centrum Fe-S (Rycina 35). Możemy między innymi wyróżnić szczyty przy długości fali 433 nm, 515nm i 556nm charakterystyczne dla tego białka, które nie są obecne w obrębie widma białka holo-IscU. Niemniej po oczyszczeniu białko Fdx ma brązowy kolor, co

koreluje z obecnością stabilnie związanego centrum Fe-S. Właśnie obecność tego charakterystycznego koloru doprowadziło do odkrycia pierwszych białek zawierających centra Fe-S (204) (205). Tak więc moim pierwszym krokiem było opracowanie metody opisanej szczegółowo w rozdziale 7.6, która pozwoliła mi na uzyskanie ferredoksyny w formie apo- (bez centrum Fe-S) i jednocześnie nie doprowadziła do utraty możliwości ponownego zrekonstruowania centrum Fe-S w obrębie białka Fdx. W tym celu przeprowadziłam inkubację oczyszczonego preparatu Fdx w warunkach beztlenowych w obecności silnego czynnika redukującego (ditionianu sodu). W trakcie tej inkubacji białko straciło kolor, co świadczy o uwolnieniu związanego centrum Fe-S (Rycina 34).

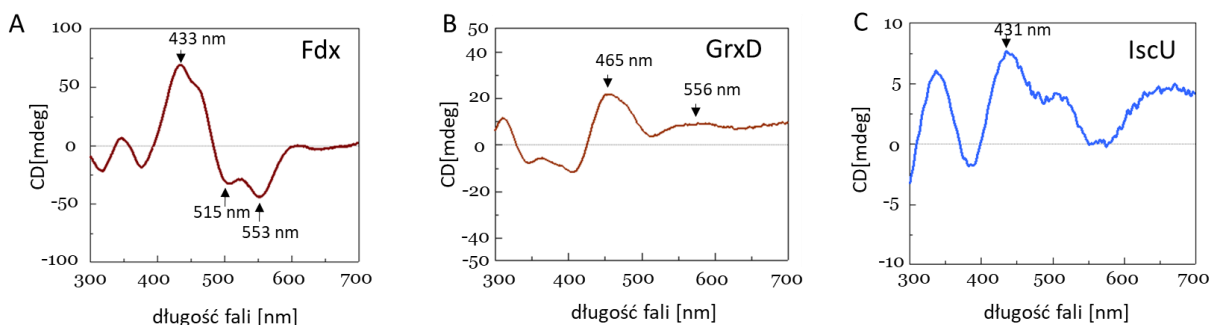


#### **Rycina 34 Zmiana koloru oczyszczonego preparatu białka Fdx w wyniku inkubacji z ditionianem sodu w warunkach beztlenowych**

Oczyszczony preparat Fdx charakteryzuje się typowym brązowym zabarwieniem świadczącym o obecności stabilnie związanego centrum Fe-S. Inkubacja bakteryjnej ferredoksyny z ditionianem sodu w warunkach beztlenowych prowadzi do utraty zabarwienia, co jednoznacznie świadczy o utracie związanego centrum Fe-S. Przedstawione na zdjęciu białko było wykorzystywane do dalszych analiz, których celem było zbadanie procesu transferu zrekonstruowanego centrum Fe-S w obrębie IscU do formy apo białka Fdx.

Drugim białkiem, które postanowiłam zbadać w doświadczeniach transferu, jako potencjalny akceptor była bakteryjna glutaredoksyna monotiolowa – białko GrxD. Także w tym przypadku uzyskany preparat oczyszczonego preparatu białka miał brązowy kolor. Także w obrębie zarejestrowanego widma dichroizmu kołowego oczyszczonego białka GrxD mogłam wyróżnić szczyty, które nie były obecne w obrębie IscU, a które przypadały między innymi na długość fali 556 nm. Także w tym przypadku opracowałam efektywną metodę, szczegółowo opisaną w rozdziale Metody, która pozwoliła mi na uzyskanie białka GrxD w formie apo.

Opisane wyżej różnice pomiędzy widmami dichroizmu kołowego dla poszczególnych białek zostały wykorzystane w kolejnych eksperymentach, w których badałam transfer zrekonstruowanego centrum Fe-S z IscU do białka docelowego – ferredoksyny (Fdx) lub monotiolowej glutaredoksyny (GrxD).



### Rycina 35 Widma dichroizmu kołowego białek Fdx, GrxD i IscU w formie holo

**A** Widmo CD białka holo Fdx o stężeniu 40  $\mu\text{M}$  ( bufor 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ )

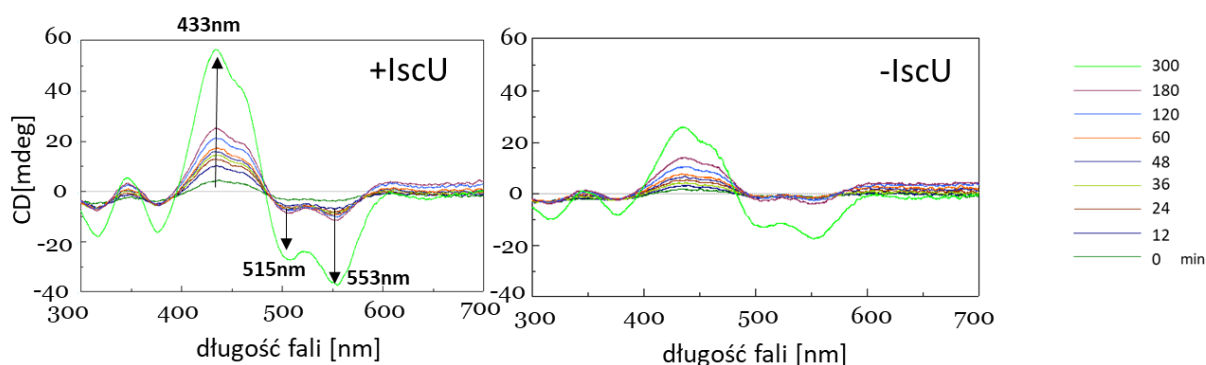
**B** Widmo CD białka holo GrxD o stężeniu 30  $\mu\text{M}$  (bufor 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ )

**C** Widmo CD białka holo IscU o stężeniu 10  $\mu\text{M}$  (bufor 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ )

#### 4.2.2 Transfer centrum Fe-S z IscU do Fdx

Pierwszym białkiem akceptorowym, które wykorzystałam w badaniach reakcji transferu centrum Fe-S z IscU-Fe-S, było białko apo Fdx. Doświadczenia przeprowadziłam w warunkach beztlenowych. Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała następujące białka: 10  $\mu\text{M}$  IscU, 2  $\mu\text{M}$  IscS oraz 80  $\mu\text{M}$  apo Fdx. Ponadto do reakcji dodałam również źródło żelaza w postaci 400  $\mu\text{M}$  cytrynianu amonu żelaza III (*ang. Ferric Ammonium Citrate*), 100  $\mu\text{M}$  askorbinian sodu, 100  $\mu\text{M}$  L-cysteina oraz 10 mM zredukowany glutation GSH, który w tym przypadku pełnił funkcję czynnika redukującego. Bufor reakcyjny obejmował 50 mM HEPES-KOH pH7.5, 150 mM KCl oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . W celu detekcji centrum Fe-S w obrębie Fdx wykorzystałam spektroskopię dichroizmu kołowego, rejestrując widma w zakresie widzialnym (od 300 nm do 700 nm). Zapis widm rozpoczęłam zaraz po starcie reakcji zainicjowanej poprzez nastrzyk L-cysteiny i wykonywałam je cyklicznie przez 5 godzin (0, 12, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 300 min), tak by monitorować proces tworzenia się centrum w obrębie białka akceptorowego Fdx. W wyniku przeprowadzonej reakcji, która zawierała zarówno molekularne rusztowanie - IscU oraz białko docelowe - Fdx, zaobserwowałam pojawienie się widma charakterystycznego dla białka holo-Fdx, które przyrastało w czasie, co świadczyło o zwiększającej się puli Fdx ze związanym centrum Fe-S (Rycina 37 A).

Powstało więc pytanie jak specyficzna jest ta reakcja i czy może zajść bez udziału molekularnego rusztowania? (Rycina 37 B). Aby na nie odpowiedzieć przeprowadziłam doświadczenie, w którym pominęłam w mieszaninie reakcyjnej białko IscU. Wyniki uzyskane z tej analizy wykazały, że brak IscU nie powoduje, że reakcja syntezy centrum Fe-S w obrębie ferredoksyny przestaje zachodzić. Niemniej jest wolniejsza i mniej wydajna, jeżeli porównamy uzyskane widma holo-Fdx w tych samych zakresach czasowych do widm holo-Fdx uzyskanych w obecności IscU.



**Rycina 37** Widma dichroizmu kołowego holo-Fdx rejestrowane w obecności IscU oraz przy jego braku w mieszaninie reakcyjnej.

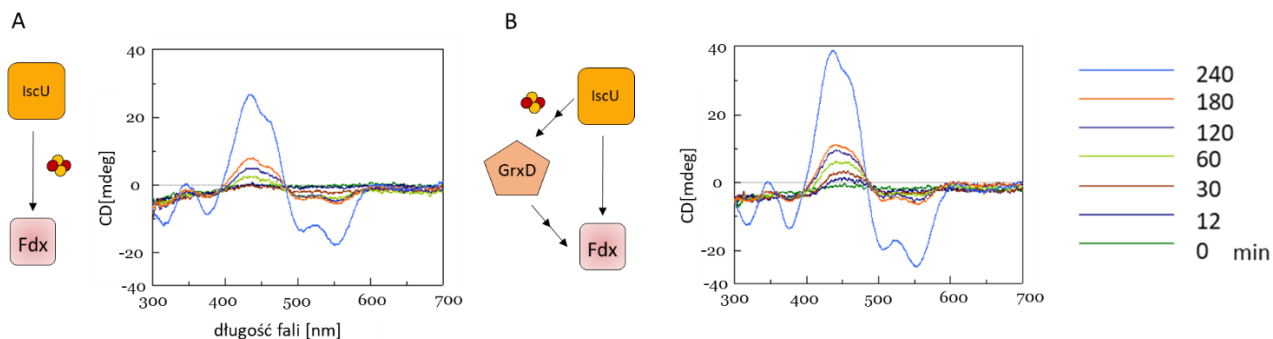
Na wykresach zaznaczone zostały długości fali typowe dla widma białka Fdx w formie holo, przy których obserwowałam wzrost [433nm] lub spadek [515nm, 553nm] sygnału świadczący o rekonstytucji centrum Fe-S w obrębie Fdx. Poszczególne linie przedstawiają kolejne widma rejestrowane w kolejnych czasach pomiarowych. Reakcja była prowadzona w buforze R o następującym składzie 50 mM HEPES-KOH pH7.5; 150 mM KCl ;10 mM MgCl<sub>2</sub>. Stężenia poszczególnych komponentów reakcji były następujące: 400 μM cytrynianu amonu żelaza III ; 100 μM askorbinian sodu ; 100 μM L-cysteina ; 10 mM GSH , natomiast stężenia białek w reakcji wynosiły: IscU 10 μM, IscS 2 μM, apo Fdx ~80 μM

#### 4.2.3 Transfer centrum Fe-S z IscU do Fdx w obecności GrxD

Na kolejnym etapie badań zadałam pytanie o wpływ bakteryjnej glutaredoksyny monotiolowej, białka GrxD, na szybkość i wydajność rekonstytucji centrum w obrębie ferrodoksyny Fdx. Istnieją doniesienia literaturowe, które wskazują, że białka należące do rodziny glutaredoksyn monotiolowych są wymagane na etapie transferu centrów Fe-S z molekularnego rusztowania do docelowych białek akceptorowych (206). Aby zweryfikować to założenie przygotowałam mieszaninę reakcyjną, która obejmowała: 10 μM IscU, 2 μM IscS, 60 μM apo Fdx oraz 20 μM apo GrxD . W celu detekcji transferu centrum Fe-S z IscU do Fdx wykonałam pomiary dichroizmu kołowego (CD), rejestrując widmo tak jak opisałam powyżej w zakresie widzialnym (300 nm- 700 nm). Skany widm rozpocząłam zaraz po starcie reakcji poprzez nastrzyk L-cysteiną i wykonywałam je cyklicznie przez 4 godziny (0,12,30,60,120,180,240 min), tak by obserwować proces tworzenia się charakterystycznego widma dla holo Fdx. Zgodnie w powyżej opisanym doświadczeniu w reakcji kontrolnej, czyli bez białka GrxD, obserwowałam transfer centrum Fe-S do białka docelowego, o czym świadczyło pojawienie się widma charakterystycznego dla holo-Fdx, które przyrastało w czasie (Rycina 38A). Niemniej dodanie białka GrxD do mieszaniny spowodowała znaczny wzrost sygnału przy długości fali 433 nm w stosunku do eksperymentu, w którym białko to zostało pominięte. Tak więc białko GrxD nie tylko przyspiesza reakcję transferu ale również sprawia, że holo Fdx tworzy się wydajniej, gdyż obserwowane szczyty przypadające na długość fali 433nm, 515nm oraz 553nm widma otrzymanego po 4 godzinach inkubacji reakcji są prawie



dwukrotnie większe w stosunku do reakcji, w której glutaredoksyina była nieobecna (Rycina 38 B).



### Rycina 38 Wpływ białka GrxD na transfer centrum Fe-S do apo Fdx

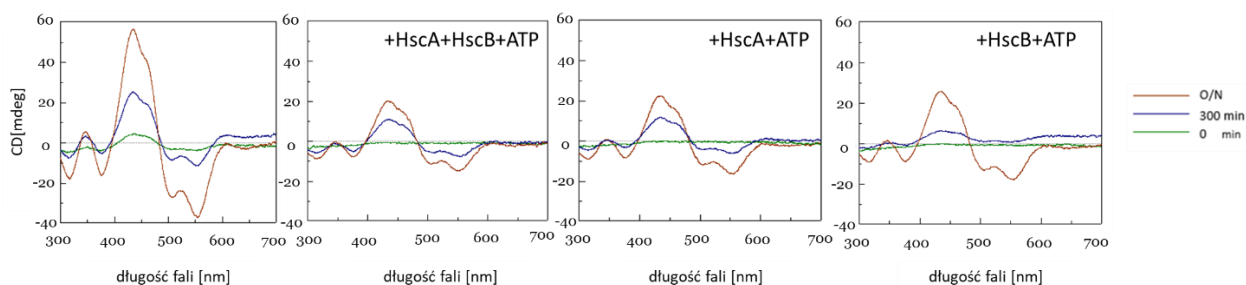
A Widma dichroizmu kołowego uzyskane w przypadku reakcji transferu centrum Fe-S do białka apo Fdx. Poszczególne linie przedstawiają kolejne widma rejestrowane w kolejnych czasach pomiarowych. Reakcja była prowadzona w buforze R o następującym składzie 50 mM HEPES-KOH pH7.5; 150 mM KCl ;10 mM MgCl<sub>2</sub>. Stężenia poszczególnych komponentów reakcji były następujące: 400 μM cytrynianu amonu żelaza III ; 100 μM askorbinian sodu ; 100 μM L-cysteina ; 10 mM GSH , natomiast stężenia białek w reakcji wynosiły odpowiednio: IscU 10 μM, IscS 2 μM, apo Fdx ~60 μM

B Widma dichroizmu uzyskane w przypadku reakcji transferu centrum Fe-S do Fdx w obecności białka GrxD. Stężenia białek, bufor oraz punkty pomiarowe takie same jak w podpunkcie A, dodatkowo w reakcji znajdowało się białko GrxD w stężeniu 20 μM

#### 4.2.4 Transfer centrum Fe-S z IscU do ferrodoksyiny Fdx w obecności białek opiekuńczych HscA/HscB

Kolejnym celem było zbadanie wpływu białek opiekuńczych HscA/HscB na proces transferu centrum Fe-S z IscU do kolejnych białek szlaku biogenezy centrów Fe-S. Dlatego w następnym etapie chciałam sprawdzić, czy oczyszczone przez mnie białka HscA i HscB hamują, czy przyspieszają reakcję transferu do Fdx. Wcześniej opublikowane dane literaturowe są kontrowersyjne ponieważ część wskazuje na przyspieszenie reakcji w obecności białek opiekuńczych bakteryjnego systemu Hsp70 (207) (208), a część na sytuację przeciwną (198). Do reakcji oprócz wcześniej opisanych białek, czyli 10 μM IscU, 2 μM IscS, 80 μM apo Fdx dodałam także białka opiekuńcze - 4 μM HscA i 4 μM HscB. Ponadto do mieszaniny reakcyjnej dodałam także 1mM ATP, które było niezbędne aby cykl ATPazy systemu białek Hsp70 mógł efektywnie zachodzić. Reakcja zawierała również pozostałe niezbędne składniki istotne podczas biosyntezy centrum Fe-S, takie jak opisałam w rozdziale 4.2.2.. W celu detekcji transferu centrum Fe-S z IscU do Fdx wykonałam ponownie pomiary dichroizmu kołowego (CD), rejestrując widma w zakresie widzialnym (300 nm- 700 nm). Zapis widm rozpocząłam zaraz po starcie reakcji poprzez nastrzyk L-cysteiną i wykonywałam je cyklicznie przez 5 godzin i po inkubacji mieszaniny reakcyjnej przez noc (O/N) (0min, 300min, O/N), tak by obserwować proces rekonstrukcji centrum w obrębie Fdx jak we wcześniej opisanych doświadczeniach. Dodanie systemu HscA/HscB spowodowało, że reakcja transferu Fe-S stała

się znacznie wolniejsza i również mniej wydajna (Rycina 39). Podobny efekt został już opisany wcześniej w literaturze (209), gdzie obserwowano hamowanie reakcji transferu centrum Fe-S do ferredoksyny po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej białka HscB. Taki efekt nie był obserwowany, kiedy w doświadczeniach wykorzystano zmutowane warianty białka HscB niezdolne do wiązania IscU, co sugeruje że tworzenie się kompleksu białek HscB i IscU prowadzi do zablokowania możliwości wydajnego transferu centrum Fe-S do białka docelowego. Podobnie wyniki moich doświadczeń wykazały, że dodanie tylko jednego białka systemu Hsp70, HscA lub HscB, powoduje silnie zahamowanie procesu rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie apo ferredoksyny.

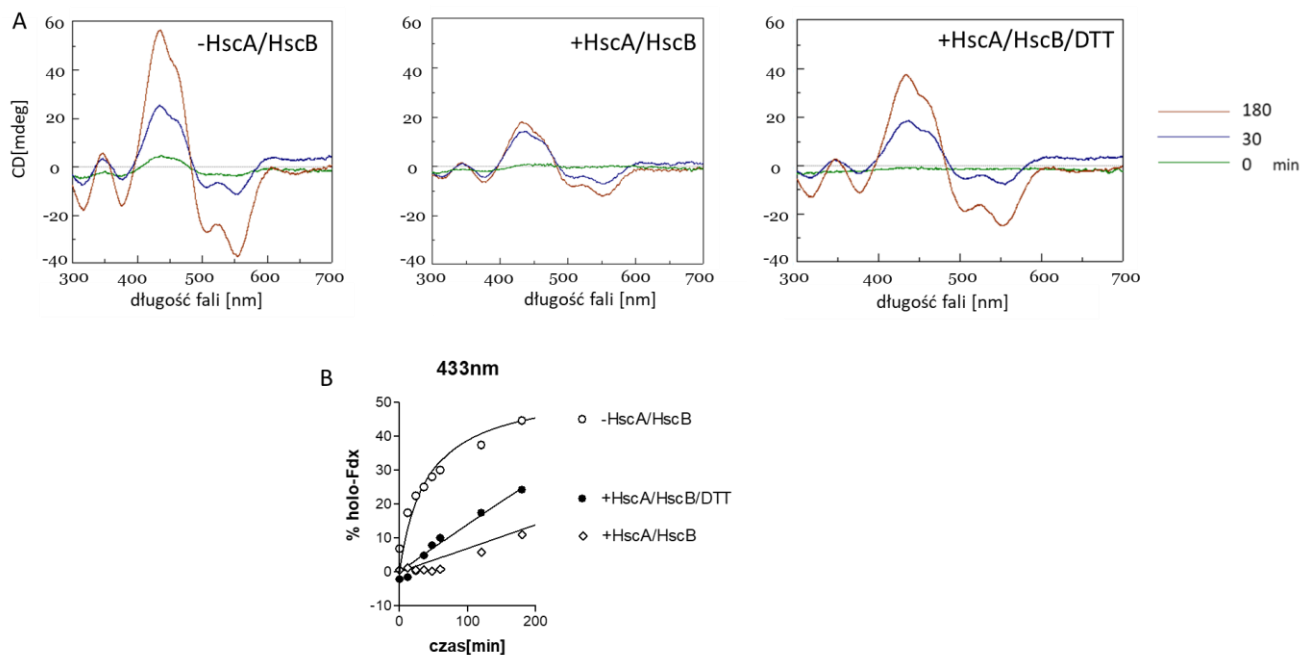


### Rycina 39 Transfer Fe-S do apo Fdx w obecności białek opiekuńczych HscA/HscB.

Przedstawione widma CD zostały zarejestrowane w odstępach czasowych 0 min, 300 min i po nocy (O/N). Reakcja była inicjowana poprzez nastryk L-cysteiny. Dodatkowo w eksperymentach, w których analizowałam efekt białek HscA/HscB te były dodatkowo nastrykiwane do mieszaniny reakcyjnej w obecności ATP. Stężenia białek w reakcji wynosiły odpowiednio: IscU 10  $\mu$ M, IscS 2  $\mu$ M, HscA 4  $\mu$ M, HscB 4  $\mu$ M oraz apo Fdx  $\sim$ 80  $\mu$ M.

Bufor reakcyjny obejmował 50 mM HEPES-KOH pH7.5; 150 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>, w reakcjach z dodatkiem białek opiekuńczych dodatkowo znajdowało się 1 mM ATP

Analiza dostępnej literatury, która opisywała efekt przyśpieszenia reakcji transferu w obecności systemu białek opiekuńczych pozwoliła mi zidentyfikować dość istotną różnicę w składzie mieszaniny reakcyjnej w stosunku do eksperymentów, w których obserwowano zahamowanie reakcji. Czynnikiem, który stanowił główną różnicę pomiędzy eksperymentami był ditiotreitól (DTT) (210). A zgodnie z wcześniej przytoczonymi wynikami badań, których celem była analiza molekularnego mechanizmu rekonstrukcji Fe-S centrum w obrębie molekularnego rusztowania, obecność DTT może prowadzić do artefaktów doświadczalnych (211). Tak więc postanowiłam zbadać, wykorzystując opracowany układ doświadczalny, co spowoduje dodanie DTT do reakcji, w której znajdują się białka opiekuńcze. Okazało się, że dodanie DTT w stężeniu 5 mM znosi częściowo efekt hamowania reakcji transferu w obecności białek opiekuńczych HscA/HscB (Rycina 40). A właśnie w takich warunkach, w obecności DTT, były przeprowadzane wcześniej opublikowane eksperymenty, które pokazywały stymulujący efekt białek opiekuńczych na proces transferu. Niemniej efekt ditiotreitolu nie jest fizjologiczny i jego obecność w reakcji najprawdopodobniej prowadzi także w przypadku moich eksperymentów do generowania artefaktów eksperymentalnych, poprzez zdolność do uwalniania siarczku z SSH-IscS.. (212)



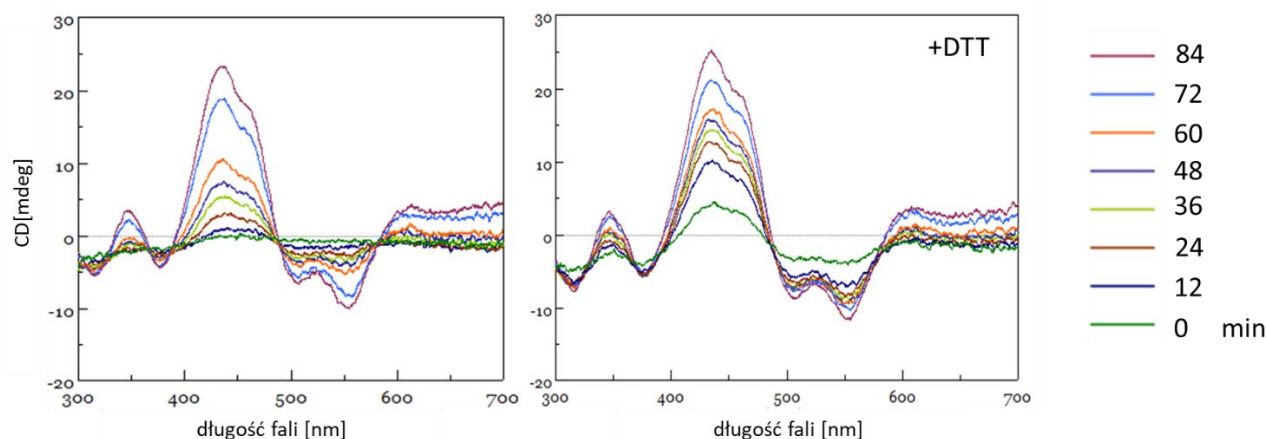
#### Rycina 40 Porównanie wydajności i kinetyki formowania holo Fdx w obecności białek opiekuńczych i DTT

A. Widma CD reakcji zostały zarejestrowane w odstępach czasowych 0, 30, 180 min. Reakcja była inicjowana poprzez nastryk L-cysteiną oraz dodatkowym nastrykiem mieszaniną białek HscA/HscB w obecności 1mM ATP, dodatkowo w reakcji gdzie zaznaczyłam w buforze znajdowało się 5 mM DTT. Doświadczenia przeprowadzałam w buforze R o składzie 50 mM HEPES-KOH pH7.5; 150 mM KCl ;10 mM MgCl<sub>2</sub>. Stężenia białek, które wykorzystywałam w eksperymentach wynosiły odpowiednio IscU 10 μM, IscS 2 μM, HscA 4 μM, HscB 4 μM, apo Fdx ~80 μM

B. Kinetyka i wydajność rekonstrukcji holo-Fdx. Wykres został uzyskane na podstawie zmian sygnału CD przy długości fali 433 nm, który to koresponduje z transferem centrum do apo Fdx w obecności białek opiekuńczych (HscA/HscB) oraz białek opiekuńczych i DTT(HscA/HscB/DTT).

#### 4.2.5 Wpływ DTT na szybkość transferu centrum Fe-S z IscU do Fdx

Ponieważ doświadczenia, w których badałam wpływ systemu bakteryjnych białek opiekuńczych HscA/HscB na szybkość transferu centrum Fe-S pokazały, że obecność DTT przyspiesza proces postanowiłam sprawdzić jaki jest efekt ditiotretolu na proces transferu Fe-S z IscU do bakteryjnej ferredoksyny, kiedy białka opiekuńcze były pominięte w mieszaninie reakcyjnej. W tym celu do reakcji dodałam DTT w stężeniu 5mM, tak jak w przypadku wcześniej przeprowadzonych doświadczeń w obecności białek opiekuńczych. Efekt przyspieszenia reakcji przez ditiotretitol jest doskonale widoczny kiedy porównamy widma reakcji przeprowadzonej w tych samych warunkach w obecności DTT i bez tego czynnika (Rycina 41).



#### Rycina 41 Wpływ ditiotretolu na formowania holo-Fdx w obecności IscU.

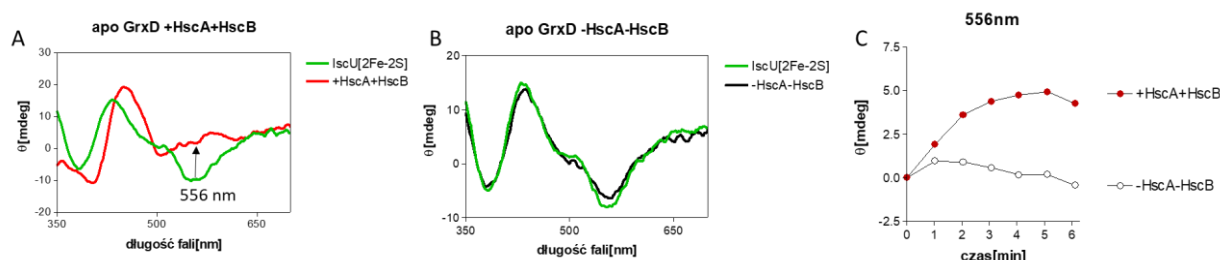
Zestawienie widm dichroizmu kołowego uzyskanych w przypadku reakcji nie zawierającej DTT, jak również dla reakcji z DTT. Kolejne widma korespondują z kolejnymi czasami rejestracji widma od zainicjowania reakcji nastrzykiem L-cysteiny, czyli odpowiednio w czasie 0 i po 12, 24, 36, 48, 60, 120 i 300 min od startu reakcji. Reakcja była przygotowana w buforze R o składzie 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, który dodatkowo zawierał 400 uM cytrynian amonu żelaza (III) 100 uM askorbinian sodu, 100 uM L-cysteina, 10 mM GSH oraz 5 mM DTT, tam gdzie zaznaczyłam. Stężenia białek w reakcji wynosiły odpowiednio: IscU 10 uM, IscS 2 uM oraz apo Fdx ~80 uM.

Dlatego prowadząc równoległe doświadczenia, których celem było opracowanie modelu badawczego *in vitro* pozwalającego zrekonstruować centrum Fe-S w obrębie IscU w oparciu o system zbliżony do warunków panujących w komórce udało mi się opracować działający system białkowy składający się z ferredoksyny (Fdx) i jej reduktazy (FdxR), które dostarczają niezbędnych elektronów w oparciu o fizjologiczne źródło elektronów - NADPH. I ten system postanowiłam wykorzystać w moich kolejnych doświadczeniach.

#### 4.2.6 Rekonstytucja transferu centrum Fe-S do białka docelowego w oparciu o biosyntezę centrum Fe-S w obrębie IscU obejmującą system białek Fdx/FdxR i NADPH

Reakcja była przygotowana w buforze R (50 mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM KCl 10 mM MgCl<sub>2</sub>) i obejmowała białka systemu ISC : 50 μM IscU, 5 μM IscS, 100 μM apoGrxD, 4 μM /4 μM HscA/HscB oraz 5 μM Fdx/FdxR. Ponadto mieszanina reakcyjna zawierała żelazo o stężeniu 50 μM, 25 μM L-cysteina oraz 1 mM ATP, natomiast źródłem elektronów było NADPH. Pierwszym etapem reakcji było zainicjowanie syntezy centrum Fe-S w obrębie białka IscU, które pełniło funkcję molekularnego rusztowania. Aby potwierdzić powstanie formy holo białka IscU wykonałam pomiar widma dichroizmu kołowego, który potwierdził, że rekonstytucja centrum Fe-S zakończyła się sukcesem (Rycina 42A, linia zielona). Następnie do reakcji dodałam białko akceptorowe – GrxD w formie apo oraz system białek opiekuńczych HscA/HscB Wpływ białek opiekuńczych zaobserwowałam poprzez zmianę kształtu widma reakcji charakterystycznego dla białka holo IscU na widmo, którego kształt sugeruje, że mieszanina reakcyjna zawiera holo GrxD, czyli doszło do efektywnego transferu centrum Fe-S z IscU do GrxD (Rycina 42A, linia czerwona). W momencie kiedy do reakcji dodałam tylko białko apo GrxD, ale nie dodałam systemu białek HscA/HscB nie zaobserwowałam zmiany

kształtu widma, dodanie białka GrxD nie inicjowało transferu centrum Fe-S (Rycina 42 B). Na kolejnym etapie zadałam pytanie dotyczące kinetyki procesu transferu centrum Fe-S z IscU do GrxD. Aby odpowiedzieć na to pytanie przeprowadziłam pomiar zmiany sygnału dichroizmu kołowego przy długości fali 556nm. Przyrost sygnału przy tej długości fali świadczył o formowaniu białka holo GrxD. Przeprowadzona analiza jednoznacznie potwierdziła, że transfer centrum z IscU do GrxD ma miejsce tylko w obecności systemu białek opiekuńczych Hsc/HscB oraz wykazała że sam proces transferu kończy się po 5 minucie pomiaru (Rycina 42C).



### Rycina 42 Analiza wpływu systemu białek opiekuńczych HscA/HscB na transfer centrum z holo-IscU do apo-GrxD.

A Widmo dichroizmu kołowego CD potwierdzające efektywną rekonstrukcję centrum Fe-S w obrębie białka IscU przed dodaniem białka apo-GrxD i systemu białek HscA/HscB (zielona linia). Widmo zostało zarejestrowane po minucie od zainicjowania reakcji rekonstrukcji centrum Fe-S, reakcja inicjowana była poprzez nastrzyk L-cysteiny. Widmo CD mieszaniny reakcyjnej uzyskane po 6 minutach od dodania do reakcji białek apo-GrxD oraz HscA/HscB (czerwona linia). Na widmie zazaczyłam długość fali 556 nm, przy której w kolejnych eksperymentach, przedstawionych na wykresie C wykonywałam pomiar szybkości transferu centrum Fe-S z IscU do GrxD

B Widmo dichroizmu kołowego CD potwierdzające efektywną rekonstrukcję centrum Fe-S w obrębie białka IscU przed dodaniem białka apo-GrxD (zielona linia). Widmo zostało zarejestrowane po minucie od zainicjowania reakcji rekonstrukcji centrum Fe-S poprzez nastrzyk L-cysteiny. Widmo CD mieszaniny reakcyjnej uzyskane po 6 minutach od dodania do reakcji białka apo-GrxD (czarna linia.)

C Wykres kinetyki transferu centrum FeS z holo IscU do apo GrxD zmierzony na podstawie zmiany sygnału dichroizmu kołowego przy długości fali 556 nm w obecności białek opiekuńczych (czerwone kółka) lub przy ich braku (białe kółka). Doświadczenia zostały przeprowadzone w buforze RI (50 mM Tris pH 8.0; 150 mM KCl ;10 mM MgCl<sub>2</sub>), w którym dodatkowo były obecne 1 mM ATP, 25 μM L-cysteina, 100 μM NADPH, 50 μM Fe<sup>2+</sup>. Stężenia białek w reakcji: 50μM IscU, 5 μM IscS, 5 μM Fdx/FdxR, 100 μM, apoGrxD, 4/4 μM HscA/HscB

W podsumowaniu w oparciu o uzyskane wyniki, mogę stwierdzić, że wykorzystując komplet oczyszczonych białek systemu ISC odtworzyłam w próbówce proces rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie bakteryjnego białka IscU oraz proces jego transferu do białka apo GrxD w obecności białek opiekuńczych, które okazały się być krytyczne podczas tej reakcji. Kluczem do sukcesu okazała się być strategia, w której proces rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie IscU przeprowadziłam wykorzystując fizjologiczne źródło elektronów – NADPH oraz oczyszczony system białek łańcucha przenoszenia elektronów Fdx / FdxR. Po drugie istotnym

czynnikiem wydaje się również być odpowiednia kontrola reakcji *in vitro* polegająca na monitorowaniu kolejnych reakcji, które mają miejsce w sekwencji biogenezy centrów Fe-S.

Nasze wcześniejsze badania pozwoliły na identyfikację szeregu oddziaływań białko-białko pomiędzy składnikami kompleksów, które mają kluczowe znaczenie podczas biogenezy centrów Fe-S. Opracowany przeze mnie system do badań *in vitro* procesu rekonstrukcji centrów Fe-S i ich transferu w przyszłości może zostać wykorzystany do zbadania efektów zaburzenia poszczególnych interakcji pomiędzy białkami systemu ISC na proces biogenezy centrów Fe-S w próbówce. Ponadto pomimo szczegółowej analizy *in vitro* znaczenia oddziaływań pomiędzy białkami systemu ISC bakterii *Escherichia coli*, niewiele wiadomo na temat znaczenia tych oddziaływań dla biogenezy białek zawierających centra Fe-S *in vivo*. Moim zdaniem niezmiernie interesującym byłoby zaplanowanie projektu badawczego, którego celem byłoby opracowanie modelu badawczego, który pozwoli na badanie fizjologicznych konsekwencji zaburzeń poszczególnych oddziaływań pomiędzy białkami biorącymi udział w biogenezie centrów Fe-S *in vivo*. W celu weryfikacji uzyskanych wyników z doświadczeń *in vitro*, bardzo intrygująca byłaby próba przygotowania szczepu *E. coli*, pozwalającego na ekspresję genów kodujących warianty białek defektywnych w poszczególnych oddziaływaniach białko-białko, co z kolei pozwoliłoby badać rolę tych interakcji podczas syntezy białek zawierających centra Fe-S w komórce. Wyznacznikiem tak zaplanowanego projektu mogłoby być innowacyjne połączenie szczegółowych badań biochemicznych z analizami *in vivo*. Myślę że takie podejście umożliwiłoby lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tego ważnego procesu metabolicznego. Ponadto, ponieważ zaburzenia biogenezy Fe-S u człowieka, na przykład na skutek mutacji białek w nim uczestniczących, są przyczyną wielu chorób często kończących się śmiercią, otrzymane wyniki mogą pomóc w zrozumieniu molekularnego podłoża tych schorzeń, a w dłuższej perspektywie przyczynić się do opracowania skutecznej terapii. Z drugiej strony ze względu na fakt, iż centra Fe-S pełnią kluczową rolę w metabolizmie bakterii oraz, że sekwencja białek biorących udział w biogenezie Fe-S różni się od ich wariantów eukariotycznych, czyni je również potencjalnym celem dla leków przeciwdrobnoustrojowych.

## 5 Dyskusja

### **Ewolucja systemów Hsp70 funkcjonujących w biogenezie centrów żelazo – siarkowych**

Uzyskane wyniki przeprowadzonych analiz w ramach projektu doktorskiego rzucają nowe światło na kilka kwestii dotyczących ewolucyjnego związku między białkami Hsp70 zaangażowanymi w mitochondrialną i bakteryjną biogenezę centrów żelazo-siarkowych. Jednoznacznie wskazują, że bakteryjne białko HscA zostało utracone podczas ewolucji mitochondriów, a jego rolę w biogenezie FeS przejął mitochondrialny Hsp70, który wziął swój początek od wielofunkcyjnego białka bakteryjnego DnaK. Dodatkowo wyniki rekonstrukcji filogenetycznej potwierdzają pogląd, w którym to wyspecjalizowane białko Ssq1 powstało po duplikacji genu mtHsp70, która miała miejsce u podstawy linii *Saccharomyces cerevisiae*. Taką ewolucyjną historię przedstawiono już wcześniej w literaturze (181) (184) (213), jednak do analiz wykorzystano wtedy dostępne dane, których zakres w powyższych badaniach został powiększony. Ówczesne analizy wykonane zostały dla ograniczonego na ten czas zbioru danych, które w obecnych analizach zostały powiększone o najświeższe sekwencje.

Bazując na kompletnych wynikach analiz filogenetycznych bez wątplenia mogę stwierdzić, że mitochondrialne Ssq1 i bakteryjne HscA są daleko spokrewnione, a zatem stanowią przykład funkcjonalnej konwergencji. Na tym etapie pojawia się jednak pytanie istotne z perspektywy ewolucyjnej - na ile podobne lub różne są te dwa białka Hsp70 w aspekcie biochemicznym (214) (215) (216).

Głównym odkryciem naszych analiz porównawczych białek opiekuńczych Ssq1 i HscA jest uderzające podobieństwo właściwości biochemicznych tych dwóch systemów. Aktywności ATPazy tych dwóch białek Hsp70 są stymulowane do porównywalnych poziomów przez ich białka pomocnicze – białka typu J (Hsc20/HscB) i substraty białkowe (Isu1/IscU), niezależnie od tego, czy są obecne w niskich, bardziej fizjologicznych, czy wysokich stężeniach. Chociaż aktywność ATPazy białka Ssq1 jest stymulowana nieco słabiej niż HscA wydajność systemu Ssq1 mierzona jako stosunek  $kcatal/Km$  jest wyższa niż dla systemu HscA, co sugeruje, że przy niskich stężeniach białek J i substratów wyspecjalizowany system mitochondrialny jest bardziej wydajny niż jego bakteryjny odpowiednik. To zatem sugeruje, że niższe szybkości maksymalnej stymulacji aktywności ATPazy dla systemu Ssq1 mogą być kompensowane przez jego wyższe powinowactwo zarówno do białka Hsc20 jak i Isu1, zgodnie z faktem, że ~10% normalnego poziomu Hsc20 jest wystarczające dla normalnego wzrostu drożdży (217).

Bezwzględne stężenia komórkowe białek tworzących systemy Ssq1 i HscA nie są znane, względne wartości, które są dostępne w literaturze sugerują, że Ssq1 i Hsc20 są obecne w komórce w zbliżonych ilościach, w zakresie stężeń mikromolowych, tak samo jak HscA i HscB w komórce bakteryjnej. W związku z tym podobne obserwowane w moich badaniach właściwości biochemiczne tych dwóch wyspecjalizowanych układów są najprawdopodobniej istotne fizjologicznie.

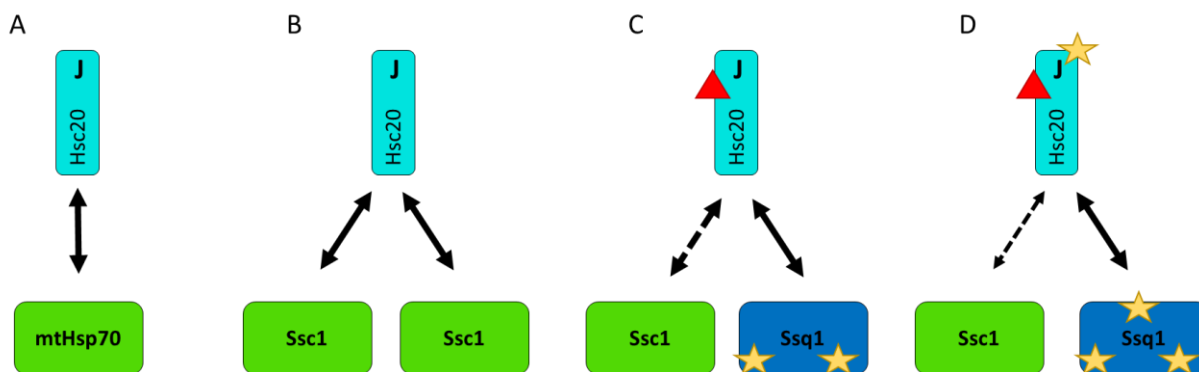
Kolejnym pytaniem jakie nasuwa się dotyczy właściwości biochemicznych wielofunkcyjnego mtHsp70, które u większości organizmów eukariotycznych, także u ludzi, jest zaangażowane w biogenezę centrów Fe-S. Jakie są ewentualne korzyści, które wynikają z obecności wyspecjalizowanego systemu białek opiekuńczych systemu Hsp70? Pierwsza różnica dotyczy ilości mtHsp70, które występuje w komórkach. Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem komórek drożdżowych *S.cerevisiae* jednoznacznie wskazują, że stężenie białka Ssc1 jest około 1000 razy większe niż białka Ssq1, i stanowi około 2% wszystkich białek mitochondrialnych [24]. Ponadto ludzkie białko Hsp70 HSPA9 jest także mitochondrialnym białkiem występującym w stosunkowo dużej ilości. Kolejne badania przeprowadzone w oparciu o oczyszczone białka systemu Hsp70 drożdży *Schizosaccharomyces pombe*, które nie mają wyspecjalizowanego Hsp70, pokazują, że białko współpracujące z domeną J - Hsc20 ma

~100-krotnie niższe powinowactwo do mtHsp70 niż Hsc20 *S. cerevisiae* do Ssq1 lub HscB *E. coli* do HscA (166).

Ta duża różnica sugeruje, że wyspecjalizowane i wielofunkcyjne systemy Hsp70 wykorzystują bardzo różne strategie biochemiczne. W przypadku wyspecjalizowanych systemów Hsp70 wysokie powinowactwo do białek Hsc20 umożliwia im działanie przy niskich stężeniach. Natomiast w przypadku wielofunkcyjnych Hsp70 ich niskie powinowactwo do Hsc20 jest najprawdopodobniej kompensowane przez ich bardzo dużą ilość w komórce. Dlaczego większość mtHsp70 nie ewoluowała, osiągając wyższego powinowactwa do Hsc20? Najprawdopodobniej ze względu na ich wielofunkcyjność. Białka te pełnią różne funkcje w komórce, między innymi są zaangażowane w transport wewnątrzkomórkowy, fałdowanie białek oraz ich translokację przez błony komórkowe, składanie i rozkładanie kompleksów białkowych jak również pełnią funkcje porządkowe w komórce i korygują strukturę nieprawidłowo sfałdowanych białek (183). Tak więc wielofunkcyjne mtHsp70, realizując różne zadania w komórce, współpracują z różnymi białkami J. Z kolei te w tym przypadku muszą konkurować ze sobą o dostęp podczas oddziaływania do tego samego mtHsp70 (218). Ta konkurencja między białkami J zapobiega rozwijaniu przez którekolwiek z nich wyższego powinowactwa do mtHsp70, ponieważ zagrażałoby to innym funkcjom mitochondrialnym, które są realizowane przez to białko. Niezmiernie interesujące byłyby dalsze badania, które ewentualnie pozwoliłyby zweryfikować tę hipotezę.

Zmiany w obrębie sekwencji białek Ssq1 oraz Hsc20 miały prawdopodobnie kluczowy wpływ na ich wzajemną współpracę. Doniesienia literaturowe sugerują, że czynnikiem, który mógł zainicjować zmiany sekwencji, była znacząca delecja w domenie J białka Hsc20, która z kolei mogła umożliwić selektywną interakcję z Ssq1 (181). Około 300 milionów lat temu wszystkie genomy grzybów zawierały jeden gen kodujący mtHsp70, Ssc1, które współpracowało z kilkoma białkami J, w tym Hsc20 (Rycina 43A). Duplikacja genu kodującego mtHsp70 (Rycina 43B) doprowadziła do powstania dwóch genów *SSC1* oraz *SSQ1*, to z kolei prawdopodobnie stworzyło możliwość podziału funkcji między białkami Ssc1 i Ssq1. Bezpośrednio po duplikacji genu kodującego mtHsp70, w obrębie genów *SSQ1* i *HSC20* mogły pojawić się mutacje, które zmieniły właściwości biochemiczne kodowanych przez nie białek, ale nie wpłynęły znacząco na zdolność Hsc20 do interakcji z Ssc1 lub Ssq1. Dopiero po delecji w obrębie *HSC20* (Rycina 43C), która doprowadziła do zmniejszenia rozmiaru domeny J, doszło do osłabienia interakcji z Ssc1, ale nie zmieniała się efektywność interakcji z Ssq1. Ten proces prawdopodobnie zainicjował ewolucję specyficznego partnerstwa Hsc20-Ssq1. Opisany przypadek delecji mógł promować w ten sposób dalszą koewolucję Hsc20 i Ssq1. Z czasem kolejne zmiany sekwencji poza regionem pętli Hsc20 doprowadziły do wysoce specyficznej i wydajnej interakcji pomiędzy Ssq1 i Hsc20. Opisany proces koewolucji białek Ssq1 i Hsc20 doprowadził do powstania kompleksu białek opiekuńczych, który jest przystosowany do funkcjonowania wyłącznie w biogenezie centrów Fe-S (Rycina 43D) (181).





### Rycina 43 Koewolucja Hsc20 i Ssq1

Strzałki wskazują funkcjonalne interakcje białko-białko, przy czym grube linie ciągłe oznaczają interakcje o największej sile, a linie przerywane - najslabsze. Gwiazdki reprezentują substytucje reszt aminokwasowych, które wpłynęły na właściwości biochemiczne oddziałujących białek. Trójkąt wskazuje na delecję w domenie J Hsc20. (A) Przed duplikacją genu *HSC20* białko Hsc20 współpracowało z wielofunkcyjnym mtHsp70. (B) Duplikacja genu kodującego mtHsp70, w wyniku której powstały dwa geny kodujące *Ssc1*, które początkowo funkcjonowały równie dobrze z Hsc20. (C). Delecja w genie *HSC20* doprowadziła do zmniejszenia rozmiaru domeny J, co z kolei osłabiło oddziaływanie z *Ssc1*. (D) Z czasem zmiany sekwencji w obrębie genów *HSC20* i *SSQ1* spowodowały powstania układu białek opiekuńczych wysoce wydajnie współpracującego podczas biosyntezy centrów Fe-S. Zmiana koloru Hsp70 z zielonego (B) na niebieski (C,D) wskazuje na ogólne zmiany reszt aminokwasowych, które nastąpiły po duplikacji w obrębie jednego z nowo powstałych genów *SSC1*, a które to doprowadziły do powstania genu kodującego białko Ssq1 (181).

Wreszcie, przedstawione wyniki mają ważne implikacje praktyczne. Oba wyspecjalizowane systemy białek opiekuńczych, które są dedykowane do funkcjonowanie w procesie biogenezy centrów Fe-S, są wygodnymi modelami badawczymi, ponieważ pozwalają na przeprowadzenie analiz funkcjonalno-strukturalnych białek systemu Hsp70. Powodem jest to, że zarówno bakteryjne białko HscA jak i mitochondrialne białko Ssq1 oddziałuje wyłącznie z jednym białkiem z domeną J i jego jedynym substratem, jest białko pełniące funkcję molekularnego rusztowania podczas biogenezy centrów Fe-S

System drożdżowy *S.cerevisiae* jest wygodnym modelem do badań *in vivo*, ponieważ posiada on tylko jedną maszynię białkową, maszynię ISC, która jest zaangażowana w proces biogenezy centrów Fe-S, w związku tym łatwo jest badać efekty *in vivo* mutacji zaburzających określony etap tego procesu. W przypadku bakterii *E.coli* oprócz systemu ISC jest jeszcze system SUF, który może kompensować defekty w obrębie ISC, niemniej system bakteryjny stanowi świetne narzędzie do badań biochemicznych, ponieważ opracowane procedury oczyszczania pozwalają stosunkowo szybko i łatwo uzyskać duże ilości wysoko skoncentrowanych białek do odpowiednich analiz *in vitro*.

Przedstawione w pracy wyniki badań biochemicznych dotyczące właśnie tych dwóch systemów białek Hsp70 pokazują, że są one biochemicznie bardzo podobne do siebie, pomimo że białka HscA i Ssq1 nie są ze sobą spokrewnione. Mam nadzieję, że uzyskane wyniki w przyszłości pomogą w lepszym zrozumieniu funkcji obu systemów, bakteryjnego i mitochondrialnego w tak ważnym procesie jakim jest biogeneza centrów żelazo-siarkowych.

## **Analiza syntezy centrum Fe-S w obrębie białek ISCU pełniących funkcję molekularnego rusztowania**

Ostatnie doniesienia literaturowe dotyczące szlaku biogenezy centrów Fe-S rzuciły nowe światło na proces ich tworzenia i sugerują nowe hipotezy dotyczące mechanizmu tworzenia centrów [2Fe2S] przez maszynię ISC. Analizy przeprowadzone w oparciu o mysi system badawczy pozwoliły na odkrycie dwóch kluczowych etapów procesu biosyntezy centrów FeS: przenoszenie nadsiaczku z NFS1 do ISCU i jego redukcję przez ferrodoksynę FDX2. Pokazano, że oba procesy są zależne od metalu. Ponadto wyniki tych analiz wskazują, że na pierwszym etapie to żelazo jest przyłączane do białka ISCU pełniącego funkcję molekularnego rusztowania.

Podstawowym białkiem biogenezy centrów Fe-S jest białko IscU/ISCU, które jest niewielkim, wysoce konserwatywnym białkiem o masie 15 kDa. Białko to zostało zidentyfikowane jako białko pełniące funkcję molekularnego rusztowania na podstawie jego zdolności do wiązania centrum [2Fe2S] *in vivo*, gdy gen ulega wspólnej ekspresji ze wszystkimi innymi składnikami ISC oraz *in vitro* w eksperymentach rekonstrukcji centrów Fe-S w obecności desulfurazy cysteinowej IscS/NFS1 (219). Badania spektroskopowe i strukturalne bakteryjnych, archetypowych i eukariotycznych białek IscU/ISCU dostarczyły dowodów, że centrum [2Fe2S] jest wiązane w układzie asymetrycznym przez dobrze zachowane reszty aminokwasowe: trzy cysteiny i ligand niecysteinowy, najprawdopodobniej asparaginian (90) (200). Zaproponowano więc, że to miejsce montażu centrum jest punktem wejścia dla żelaza.

Analiza struktur białek należących do rodziny IscU/ISCU wykazały, że białka IscU/ISCU oczyszczone z komórek bakteryjnych nie zawierają żelaza w miejscu montażu, lecz jon cynku (90). Ponadto pokazano, że jon cynku jest skoordynowany w ogólnej geometrii tetraedrycznej z dobrze zachowanymi resztami aminokwasowymi miejsca wbudowania jonu w obrębie białek IscU *Haemophilus influenza* (220) i *Mus musculus* (kod PDB 1WFZ). W tych białkach jon  $Zn^{2+}$  jest skoordynowany przez dwie cysteiny Cys35 i Cys61, które są również ligandami centrum [2Fe2S], oraz histydynę His103, natomiast czwarty ligand wydaje się być wymienny.

Plastyczność białka IscU/ISCU występuje również na poziomie jego trójwymiarowej struktury i jest bezpośrednio związana z miejscem wiązania metali. Badania NMR wykazały, że IscU/ISCU istnieje w dwóch formach - ustrukturyzowanej i nieustrukturyzowanej (221). Co ciekawe, koordynacja jonu metalu stabilizuje formę ustrukturyzowaną. Ligandy jonu cynku znajdują się w obrębie różnych części białka: cysteina Cys35 i asparaginian Asp37 znajdują się pomiędzy dwoma  $\beta$ -karkami, cysteina Cys61 znajduje się na końcu  $\alpha$ -helisy, natomiast histydyna His103 wraz z cysteiną Cys104 są na końcu innej  $\alpha$ -helisy w obrębie białka IscU/ISCU. Zatem koordynacja jonów cynku łączy różne części białka, co z kolei stabilizuje trójwymiarową strukturę białka.

Pierwsze doniesienia literaturowe, w których zamieszczone wyniki sugerują, że żelazo wiąże się w miejscu formowania centrum FeS, zawierają obszerne analizy NMR białka IscU z *E. coli*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że inkubacja apo-IscU z żelazem stabilizuje uporządkowaną formę, tak jak to obserwowano w przypadku cynku (222). Z kolei w ramach współpracy z Dr Benoit D'Autreaux wykonaliśmy szereg eksperymentów, które pozwoliły stwierdzić, że jon cynku utrudnia wiązanie żelaza w miejscu biosyntezy centrum FeS, ale po usunięciu jonu cynku monomeryczna forma ISCU wiąże  $Fe^{2+}$  w miejscu insercji centrum FeS. Doświadczenia przeprowadzone z wariantami białka ISCU z wprowadzonymi mutacjami punktowymi pozwoliły jednoznacznie potwierdzić, że Cys35, Asp37, Cys61 i His103 są resztami aminokwasowymi, które pełnią rolę ligandów dla wiązanego żelaza (90). Jon  $Fe^{2+}$  przyjmuje zatem podobne ułożenie jak jon  $Zn^{2+}$  w obrębie białka ISCU. Analiza

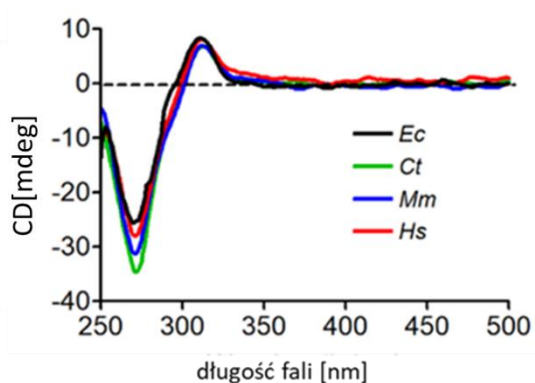
przeprowadzona w oparciu pomiaru dichroizmu kołowego (CD) wykazała, że ISCU wiąże pojedynczy jon  $\text{Fe}^{2+}$ , a spektroskopia Mössbauera wykazała, że jest to wysokospinowe centrum Fe(II) i potwierdziła obecność kilku cystein w sferze koordynacyjnej metalu. Badania nad tworzeniem centrów Fe-S z wykorzystaniem kompletnej mysiej maszynynerii ISC obejmującej kompleks NFS1-ISD11-ACP, FDX2 i FDXR wykazały, że ISCU ze związanym żelazem (Fe-ISCU) jest aktywną formą białka podczas biosyntezy centrów Fe-S, podczas gdy forma ze związanym cynkiem (Zn-ISCU) nie jest. Ten wynik sugeruje, że prawdopodobnie wiązanie żelaza w miejscu montażu centrum Fe-S jest początkowym etapem biosyntezy centrów Fe-S (90). Wiązanie żelaza w miejscu montażu centrum Fe-S odnotowaliśmy także w przypadku uzyskanego przeze mnie preparatu białka IscU z *E. coli*, co sugeruje, że pierwszy krok w mechanizmie biosyntezy centrów jest konserwowany (223).

Wbudowanie żelaza umożliwia na kolejnym etapie przeniesienie nadsiarczka z desulfurazy cysteinowej do IscU/ISCU. Następnie ma miejsce redukcja przyłączonego do molekularnego rusztowania nadsiarczka, proces ten jest skoordynowany z obecnością żelaza. Prawdopodobnie etapy zależne od obecności metalu umożliwiają przyporządkowanie odpowiedniej ilości siarki do centrum żelazowego w obrębie IscU/ISCU. Jednak wiele kluczowych pytań pozostaje wciąż bez odpowiedzi. Przede wszystkim pozostaje nieznanym molekularny mechanizm, który ściśle koordynuje przenoszenie nadsiarczku i jego redukcję z obecnością żelaza w obrębie IscU/ISCU. Kolejną interesującą kwestią dotyczy mechanizmu, który prowadzi do utworzenia centrum  $[\text{2Fe2S}]$  w obrębie IscU/ISCU.

Wyniki uzyskane w ramach badań dotyczących funkcjonowania podstawowych etapów tworzenia centrów Fe-S w komórkach eukariotycznych pozwoliły także nieco bardziej zrozumieć funkcjonalną rolę frataksyny w tym procesie. Obecnie opublikowane zostały przekonujące wyniki doświadczeń wskazujące na rolę frataksyny jako kinetycznego modulatora. Jednak rola bakteryjnej frataksyny CyaY wciąż stanowi zagadkę. Zaangażowanie białka CyaY w biogenezę centrów Fe-S zostało zaproponowane na początku XXI wieku na podstawie badań, które doprowadziły do zidentyfikowania genu kodującego białko CyaY w bliskiej lokalizacji do genów *hscBA* (224). Z drugiej strony gen, który ma kodować białko istotne w procesie biogenezy centrów Fe-S, nie jest częścią operonu *isc* u bakterii, co może być zaskakujące w przypadku białka, które ma pełnić kluczową rolę w biogenezie centrów Fe-S. W związku z tym, wykorzystując większą liczbę genomów dostępnych obecnie do analizy, ponownie zbadano lokalizację CyaY i jego współwystępowanie z systemami ISC. Analiza filogenetyczna wykazała, że gen kodujący białko CyaY pochodzi od ostatniego wspólnego przodka Proteobacteria. (225) Jeszcze bardziej zaskakujący był wynik, który wskazywał że wiele genomów zawierało gen *iscU*, ale nie *cyaY*, co sugeruje, że bakterie te nauczyły się syntezować centra Fe-S w sposób zależny od maszynynerii ISC i niezależny od białka CyaY. W związku z tym przedstawione wyniki sugerują, że odpowiedniki frataksyny, funkcjonujące jako czynniki zaangażowane w biogenezę centrów Fe-S w ramach działania systemu ISC, można zidentyfikować u większości eukariontów i jedynie u ograniczonej liczby prokariotów (225).

Białka ISCU w formie monomeru wiążą żelazo w miejscu bogatym w cysteinę. W ramach współpracy z Dr Benoit D'Autreaux na wstępie zbadaliśmy zdolność wiązania żelaza przez serię białek ISCU pochodzących z organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Do dyspozycji mieliśmy białka *E. coli* (Ec), *C. thermophilum* (Ct), *M. musculus* (Mm) i *H. sapiens* (Hs). Jak już wcześniej opisano w literaturze, bakteryjne białka IscU często oczyszczają się ze związanym cynkiem, dlatego do eksperymentów, których celem była analiza wiązania żelaza, na wstępie przeprowadziliśmy procedurę usunięcia cynku z preparatów białkowych zgodnie z metodą opisaną w rozdziale Metody 7.11.1. (226)

Na kolejnym etapie, aby ocenić zdolność oczyszczonych białek ISCU do przyłączania żelaza wykorzystaliśmy spektrometr dichroizmu kołowy. Po związaniu żelaza do molekularnego rusztowania w obrębie rejestrowanych widm w zakresie 250-350 nm spodziewaliśmy się charakterystycznych szczytów wskazujących na przejście ładunku Cys→Fe II (ligand to metal charged transfer LMCT; przeniesienie ładunku z liganda na metal). Białka ISCU posiadają 3 konserwowane reszty cysteinowe (u myszy są to odpowiednio Cys35, Cys61 i Cys104), które znajdują się w miejscu przyłączania żelaza. Organizmy *Chaetomium thermophilum*, *Mus musculus* i *Homo sapiens* posiadają dodatkowo nie konserwowaną cysteinę (Cys96). Wszystkie monomeryczne białka IscU w formie apo były inkubowane z żelazem i w obrębie uzyskanych widm dichroizmu kołowego (CD) zidentyfikowaliśmy charakterystyczne szczyty świadczące o przyłączeniu żelaza do analizowanych białek (Rycina 44) (226).

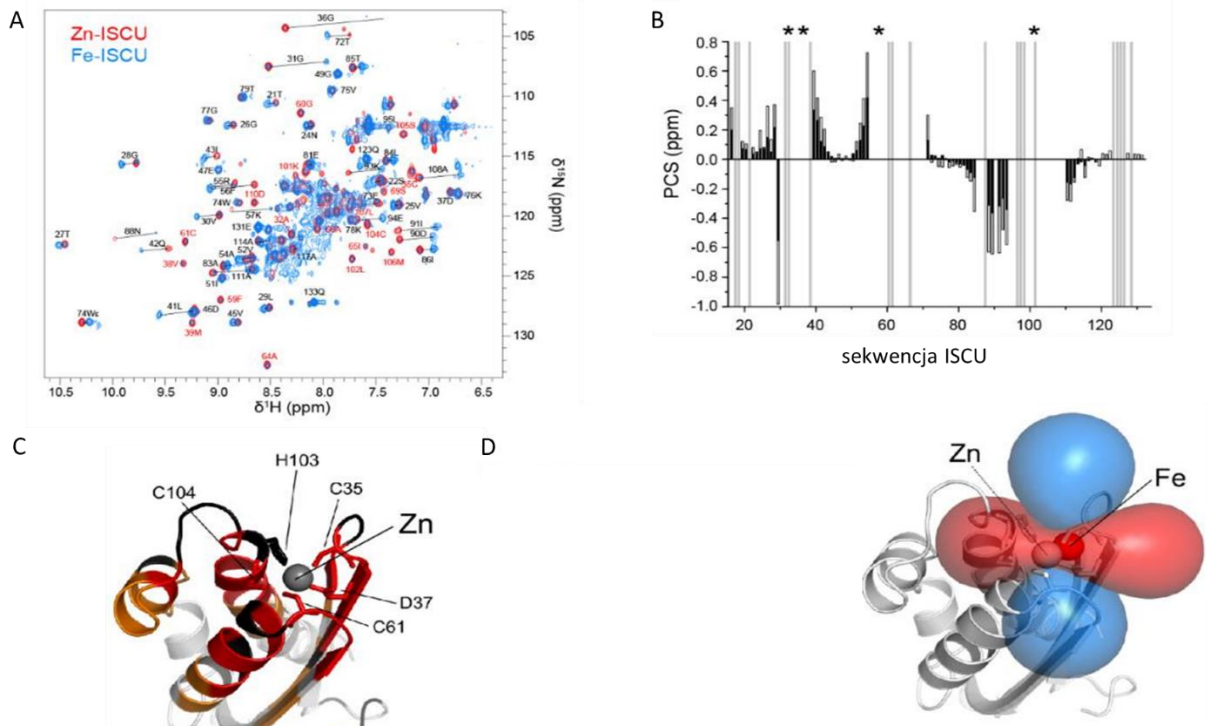


#### **Rycina 44 Monomeryczne białka ISCU wiążą żelazo w miejscu bogatym w cysteinę**

Widma dichroizmu kołowego (CD) zarejestrowane w zakresie 250-500 nm monomerycznych białek ISCU z organizmów *Escherichia coli*, *Chaetomium thermophilum*, *Mus musculus* i *Homo sapiens*. Stężenie białek w reakcji wynosiło 100  $\mu$ M apo IscU. Białka były inkubowane ze źródłem żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$ , siarczan amonu żelaza (II), sól Mohra) w stężeniu 100  $\mu$ M. Pomiary przeprowadzono w buforze 0,1M Tris-HCl pH 8.0. (226)

Celem kolejnego etapu badań była identyfikacja rejonu w obrębie białek, który jest zaangażowany w przyłączanie żelaza. Do analiz NMR wykorzystaliśmy białko *Mm* Fe-ISCOU. Aby zlokalizować miejsce wiążące żelazo w strukturze ISCU szukaliśmy w obrębie widma 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ISCU zmian wywołanych obecnością żelaza  $\text{Fe}^{2+}$  (Rycina 45 A) (226). Stan paramagnetyczny centrum  $\text{Fe}^{2+}$  powoduje poszerzenie sygnału w pobliżu centrum paramagnetycznego, ze względu na wzmocnienie relaksacji paramagnetycznej (PRE). W przypadku bardziej odległych atomów PRE maleje i można obserwować sygnały, które wykazują na perturbacje przesunięcia chemicznego odpowiadające przesunięciom pseudo-kontaktowym (PCS) wrażliwym na odległość w stosunku do centrum paramagnetycznego. W ten sposób uzyskaliśmy widmo  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Zn-ISCOU (Rycina 45 A, czerwone kontury). Następnie przystąpiliśmy do analizy białka ISCU inkubowanego w stosunku molowym 1:1 z żelazem  $\text{Fe}^{2+}$  (Rycina 45 A, niebieskie kontury). ISCU jest białkiem metamorficznym które istnieje w roztworze w dwóch równoważnych stanach, ustrukturyzowanym (S) i nieuporządkowanym (D). Wiązanie żelaza ewidentnie stabilizowało stan S. (Rycina 45A). Niemniej dalsza analiza wykazała, że około ~20% ISCU było nadal w stanie D oraz że kilka sygnałów z widma NMR zniknęło z powodu PRE (relaksacji paramagnetycznej), które z kolei przypisaliśmy resztom wiążącym jon żelaza lub resztom aminokwasowym znajdującym się bardzo blisko miejsca jego przyłączenia. To pozwoliło na identyfikację reszt aminokwasowych w obrębie ISCU, które obejmowały ściśle konserwowane reszty wiążące cynk w miejscu wiązania centrum Fe-S oraz reszty obok nich (Ala32-Val38, Thr58-Ala71, Lys101-Asp110) (Rycina 45B). Pozostałe słabe sygnały były przesunięte względem sygnałów obserwowanych

w przypadku Zn-ISCU ze względu na przesunięcia pseudo-kontaktowe (PCS). Reszty wykazujące przesunięcie pseudo-kontaktowe (PCS) i osłabioną relaksację paramagnetyczną (PRE) znajdowały się w pobliżu ligandów cynkowych, i równocześnie były bardziej oddalone od centrum paramagnetycznego. Wiązanie  $Fe^{2+}$  wyznaczone zostało poprzez naniesienie PRE i PCS na strukturę *Mm* Zn-ISCU (Rycina 45C). Wyniki te wskazują, że  $Fe^{2+}$  wiąże się z ISCU poprzez zajęcie miejsca wiążącego Zn w strukturze Zn-ISCU.



**Rycina 45 Identyfikacja miejsca wiązania  $Fe^{2+}$  w obrębie *Mm* Fe-ISCU w oparciu o wyniki doświadczeń paramagnetycznego NMR**

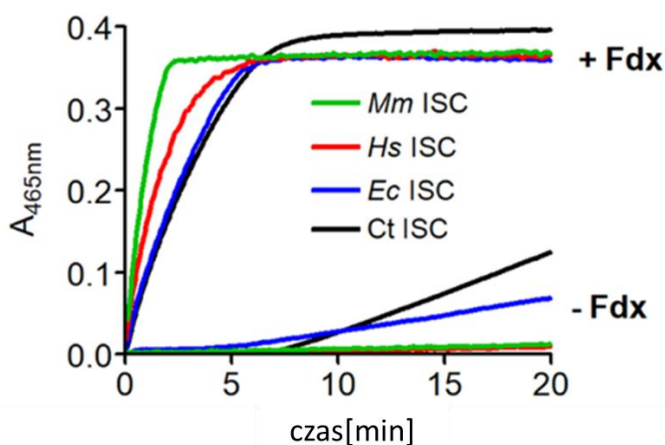
**A** Nałożone widma 1H-15N HSQC Zn-ISCU (czerwone kontury) i apo-ISCU inkubowanego z żelazem w stosunku molowym 1:1 (niebieskie kontury). Sygnały Zn-ISCU, dla których Fe-ISCU jest poszerzony w wyniku relaksacji paramagnetycznej PRE są oznaczone na czerwono. Z kolei godne uwagi reszty wykazujące przesunięcie pseudo-kontaktowe (PCS) są wskazane przez linie ukośne łączące sygnały Zn-ISCU i Fe-ISCU.

**B** Reszty wykazujące przesunięcie pseudo-kontaktowe (PCS) są przedstawione jako słupkowe wykresy dla sygnałów obserwowanych w obrębie Fe-ISCU w porównaniu do formy Zn-ISCU w obu wymiarach 1H (czarny) i 15N (biały). Szare strefy odpowiadają resztom nieprzypisanym lub prolinie. Pozycja reszt zaangażowanych w koordynację Zn (czarne gwiazdki) została zaznaczona na górze.

**C** Reszty wykazujące przesunięcie pseudo-kontaktowe (PCS) i/lub reszty wykazujące wzmocnienie relaksacji paramagnetycznej (PRE) wywołane obecnością  $Fe^{2+}$  zostały przedstawione na strukturze *Mm* Zn-ISCU (kod PDB 1WFZ). Reszty charakteryzujące się silną relaksacją paramagnetyczną PRE (całkowite poszerzenie sygnału) lub wartościami 1H i 15N PCS  $< -0.1$  ppm lub  $> 0.2$  ppm są oznaczone odpowiednio kolorem czerwonym i pomarańczowym. Z kolei reszty, które nie mogły być przypisane w przypadku białka Zn-ISCU są pokolorowane na czarno. Zn jest reprezentowany w strukturze jako szara kula, a pięć reszt aminokwasowych miejsca wiązania metalu (Cys35, Asp37, Cys61, His103 i Cys104) pokazano w postaci pałeczek.

**D** Miejsce wiązania jonów metali w obrębie białka ISCU. Centrum Fe jest reprezentowane przez czerwoną kulę obok pozycji Zn (bładczerwona kula) (226)

Nasze analizy pozwoliły wykazać, że oczyszczone białka IscU/ISCU są zdolne do wiązania żelaza (rycina 44). W związku z tym na kolejnym etapie badań sprawdziliśmy, czy tak przygotowane molekularne rusztowanie ze związanym żelazem jest przygotowane do kolejnego etapu procesu jakim jest złożenie centrum Fe-S. W obecności kompletnej maszynerii ISC, wszystkie analizowane białka Fe-ISCU były zdolne do wiązania centrów Fe-S (Rycina 46, +Fdx), a sama rekonstrukcja centrum Fe-S zachodziła w porównywalnym tempie. Równocześnie, reakcje kontrolne, w których pominięto układ reduktazy FDX2-FDXR / Fdx-FdxR były we wszystkich analizowanych przypadkach silnie spowolnione (Rycina 46, -Fdx). Uzyskane wyniki wskazują, że *in vitro* rekonstrukcja centrum Fe-S w obrębie białek Fe-ISCU w obecności oczyszczonego kompletnego systemu ISC zachodzi w sposób mający znaczenie fizjologiczne.



**Rycina 46 Porównanie kinetyki rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie prokariotycznych i eukariotycznych białek ISCU**

Synteza centrów Fe-S w obrębie białek ISCU z organizmów *Escherichia coli*, *Chaetomium thermophilum*, *Mus musculus* i *Homo sapiens* została przeprowadzona w buforze Tris pH 8.0. Mieszanki reakcyjne zawierały oczyszczone składniki ich maszynerii ISC wraz z ferredoksyną Fdx i jej reduktazą FdxR: +Fdx. W doświadczeniach kontrolnych mieszanki reakcyjne były pozbawione układu Fdx/FdxR: -Fdx. W przypadku rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie Ct ISCU wykorzystano białka mysiej maszynerii ISC.

### Rola białek opiekuńczych w biogenezie centrów Fe-S

Po syntezie centrum FeS w obrębie molekularnego rusztowania ma miejsce jego przeniesienie do określonych białek docelowych. Analizy przeprowadzone w oparciu o drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że ten złożony proces wymaga udziału układu białek opiekuńczych Hsp70-Hsc20, które prawdopodobnie ułatwiają dysocjację [2Fe-2S] z Isu1 i umożliwiają jego przeniesienie do monotiolowej glutaredoksyny Grx5. Na wstępie, Hsc20 wiąże się z Isu1, a następnie przenosi go do Hsp70 (Ssq1) (lub Ssc1), który przyłącza się do konserwowanej sekwencji LPPVK w obrębie białka Isu1. W doniesieniach literaturowych sugeruje się, że wiązanie Hsp70 indukuje uwalnianie centrów Fe-S z Isu1. Przekazanie [2Fe-2S] z Isu1 do Grx5 może być ułatwione przez ich jednoczesne oddziaływanie z białkiem Ssq1. Wykazano, że oba białka Isu1 oraz Grx5 mogą się wiązać równocześnie z mtHsp70 w różnych miejscach białka (80). Z kolei Grx5 wiąże [2Fe-2S] w sposób zależny od glutationu. Podczas realizacji mojego projektu doktorskiego zrekonstruowałam w warunkach *in vitro* proces

transferu centrów Fe-S z IscU do bakteryjnego odpowiednika białka Grx5, do białka GrxD i proces ten był w pełni zależny od obecności systemu białek opiekuńczych HscA/HscB. .

Z kolei wyniki badań *in vivo* uzyskanych w oparciu drożdżowy model badawczy o drożdże *Saccharomyces cerevisiae* pokazały, że *in vivo* inaktywacja któregokolwiek z tych białek opiekuńczych, Ssq1 lub Hsc20, powoduje defekt aktywności mitochondrialnych białek Fe-S i akumulację żelaza w mitochondriach (227) (228). Zmniejszenie poziomów Hsc20 i Ssq1 w komórce skutkuje silnym defektem w dojrzewaniu *de novo* białek Fe-S oraz akumulacją centrów Fe-S w obrębie drożdżowego molekularnego rusztowania białka - Isu1 (229). Najprawdopodobniej, podczas braku białek opiekuńczych, rekonstytucja centrów Fe-S w obrębie Isu1 jest niezaburzona, dlatego też obserwowano akumulację formy holo tego białka.. Ponadto opisane wyniki *in vivo* potwierdzają, że Ssq1 i Hsc20 tworzą funkcjonalną jednostkę w biogenezie białek Fe-S oraz raczej wykluczają udział tego systemu w montowaniu centrów Fe-S w obrębie Isu1 *de novo*. Stąd też pojawiła się hipoteza, która zakłada, że system Ssq1/Hsc20 może pełnić funkcję regulacyjną, ponieważ kontroluje tempo tworzenia centrów Fe-S na Isu1 i jego upośledzenie może skutkować niekontrolowanym przeładowaniem Isu1 grupami Fe-S. Po drugie system białek opiekuńczych jest wymagany do dyslokacji wstępnie zmontowanego centrum Fe-S z Isu1 (180) (154).

Aby odpowiedzieć na pytanie dotyczące kolejności oddziaływań Isu1 z białkami biogenezy Fe/S, została przeprowadzona analiza bioinformatyczna opublikowanego kryształu kompleksu bakteryjnych białek IscS-IscU w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej (230). Otrzymane wyniki tej analizy sugerowały, że rejon hydrofobowy drożdżowego białka Isu1 jest zaangażowany jednocześnie w oddziaływanie z białkiem Hsc20 oraz białkiem Nfs1. Dodatkowo ta analiza wykazała potencjalne aminokwasy w obrębie białka Nfs1 (Pro478, Leu479, Met482), które mogą być zaangażowane w oddziaływanie z Isu1.

Za pomocą techniki typu precypitacja kompleksów białkowych, wykorzystując białko Isu1-GST udało się zidentyfikować oraz określić stechiometrię oddziaływania Isu1:Nfs1. Następnie pokazano, że pojedyncze zmiany reszt aminokwasowych w obrębie białka Isu1 (L63A, V72A oraz F94A) powodują obniżenie powinowactwa do Nfs1, natomiast w przypadku wariantu białka Isu1 LVF/AAA kompleks z desulfurazą cysteinową nie jest tworzony.

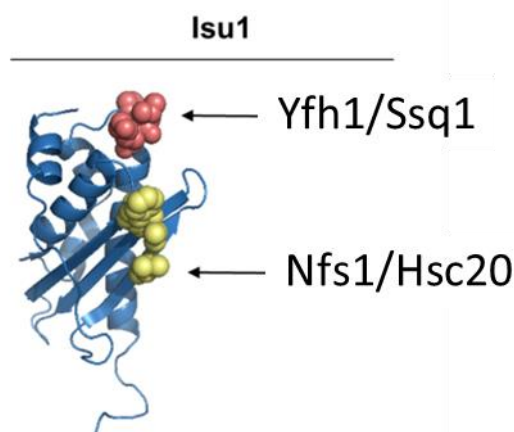
Kolejnym etapem badań było przygotowanie mutantów białka Nfs1 w rejonie Pro478 Leu479 Met482, który został wytypowany jako potencjalnie zaangażowany w oddziaływanie z białkiem Isu1. Ponieważ mutacja proliny często prowadzi do zaburzenia struktury białka na dalszych etapach badań skoncentrowano się na roli leucyny i metioniny podczas formowania kompleksu z Isu1. Analiza *in vivo* wykazała, że mutacja Leu479 i Met482 jest letalna dla komórki drożdżowej. W związku z tym zbadano efekty tych mutacji w obrębie białka Nfs1 na biosyntezę centrów Fe-S. W tym celu zmierzono aktywność akonitazy oraz dehydrogenazy bursztynianowej w wyizolowanych wcześniej mitochondriach ze szczepu GAL-NFS1 transformowanego odpowiednim plazmidem. Analiza ta wykazała dramatyczny spadek aktywności zarówno akonitazy, jak i dehydrogenazy bursztynianowej w przypadku mutantu LM/AA. Tak więc następnie oczyszczono mutanty desulfurazy cysteinowej w regionie LM (L/A, M/A, LM/AA) w celu zbadania w doświadczeniach *in vitro* oddziaływania z białkiem Isu1-GST. Wyniki doświadczeń biochemicznych potwierdziły, że wytypowany region desulfurazy cysteinowej jest istotny przy tworzeniu kompleksu z białkiem Isu1, w przypadku pojedynczych mutantów L/A oraz M/A zaobserwowano istotny spadek ilości Nfs1 w kompleksie z Isu1, z kolei mutacja podwójna (LM/AA) powodowała spadek powinowactwa desulfurazy cysteinowej do białka Isu1 o ponad 75%.

W następnej kolejności sprawdziliśmy, czy wprowadzone mutacje nie zaburzają konformacji i aktywności desulfurazy cysteinowej. W tym celu zmierzaliśmy aktywność enzymatyczną wszystkich mutantów. Zbliżone wartości aktywności enzymatycznej do kontroli

dziękują, sugerują, iż te mutacje nie powodują znaczących zmian w strukturze białka, a obniżone powinowactwo do Isu1 jest wynikiem braku kluczowych reszt aminokwasowych, niezbędnych do tworzenia kompleksu z molekularnym rusztowaniem.

W związku z tym przeprowadzona analiza struktury krystalicznej kompleksu homologów bakteryjnych IscS:IscU (230) (Nfs1 : Isu1), a także analizy biochemiczne oraz *in silico* kompleksu Hsc20:Isu1 jednoznacznie wskazują, że Nfs1 oraz Hsc20 dzielą to samo miejsce oddziaływania na Isu1. W związku z tym, wykorzystując technikę precypitacji kompleksów białkowych zbadano współzawodnictwo Hsc20 i Nfs1 do wiązania się z Isu1.. Uzyskane rezultaty tych eksperymentów ponownie wyraźnie sugerują, że białka Nfs1 i Hsc20 mają to samo miejsce wiązania w obrębie białka Isu1. Tą hipotezę potwierdziły również doświadczenia z mutantami białek Hsc20 oraz Nfs1, które są defektywne w oddziaływaniu z Isu1. Kiedy mieszanina reakcyjna zawierała mutantą Nfs1LM/AA nie wypierał on białka Hsc20 z kompleksu z Isu1 i podobnie mutant Hsc20 LLY/AAA nie wypierał desulfurazy cysteinowej z kompleksu z białkiem Isu1. 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 może kontrolować szybkość transferu centrów Fe/S z Isu1 do docelowego białka.

Co więcej, interakcja Yfh1 z Isu obejmuje motyw sekwencji LPPVK, który jest również miejscem interakcji Isu z białkiem Hsp70- Ssq1(Rycina 47).



**Rycina 47 Model homologiczny białka Isu1 z zaznaczonymi resztami aminokwasowymi oddziałującymi z Yfh1/Ssq1(czerwony) oraz Nfs1/Hsc20 (żółty)**

W połączeniu z wcześniejszą obserwacją, w której wiązanie Nfs1 i Hsc20 do Isu1 wzajemnie się wyklucza ze względu na częściowo nakładające się miejsca wiązania, można zaproponować, że taka wzajemna wyłączność wiązania białek montujących centrum FeS (Nfs1/Yfh1) i białek odpowiedzialnych za transfer centrum (Hsc20/Ssq1) do Isu1 ma konsekwencje w regulacji biogenezy centrów FeS (231). Prawdopodobnie uwolnienie holo-Isu1 z Nfs1(Isd11) przez działanie Hsc20 może prowadzić również do uwolnienia Yfh1, odsłaniając w ten sposób miejsce LPPVK dla interakcji z białkiem Hsp70. Gdy Ssq1 zwiąże motyw LPPVK, Isu1 jest "chronione" przed ponownym wiązaniem Yfh1, nawet jeśli Nfs1(Isd11) ponownie zwiąże się z Isu1 po dysocjacji Hsc20. W ten sposób białka opiekuńcze mogą odgrywać rolę regulacyjną poprzez kontrolowanie przepływu centrów FeS z „kompleksu montażowego” do białek biorców.

Ponieważ biogeneza centrów FeS jest procesem kluczowym dla komórki, zaburzenie któregośkolwiek z jej etapów powoduje śmierć komórki. Częściowe upośledzenie procesu w



komórkach drożdży *S.cerevisiae* powoduje nie tylko aktywację czynników transkrypcyjnych Aft1/2 (232), ale także wzrost poziomu Isu1 (233). Wzrost ten wynika ze zwiększenia stabilności białka Isu1, a regulacja tej stabilności zachodzi na poziomie potranslacyjnym. Wzrost poziomu Isu1 występuje, gdy zmniejsza się funkcjonalność składników, które działają na etapach zarówno montażu jak i transferu centrów FeS w procesie biogenezy. Ponadto wykazano, że ta regulacja jest specyficzna dla Isu1, ponieważ nie zaobserwowano wpływu wprowadzonych defektów na poziomy innych czynników funkcjonujących podczas biogenezy centrów FeS (234). Opublikowane wyniki badań *in vivo* i *in vitro* pokazują, że to proteaza macierzy mitochondrialnej typu Lon, Pim1, jest odpowiedzialna za degradację Isu1. Jej brak, ale nie brak innych proteaz mitochondrialnych, *in vivo* powoduje dramatyczny wzrost poziomu Isu1 [86]. Jednocześnie pokazano, że białko J, Hsc20, jest jednym z dwóch białek, które odgrywają kluczową rolę w ochronie Isu1 przed degradacją przez proteazę Pim1. Drugim białkiem jest Nfs1. Te dwa białka, Hsc20 i Nfs1, których miejsca oddziaływania z Isu1 pokrywają się (Leu63, Val72 i Phe94), są zdolne do ochrony Isu1 przed degradacją zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (235). Wyniki te podkreślają znaczenie interakcji Hsc20-Isu1 zarówno dla napędzania, jak i koordynowania biogenezy centrów FeS.

Wreszcie, interesującym pytaniem pozostającym wciąż bez odpowiedzi jest to, w jaki sposób wiązanie Hsp70 wpływa na strukturę i dynamikę Isu1? Innymi słowy, czy po interakcji z Hsp70 zachodzą jakiegokolwiek zmiany konformacyjne w obrębie białka Isu, które wpływają na jego zdolność do koordynowania centrum FeS? Obecnie dane literaturowe sugerują, że podstawową rolą białek opiekuńczych jest prawdopodobnie ułatwianie uwalniania centrów FeS do białek akceptorowych, ale jaki jest molekularny mechanizm, zgodnie z którym białka opiekuńcze pełnią tę funkcję pozostaje nieznany.

## 6 Materiały

### 6.1 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* ( $\lambda$ *CI*s857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*)  
*Escherichia coli* BL21(DE3)  
*F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (rB - , mB - ) gal dcm* (DE3)  
*Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)  
*ompT hsdS<sub>B</sub> (rB- mB-) gal dcm* (DE3)  
*Escherichia coli* HMS174(DE3)  
*F<sup>-</sup> recA1 hsdR (r<sub>K12</sub> - , m<sub>K12</sub> + ) (DE3)(Rif<sup>R</sup>)*

### 6.2 Plazmidy

Większość wektorów plazmidowych do ekspresji białek eukariotycznych zostało przygotowanych przez dr Brendę Schilke ze współpracującego zespołu prof. Elizabeth Craig z Uniwersytetu Wisconsin-Madison. Wektory plazmidowe do ekspresji białka Ct Isu1, kompleksu drożdżowej desulfurazy (Nfs1-Isd11), drożdżowej ferrodoksyny oraz ludzkiej reduktazy ferrodoksyny zostały udostępnione przez prof. Rolanda Lilla z Uniwersytetu w Marburgu. Natomiast plazmidy do ekspresji białek bakteryjnych zostały udostępnione przez prof. Johna Markleya z Uniwersytetu Wisconsin-Madison z wyjątkiem plazmidów zawierających geny kodujące białka grxD oraz bakteryjną reduktazę ferrodoksyny, które zostały zamówione w firmie Genescript świadczącej usługi komercyjne.

#### 6.2.1 Plazmid kodujący IscU

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka IscU z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pVP67KIscU zawierający kasetę oporności na kanamycynę oraz gen *iscU* kodujący formę białka IscU posiadającą dodatkowo 6 histydyn na końcu 3' (236).

pVP67KIscU

#### 6.2.2 Plazmid kodujący HscB

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka HscB z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pTrcHscB zawierający gen białka *hscB* (237)

pTrcHscB

#### 6.2.3 Plazmid kodujący HscA

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka HscA wykorzystano plazmid pTrcHsc66 zawierający gen białka *hscA* (237)

pTrcHscA

#### 6.2.4 Plazmid kodujący IscS

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka IscS z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pET11aIscS zawierający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen *iscS* kodujący białko IscS (238).

pET11aIscS

#### 6.2.5 Plazmid kodujący CyaY

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka CyaY z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pECyaY-SUMO zawierający kasetę oporności na kanamycynę oraz gen *cyaY* kodujący białko CyaY w fuzji z fragmentem SUMO (239).

pECyaY-SUMO

#### 6.2.6 Plazmid kodujący Fdx

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Fdx z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pDEST24Fdx zawierający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen *fdx* kodujący białko Fdx (239)

pDEST24Fdx

#### 6.2.7 Plazmid kodujący GrxD

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka GrxD z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pET28b zawierający kasetę oporności na kanamycynę oraz gen *grxD* kodujący białko GrxD posiadające dodatkowo 6 histydyn na końcu 3' (240).

pET28b GrxD

#### 6.2.8 Plazmid kodujący Fpr

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Fpr z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pET11a fpr zawierający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen *fpr* kodujący bakteryjne białko Fpr (241).

pET11a-fpr

### 6.2.9 Plazmidy kodujące Sc Isu1

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Isu1-his6 z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pET21d ISU1 zawierający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen *ISU1* kodujący dojrzałą formę białka Isu1 (aminokwasy od 36 do 165) pozbawioną sekwencji kierującej do mitochondrium, ale posiadającą dodatkowo 6 histydyn na końcu 3'.

pET21d Sc Isu1-his  
kodujący białko Isu1 typu dzikiego z dołączonym znacznikiem polihistydynowym

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Isu1-GST z bakterii *E.coli* wykorzystano plazmid pET3a ISU1-GST posiadający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen *ISU1* obejmujący sekwencję kodującą dojrzałą formę białka Isu1 (od tyrozyny 35 do 165) bez pre-sekwencji kierującej do mitochondrium.

pET3a Sc Isu1-GST  
kodujący białko Isu1-GST typu dzikiego.

### 6.2.10 Plazmid kodujący Sc Hsc20

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Hsc20Sc-his typu dzikiego oraz jego wariantów z bakterii *E. coli* wykorzystano plazmid pET21d zawierający sekwencję kodującą białko Hsc20Sc (reszty aminokwasowe od 10 do 184 bez pre-sekwencji kierującej do mitochondriów), sekwencję kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz niosący kasetę oporności na ampicylinę.

pET21d Hsc20Sc WT  
kodujący białko Hsc20-his typu dzikiego

### 6.2.11 Plazmid kodujący Sc Ssq1

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Ssq1-his typu dzikiego oraz jego wariantów z bakterii *E. coli* wykorzystano plazmid pRSFDuet-1 zawierający gen *SSQ1*, gen *HEP1* i kasetę oporności na kanamycynę. Gen *SSQ1* koduje dojrzałą formę białka Ssq1 (od 16 do 657) oraz zawierającą dodatkowo sekwencję kodującą 6 histydyn na końcu 3'. Gen *HEP1* koduje białko Hep1.

pRSFDuet1-SSQ1His/HEP1  
kodujący białko Ssq1-his typu dzikiego

### 6.2.12 Plazmid kodujący Sc Nfs1(Isd11)

Do nadprodukcji i oczyszczania białka Nfs1-his6 wykorzystano plazmid pETDuet-1 NFS1(ISD11) zawierający gen *NFS1* w obrębie MCS1 oraz gen *ISD11* w obrębie MCS2 i kasy oporności na ampicylinę i chloramfenikol. Gen NFS1 koduje dojrzałą formę białka Nfs1 (od tyrozyny 34 do histydyny 497) pozbawioną pre-sekwencji kierującej do mitochondrium oraz zawierającą dodatkowo sekwencję kodującą 6 histydyny na początku 5'. Gen *ISD11* obejmuje sekwencję całego białka Isd11, ponieważ nie zidentyfikowano pre-sekwencji kierującej je do mitochondrium oraz zawiera sekwencję kodującą 3 histydyny na końcu 3'. Przygotowano następujące konstrukty:

pETDuet-1 NFS1(ISD11)  
kodujący białko Nfs1 i Isd11 typu dzikiego zawierające znacznik histydynowy.

#### 6.2.13 Plazmid kodujący Sc Yfh1

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka Yfh1-his6 wykorzystano wektor pET-3a niosący kasetę oporności na ampicylinę oraz zawierający gen *YFH1* kodujący dojrzałą formę białka Yfh1 (aminokwasy 52-174) pozbawioną sekwencji kierującej do mitochondrium, ale posiadającą dodatkowo 6 histydyn na końcu 3'.

pET-3a YFH1  
kodujący białko Yfh1 typu dzikiego zawierające znacznik histydynowy

#### 6.2.14 Plazmid kodujący Ct Isu1<sub>His</sub> /CtIsu1-GST

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka CtIsu1-his6 wykorzystano plazmid pET21d ISU1 zawierający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen ISU1 kodujący dojrzałą formę białka Isu1 (aminokwasy od 41 do 171) pozbawioną sekwencji kierującej do mitochondrium, ale posiadającą dodatkowo 6 histydyn na końcu 3'.

pET21d ISU1Ct  
kodujący białko CtIsu1-his6 typu dzikiego.

Do nadprodukcji i oczyszczenia białka CtIsu1-GST wykorzystano plazmid pET3a ISU1-GST posiadający kasetę oporności na ampicylinę oraz gen ISU1 obejmujący sekwencję kodującą dojrzałą formę białka Isu1 (od tyrozyny 35 do 165) bez pre-sekwencji kierującej do mitochondrium.

pET3a ISU1Ct-GST  
kodujący białko CtIsu1-GST typu dzikiego.

### 6.3 Pożywki do hodowli bakteryjnych

#### LA (*ang. lysogeny agar*)

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

#### LB (*ang. lysogeny broth*)

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

#### TB (*ang. terrific broth*)

2.4% (w/v) ekstrakt drożdżowy, 1.2% (w/v) trypton, 0.4% (w/v) glicerol, 0.231% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.254% (w/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

### 6.4 Inne

Złoża chromatograficzne:

- NiNTA agarose (Qiagen)
- PD-10 (GE Healthcare)
- Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)
- CL-4 z immobilizowanym zredukowanym glutationem (Fluka)
- CM-Sepharose (Amersham biosciences)
- Hi trap 16/60 Superdex 75 (Sigma Aldrich)
- P5 (GE Healthcare)

Bufor Laemmli 4x stężony

250 mM Tris-HCl pH 6,8

8% (w/v) SDS

40% (v/v) glicerol

10%  $\beta$ -merkaptoetanol

0,025% (w/v) błękit bromofenolowy

### 6.5 Roztwory

<i>Roztwór</i>	<i>Skład</i>
Coomassie blue	– 0,28% Coomassie Brilliant Blue G (m/v); 50% metanol; uzupełnione $\text{H}_2\text{O}$
Chlorek wapnia	– 100 mM $\text{CaCl}_2$ , roztwór wodny
Laemmli	– 15,5 mM Tris-HCl pH6,8; 2,5% SDS; 0,125% bromofenol; 6,25% glicerol; 90 mM $\beta$ -merkaptoetanol; uzupełniono wodą dejonizowaną
Odbarwiacz	– 10% kwas octowy; 20% metanol
SDS, (10x stężony)	– 196 mM glicyna; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,3

## 7 Metody

### 7.1 Izolacja plazmidowego DNA

Do izolacji plazmidowego DNA wykorzystałam komercyjny zestaw Plasmid Mini firmy A&A Biotechnology (Polska). Izolację plazmidowego DNA przeprowadziłam według instrukcji producenta. W tym celu wykorzystałam 3 ml hodowli nocnej, którą wcześniej zlizowałam buforami z zestawu. Następnie uzyskany supernatant po lizie nałożyłam na dołączoną do zestawu kolumnę ze złożem krzemionkowym, które wiąże plazmidowe DNA i płukałam dwoma roztworami dołączonymi do zestawu. Podczas ostatniego etapu na złożo nałożyłam 50  $\mu$ l wody w celu wyeluowania związanego DNA. Stężenie otrzymanego preparatu sprawdziłam spektrofotometrycznie (Nanodrop), mierząc absorbancję próbki przy długości fali świetlnej  $\lambda=260$  nm. Tak oczyszczone DNA przechowywałam w  $-20^{\circ}\text{C}$  do momentu użycia.

### 7.2 Przygotowanie komórek kompetentnych

Hodowlę nocną komórek *E. coli*, szczepy DH5a, BL21(DE3), BL21 Codon +, HMS174(DE3) lub C41(DE3), które wykorzystywałam w czasie realizacji mojego projektu doktorskiego, rozcieńczałam w stosunku 1:100 w 100 ml pożywki LB i hodowałam do uzyskania OD=0,2. Następnie całą hodowlę wirowałam 1000 g w rotorze Sigma 12148-H przez 5 minut w  $4^{\circ}\text{C}$ . Osad bakteryjny zawieszałam w 100 mM  $\text{CaCl}_2$  w ilości odpowiadającej połowie początkowej objętości. Zawiesinę inkubowałam w łaźni lodowej przez 1 godzinę, a następnie ponownie wirowałam 1000 g w rotorze Sigma 12148-H przez 5 minut w  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzyskany osad zawieszałam w 1 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  i inkubowałam w łaźni lodowej przez noc. Następnego dnia do zawiesiny bakteryjnej dodawałam glicerol do końcowego stężenia 10%. Komórki kompetentne porcjaowałam po 200  $\mu$ l i przechowywałam w  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 7.3 Transformacja komórek bakteryjnych

Do 200  $\mu$ l komórek kompetentnych *E. coli* dodawałam 0,5–1  $\mu$ l plazmidowego DNA. Komórki inkubowałam w łaźni lodowej przez 1 godzinę, a następnie poddawałam szokowi cieplnemu przez 3 minuty w  $43^{\circ}\text{C}$ . Do zawiesiny komórkowej dodawałam 1 ml ciepłego LB i inkubowałam z wytrząsaniem przez 1 godzinę w  $37^{\circ}\text{C}$ . Na płytce, z podłożem stałym LA z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku, wysiewałam po 100  $\mu$ l zawiesiny bakteryjnej. Następnie komórki wirowałam 5 minut 1500 g w rotorze Sigma 12124, po czym supernatant usuwałam, osad zawieszałam i wysiewałam na płytce po 100  $\mu$ l. Płytki inkubowałam przez noc w  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 7.4 Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE prowadziłam, stosując zestaw firmy Bio-Rad (żele o wymiarach 8x10cm) według instrukcji producenta oraz metody Laemmli (Laemmli, 1970). Białka rozdzielałam w dwufazowych żelach poliakrylamidowych o grubości 1mm. Do przygotowania dolnej warstwy rozdzielającej wykorzystywałam 12,5% (v/v) roztwór akrylamidu/bisakrylamidu (33:1) zawierający 375 mM Tris-Cl pH 8,8 i 0,1% (w/v) SDS

(dodecylsulfonian sodu). Polimeryzację indukowałam poprzez dodanie 0,1% (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina) i 0,04% (w/v) APS (nadsulfonian amonu), po czym mieszaninę wylewałam pomiędzy uprzednio przygotowany zestaw szybki, do  $\frac{3}{4}$  wysokości, a na wierzch ostrożnie dodawałam małą ilość etanolu lub wody destylowanej. Po zestaleniu żelu zlewałam etanol/wodę i odciągałam ręcznikiem papierowym resztkę cieczy, a na wierzch żelu dodawałam mieszaninę stanowiącą warstwę zagęszczającą o składzie 5% (v/v) akrylamid/bisakrylamid (33:1), 125 mM Tris-Cl pH 6,8 i 0,1% (w/v) SDS, której polimeryzację indukowałam dodając 0,1% (v/v) TEMED i 0,04% (w/v) APS. Żele pozostawiałam na 2 godziny w temperaturze pokojowej do całkowitej polimeryzacji. Próbkę zawierającą białka mieszałam z 4-krotnie stężonym buforem Laemmli (250 mM Tris-Cl pH 6,8; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) glicerol; 10%  $\beta$ -merkaptotanol; 0,025% (w/v) błękit bromofenolowy) w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowałam w 100°C przez 10 minut. Następnie próbkę wytrząsałam przez kilka sekund, wirowałam przez 3 sekundy w mikrowirówce stołowej (Carl ROTH) i nanosiłam na gotowy żel poliakrylamidowy. Rozdział prowadziłam przy stałym napięciu 180V przez około godzinę, do momentu opuszczenia żelu przez zawarty w buforze Laemmli barwnik błękit bromofenolowy. Z żelu usuwałam fazę zagęszczającą, a zawierającą białka fragment rozdzielający żelu barwiłam przez noc w 100 ml roztworu Coomassie Brilliant Blue przygotowanego przez rozcieńczenie jego stężonego roztworu (0,28% (w/v) Brilliant Blue G, 50% (v/v) metanol) kwasem octowym i wodą w stosunku 5:2:3. Następnego dnia nadmiar barwnika pozbywałam się z żelu, inkubując go roztworze odbarwiającym (10% (v/v) kwas octowy, 20% (v/v) metanol).

## 7.5 Barwienie czernią amidową

Do wstępnej identyfikacji frakcji zawierających oczyszczane białko wykorzystywałam barwienie czernią amidową (0,1% barwnik Amido black; 45% H<sub>2</sub>O; 10% kwas octowy; 45% metanol). Na błonę nitrocelulozową nanosiłam po 2  $\mu$ l z frakcji i barwiłam w roztworze czerni amidowej. Następnie błonę odbarwiałam w roztworze odbarwiającym (10% (v/v) kwas octowy, 20% (v/v) metanol)

## 7.6 Przygotowanie złożeń chromatograficznych

### 7.6.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA

Kolumnę chromatograficzną uzupełniłam złożem do docelowej objętości, a następnie aktywowałam je, używając kolejno odpowiednich roztworów:

- 30 ml buforu regenerującego (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% glicerol; 150mM NaCl, 100mM EDTA pH 8,0)
- 40 ml H<sub>2</sub>O
- 20 ml 100mM NiSO<sub>4</sub>
- 10 ml H<sub>2</sub>O
- 30 ml buforu do równoważenia kolumny (odpowiedniego dla białka)

Następnie, po użyciu złożę ponownie regenerowałam i przechowywałam w 100 mM NiSO<sub>4</sub> w 4°C.



## 7.6.2 Q-sepharose

Odpowiednią ilość złoza upakowałam w kolumnie o określonej objętości. Po przygotowaniu kolumny ze złożem złoże płukałam 2M roztworem soli (NaCl/KCl), a następnie równoważyłam odpowiednim dla oczyszczanego białka buforem. W celu regeneracji złoza do ponownego użytku przepłukałam złoże 2M roztworem soli (NaCl/KCl) i przechowywałam w 4°C.

## 7.6.3 Złoże agarozowe CL-4B z immobilizowanym zredukowanym glutationem

Złoże agarozowe CL-4B z immobilizowanym zredukowanym glutationem przygotowywałam według procedury opisanej w metodzie dotyczącej przygotowania złoza do precypitacji kompleksów białkowych (7.18.1). Po użyciu do oczyszczania białek fuzyjnych ze znacznikiem GST złoże upakowane w szklanej kolumnie płukałam odpowiednio poniższymi roztworami w celu jego regeneracji:

- 10 ml GHCl (chlorek guanidyny)
- 20 ml 70% Et OH
- 20 ml buforu C1(25 mM Tris-HCl pH8,0; 10% glicerol; 1mM PMSF; 200 mM NaCl; 0,05% Triton X-100; 1 mM DTT)
- 10 ml 20% Et OH

Po etapie regeneracji kolumnę ze złożem agarozowym CL-4B z immobilizowanym zredukowanym glutationem przechowywałam w buforze C1 w 4°C.

## 7.7 Oczyszczanie białek

### 7.7.1 Ec IscU<sub>His</sub>

Bakterie *E.coli* C41(DE3) niosące plazmid pVP67K kodujący białko IscU-His<sub>8</sub> zaszczerpiłam do pożywki LB z dodatkiem ampicyliny(100 µg/mL) i hodowałam komórki przez noc w temperaturze 37 °C. Następnie nocna hodowla została odmłodzona do OD<sub>600</sub>=0,1 w 6 litrach pożywki LB uzupełnionej ampicyliną do stężenia 100 µg/mL. Komórki hodowane były do momentu osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0,6 i wtedy indukowałam nadprodukcję białka IscU poprzez dodanie do hodowli IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Następnie hodowlę zwirowałam (4620 g /10 minut/4°C / rotor JLA-10.500 Beckman Coulter) i otrzymałam ok. 20 g osadu, który podzieliłam na porcje i każdą z nich zawiesiłam w około 30 ml buforu L(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 150 M KCl) zawierającego 20 mM imidazol, pH 8.0. Tak zwieszona w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie prasą Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam(1 godzina/4°C/75600 g / rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę z 2 ml złoza NiNTA (Novagen (EMD Millipore Corp.)Billerica, MA, USA) zrównoważonego buforem L. Następnie przepłukałam złoże buforem L oraz buforem L z dodatkiem 1M KCl i wyeluowałam białko ze złoza stosując liniowy gradient imidazolu (20-500 mM) w buforze L. Frakcje zawierające czysty preparat białka IscU zostały zebrane, połączone i zagęszczone przy użyciu filtrów (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Merck Millipore, Tullagreen, Cork, Ireland, 10 kDa). Przed

zagęszczeniem do białka dodany został 100 mM KCN aby pozbyć się ewentualnych polisiarczków przyłączonych do reszt cysteinowych w obrębie IscU (151).

Do zmiany buforu zastosowałam kolumnę PD10 (GE Healthcare,UK). KCN został usunięty poprzez filtrację żelową w buforze F (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM KCl, 10 % glicerol) na kolumnie PD10 (Amersham Biosciences). Uzyskany preparat został poporcjowany i przechowywany w -80 °C do momentu użycia.

### 7.7.2 Ec IscS

Białko IscS oczyściłam według zmodyfikowanej procedury opublikowanej przez Kim i wsp. 2012 (222). Bakterie *E.coli* C41(DE3) niosące plazmid pET11aIscS kodujący białko IscS zaszczerpiłam do pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) i hodowałam komórki przez noc w temperaturze 37 °C. Następnie odmłodziłam nocną hodowlę do OD<sub>600</sub>=0,1 w 6 litrach pożywki LB uzupełnionej ampicyliną do stężenia 100 µg/ml. Komórki hodowane były do momentu osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0,6 i wtedy indukowałam nadprodukcję białka IscS poprzez dodanie do hodowli IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Podczas nocnej hodowli w 20 °C dodatkowo został dodany fosforan pirydoksalu (PLP) do stężenia 50 µM i etanol do stężenia 3% (v/v) (231). Następnie hodowlę zwirowałam (4620 g/10 minut/4°C / rotor JLA-10.500 Beckman Coulter) i otrzymałam ok. 20 g osadu, który podzieliłam na porcje i każdą z nich zawiesiłam w około 30 ml buforu Q1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ditiotretitol (DTT), 0.5 mM kwas wersenowy (EDTA), 0.4 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF). Tak zawieszona w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie prasą Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam (1 godzina/4°C/75600 g/ rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę ze złożem Q-sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Następnie kolumna została przepłukana buforem Q1 zawierającym 0,4mM PMSF. Do elucji białka IscS ze złoża użyłam gradientu 0-1 M NaCl w buforze Q1. Następnie zebrane frakcje analizowane były na żelu SDS-PAGE. Najlepsze frakcje pod względem czystości i ilości zostały połączone ze sobą i zagęszczone przy użyciu Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck Millipore, Tullagreen, Cork, Ireland) oraz dializowane do buforu P1 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT). Do otrzymanego preparatu po dializie dodałam siarczan amonu do stężenia 1 M i nałożyłam na kolumnę ze złożem Phenyl Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). IscS został wyeluowany ze złoża poprzez użycie liniowego gradientu siarczanu amonu od 1M do 0. Żółte frakcje zostały zagęszczone poprzez wirowanie i dodatkowo potraktowane 100µM PLP. Oczyszczony preparat białka IscS został dializowany do buforu F (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM KCl, 10 % glicerol) i przechowywany w -70 °C do momentu użycia.

### 7.7.3 Ec CyaY<sub>SUMO</sub>

Bakterie *E.coli* BL21(DE3) niosące plazmid pE kodujący białko CyaY z fragmentem SUMO w obrębie którego znajduje się znacznik histydynowy zaszczerpiłam do pożywki LB z dodatkiem kanamycyny i hodowałam przez noc w 37°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem (140 obr./min). Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki płynnej LB do OD<sub>600</sub>=0,1 i inkubowałam w 30°C w wytrząsarce powietrznej (160 obr./min) do uzyskania gęstości OD<sub>600</sub>=0,6 wtedy indukowałam produkcję białka poprzez dodanie IPTG do stężenie końcowego 1mM. Nadprodukcję prowadziłam przez 3 godziny. Następnie hodowlę

zwirowałam (4620 g/10 minut/4°C / rotor JLA-10.500 Beckman Coulter) i otrzymałam ok. 20 g osadu, który podzieliłam na porcje i każdą z nich zawiesiłam w około 30 ml buforu I (25 mM Tris-HCl pH8.0; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF). Tak zawieszona w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie prasą Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam (1 godzina/4°C/75600 g / rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę ze złożem Ni-NTA. Trzykrotnie nakładałam grawitacyjnie supernatant na kolumnę zrównoważoną buforem I (25 mM Tris-HCl pH8.0; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF). Złoże ze związanymi białkami płukałam: 200 ml buforu I (25 mM Tris-HCl pH8.0; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF); 40 ml buforu II (25 mM Tris-HCl pH8.0; 500 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 10mM imidazol pH8.0); 50 ml buforu A (25 mM Tris-HCl pH8.0; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 10mM imidazol pH8.0). Następnie białko eluowałam ze złoża stosując liniowy gradient imidazolu (10-250 mM) w bufore I zbierając 40 ml frakcji (przepływ 0,4ml/min; objętość frakcji 1 ml), które następnie analizowałam techniką SDS-PAGE. Najczystsze frakcje zostały połączone i zamrożone w -70°C do momentu kolejnego etapu procedury.

Do odcięcia ogona SUMO wykorzystałam oczyszczoną proteazę Ulp1. W tym celu do białka o objętości 60 µl dodałam 80 µl Ulp1 o stężeniu 23,53 µg/ µl i inkubowałam przez 1,5 h w 4°C. Następnie do próbki dodawałam wcześniej przygotowane i zrównoważone złożo Ni-NTA znajdujące się w buforze N (50 mM imidazol 8.0, 10% glicerol, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM PMSF, 500 mM KCl). Następnie próbkę wirowałam przez 2 min, stosując rotor Sigma 12134 z prędkością 75600 g. Uzyskany supernatant dializowałam do buforu Q (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM PMSF). Po dializie białko nałożyłam na kolumnę ze złożem Q-sepharose (10 ml), zrównoważoną buforem Q2 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glicerol, 1mM PMSF). Po nałożeniu próbki złożo płukałam buforem Q2 i eluowałam białko gradientem NaCl od 40mM do 300 mM, objętość gradientu wynosiła 80 ml, natomiast frakcje zbierałam o objętości 2 ml.

Po rozdziale chromatograficznym przeprowadzonym na jonowymieniaczu zebrałam frakcje zawierające czyste białko CyaY, połączyłam, zagęściłam z użyciem filtrów Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units i przeprowadziłam sączenie molekularne w buforze CY (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM KCl i 10% glicerol), stosując kolumnę PD10. Uzyskany preparat CyaY porcjaowałam, zamroziłam i przechowywałam w -70°C do momentu użycia.

#### 7.7.4 Ec Fdx

Bakteryjną ferredoksynę oczyściłam według zmodyfikowanej procedury (242). Komórki BL21(DE3) transformowałam plazmidem pDEST24Fdx i hodowałam w pożywce LB w 37°C. Nadprodukcję białka zainicjowałam poprzez dodanie 1 mM IPTG przy OD<sub>600</sub>=0.6, równocześnie podczas indukcji został dodany cytrynian amonu żelaza (III) do końcowego stężenia 50µM. Po indukcji komórki były hodowane przez noc. Następnie hodowlę zwirowałam (4620 g/10 minut/4°C / rotor JLA-10.500 Beckman Coulter) i otrzymałam ok. 20 g osadu, który podzieliłam na porcje i każdą z nich zawiesiłam w około 30 ml buforu SQ1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% (v/v) glicerol, 50 mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5) zawierającym dodatkowo PMSF w celu zatrzymania proteolizy. Tak zawieszona w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie prasą Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam (1 godzina/4°C/75600 g / rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę ze złożem Q-sepharose. Złoże ze związanymi białkami płukałam buforem SQ1 (50

mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% (v/v) glicerol, 50 mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5, 1mM PMSF). Następnie białko eluowałam ze złoża, stosując liniowy gradient soli NaCl (100–500mM) w buforze SQ1, zbierając 40 ml frakcji (przepływ 0,4ml/min; objętość frakcji 1 ml), które następnie analizowałam techniką SDS-PAGE. W następnej kolejności próby charakteryzujące się brązowym kolorem zostały zagęszczone przy użyciu probówek Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units i dializowane do buforu P1 (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 2mM EDTA pH 7.5). Po dializie do białek został dodany siarczan amonu do stężenia 2M i próbka została nałożona na kolumnę ze złożem Phenyl Sepharose. Ferredoksyna została wyeluowana ze złoża liniowym gradientem siarczanu amonu (2M-0). Frakcje zawierające białko Fdx zostały zagęszczone i poddane dializie do buforu FD (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 50 mM NaCl). Uzyskany preparat został poporcjowany, zamrożony w ciekłym azocie i przechowywany w -70°C do momentu użycia.

### 7.7.5 *Ec HscA* i *Ec HscB*

Białka *HscA* i *HscB* zostały oczyszczone według zmodyfikowanej procedury opublikowanej przez Vickery i wsp. 1997. (237) Bakteryjne komórki *E.coli* DH5 $\alpha$  transformowałam plazmidami odpowiednio pTrcHscA i pTrcHscB i hodowałam w pożywce TB(terrific broth) w 37°C. Indukcję nadprodukcji zainicjowałam poprzez dodanie do hodowli bakteryjnej 0,5 mM IPTG przy OD<sub>600</sub>=1. Po 16 h nadprodukcji komórki zebrałam poprzez wirowanie, zamroziłam i zlizowałam za pomocą prasy Frencha w buforze Q1 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.4 mM PMSF). Uzyskany po wirowaniu rozpuszczalny supernatant nałożyłam na kolumnę ze złożem Q-sepharose zrównoważoną buforem Q1. Po nałożeniu lizatu kolumnę ze złożem przepłukałam buforem Q1, aby pozbyć się niezwiązanych do złoża białek. Elucję białka przeprowadziłam, stosując gradient od 0 do 1 M soli NaCl w buforze Q1. Wszystkie zebrane frakcje analizowałam na żelu po wykonaniu elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE. Następnie wybrane frakcje zagęściłam przy użyciu probówek Amicon Ultra 15 i dializowałam do buforu P1 (100 mM Tris-HCl pH7.4, 20 mM KCl, 10 % glicerol). Po dializie zarówno do białka *HscA* jak i *HscB* dodałam siarczan amonu do stężenia 1M. Tak przygotowany roztwór białka nałożyłam na kolumnę ze złożem Phenyl sepharose. Elucja białek nastąpiła przy użyciu liniowego gradientu siarczanu amonu od 1M do 0. Frakcje zawierające białko *HscA* lub *HscB* zagęściłam i poddałam filtracji żelowej na kolumnie PD10 w buforze F(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM KCl, 10% glicerol). Końcowy preparat został poporcjowany i przechowywany w -70°C do momentu użycia.

### 7.7.6 *Ec Fpr<sub>his</sub>*

Reduktaza ferredoksyny z *E.coli* oczyszczona została według zmodyfikowanej procedury opisananej przez Hall i wsp. 2001 (243). Komórki HMS174(DE3) zawierające plazmid pET11a-fpr z reduktazą flawodoksyny zawierającą znacznik histydynowy hodowałam przez noc w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny. Następnie odmłodziłam hodowlę nocną w 6 l pożywki LB zawierającej ampicylinę o stężeniu 100 $\mu$ g/ml. Hodowlę prowadziłam w 30°C do momentu osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0,6. W następnej kolejności do hodowli dodane zostało IPTG do stężenia 1 mM oraz ryboflawina do stężenia 3,75  $\mu$ M. Po czterogodzinnej nadprodukcji komórki zostały zwirowane, rozpuszczone w buforze R (25mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 10 mM imidazol) i poddane lizie prasą Frencha. Zlizowane bakterie zostały zwirowane przez 1 h 75000g. Powstały po wirowaniu supernatant nałożyłam na kolumnę ze złożem Ni-NTA zrównoważoną buforem R. Białka zostały eluowane ze złoża

gradientem liniowym imidazolu 10-250 mM w buforze R. Frakcje zawierające białko Fpr zostały zagęszczone przy użyciu filtrów Amicon Ultra-15 i poddane filtracji żelowej na kolumnie PD10 w buforze F(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM KCl, 10 % glicerol). Końcowy preparat poporcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -70°C do momentu użycia.

### 7.6.7 Ec GrxD<sub>his</sub>

Bakterie *E.coli* BL21(DE3) niosące plazmid pET28 kodujący białko GrxD, zaszczepliłam do 400 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 mg/l) i hodowałam przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem (180 obr./min.) w 30°C. Następnego dnia do wyjałowionych dużych kolb szklanych zawierających 1 litr pożywki LB (ang. *Lysogeny Broth*) z ampicyliną, dodałam część hodowli nocnej tak, aby uzyskać gęstość optyczną hodowli OD<sub>600</sub>=0,1. Całość inkubowałam w cieplarni powietrznej z wytrząsaniem (180 obr./min.) w temp. 30°C, aż do osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0,8, po czym indukowałam nadprodukcję białka przez dodanie IPTG (izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd) do stężenia końcowego 1 mM. Ponadto do hodowli dodałam również źródło żelaza (cytrynian amonu żelaza (III)) do końcowego stężenia 50 μM i prowadziłam indukcję nadprodukcji białka przez noc w 30 °C. Następnie hodowlę zwirowałam (15°C, 4620 g, 10 min, Beckman Coulter, rotor JLA-10.500), a powstały osad zawiesiłam w buforze A (20mM Tris-HCl pH 8.0; 500mM NaCl ; 5mM imidazol; 10% glicerol; 1mM PMSF) i trzykrotnie lizowałam z użyciem prasy Frencha przy ciśnieniu 1000 psi. Lizat wirowałam przez godzinę przy 75600 g w temp. 4°C (Beckman Coulter, rotor JA-30.50). Supernatant nakładałam na uprzednio zrównoważoną buforem A kolumnę Ni-NTA (8ml), a następnie płukałam buforem A1 (20mM Tris-HCl pH 8.0; 500mM NaCl ; 30 mM imidazol; 10% glicerol; 1mM PMSF) w objętości 80ml. Białko eluowałam z kolumny gradientem imidazolu , stosując następujące warunki rozdziału: przepływ 0,3ml/min; gradient imidazolu 30mM (A1) – 300mM (B); całkowita objętość gradientu: 30ml; objętość zbieranych frakcji: 1ml. Najczystsze frakcje zagęściłam do końcowej objętości 5ml, a następnie tak przygotowany preparat poddałam sączeniu molekularnemu w buforze C (50mM Tris-HCl pH 8.0 ; 150mM NaCl ; 10% glicerol). Do nastrojki preparatu na złoże wykorzystałam pętlę o objętości 2ml. Rozdział przeprowadziłam na kolumnie Superdex 16/600 75pg. Całkowita objętość rozdziału wynosiła 120 ml, natomiast objętość zbieranych frakcji 1ml. Przeprowadzone sączenie molekularne pozwoliło na uzyskanie frakcji monomerycznej białka GrxD w formie apo, czyli bez centrum Fe-S oraz frakcji dimeru w formie holo, który zawiera związane centrum Fe-S. Stężenie dwóch form białka GrxD wynosiło odpowiednio 31,17 μg/ml oraz 34,10 μg/ml. Otrzymane preparaty rozporcjowałam, zamroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -70°C.

### 7.7.8 Sc Isu<sub>his</sub>

Do nadprodukcji białka IsuIHis wt wykorzystałam komórki *E. coli* szczep C41(DE3) niosący plazmid pET21dISU/His. Bakterie hodowałam w 500 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 μg/ml) w wytrząsarce wodnej (180 obr/min) w 37°C przez 19 godzin. Hodowlę nocną odmłodziłam do OD<sub>600</sub>=0,1 w 6 l pożywki LB + amp. Bakterie hodowałam w 37°C do OD<sub>600</sub>=0,6, a następnie zaindukowałam nadprodukcję białka poprzez dodanie roztworu IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Nadprodukcję prowadziłam przez 3 godziny. Hodowlę bakteryjną wirowałam 10 minut 4620 g 4°C w rotorze JLA 10.500 (Beckman). Uzyskany osad bakteryjny zawiesiłam w ok. 70 ml buforu N1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% glicerol;

1 mM PMSF; 0,5 mM KCl; 0,05% Triton X-100; 50 mM imidazol pH 8,0). Zawiesinę bakteryjną lizowałam trzykrotnie z użyciem prasy French'a, stosując ciśnienie 1500 psig. Lizat komórkowy wirowałam przez 1 godzinę 75600 g w 4°C w rotorze JA 30.50 Ti (Beckman). Dalsze etapy oczyszczania przeprowadziłam w 4°C. Otrzymany supernatant nanosiłam grawitacyjnie na kolumnę z 2,5 ml złoża Ni-NTA [Materiały 7.8.1] zrównoważoną 40 ml buforu N1. Następnie kolumnę płukałam:

— 40 ml buforu N2 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 1 M KCl; 50 mM imidazol pH 8,0; 0,05% Triton X-100);

— 100 ml buforu N3 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 150 mM KCl; 50 mM imidazol pH 8,0; 0,05% Triton X-100).

Białko Isu1<sub>His</sub> eluowałam liniowym gradientem imidazolu (50–500 mM; całość gradientu 50 ml; przepływ 0,3 ml/min; frakcje 0,9 ml). Najczystsze frakcje zawierające białko Isu1<sub>His</sub> dializowałam do buforu końcowego N4 (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% glicerol; 200 mM KCl; 5 mM β-merkaptotetanolu 0,05% Triton X-100). W przypadku frakcji zawierających zanieczyszczenia zastosowałam kolejny etap oczyszczania, wykorzystując złożo CM-Sephrose [Materiały 7.8.2]. Wybrane frakcje dializowałam wobec buforu N5 (20 mM MOPS pH7,0; 25 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,05% Triton X-100) przez 3 godziny ze zmianą na świeżą porcję buforu co 1 godzinę. Następnie roztwór białka Isu1<sub>His</sub> nanosiłam grawitacyjnie na kolumnę z 2 ml złoża CM-Sephrose. Kolumnę płukałam 20 ml buforu N5, a następnie eluowałam białko buforem N6 (20 mM MOPS pH 7,0; 600 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,05% Triton X-100) i zbierałam frakcje po 0,5 ml. Najczystsze frakcje dializowałam do buforu końcowego N4. Oczyszczone białko porcjowałam i przechowywałam w temperaturze -70°C.

### 7.7.9 Sc Isu1-GST

Białko Isu1-GST oczyszczałam zgodnie z opublikowaną procedurą [75]. Bakterie *E. coli* C41(DE3) niosące plazmid pET3a kodujący dojrzałą formę białka Isu1 z fragmentem GST zaszczepliłam do 400 ml pożywki LB suplementowanej ampicyliną (100 mg/l) i hodowałam przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem (180 obr./min.) w 37°C. Następnego dnia część hodowli nocnej dodałam do wyjałowionych dużych kolb szklanych zawierających 1 litr pożywki LB (ang. *Lysogeny Broth*) suplementowanej ampicyliną, tak aby finalnie osiągnąć gęstość optyczną OD<sub>600</sub>=0,1. Całość inkubowałam w cieplarni powietrznej z wytrząsaniem (180 obr./min.) w temp. 30°C, aż do osiągnięcia gęstości OD<sub>600</sub>=0,6, po czym indukowałam produkcję białka przez dodanie IPTG (izopropyl-β-Dtiogalaktopiranozyd) do stężenia końcowego 1 mM. Po 3 godzinach hodowlę zwirowałam (15°C, 4620 g, 10 min, Beckman Coulter, rotor JLA-10.500), a każde uzyskane 10 g osadu zawiesiłam w 30 ml buforu L1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 1 mM DTT (ditiotreititol); 10% (v/v) glicerol, 0,05% (v/v) Triton X-100) z dodatkiem 1 mM PMSF (fluorek fenylometrylosulfonylu) i zamrażałam w ciekłym azocie. Następnie bakterie rozmrażałam w litrowej zlewce wypełnionej wodą i lodem, po czym lizowałam 2-krotnie z użyciem prasy Frencha przy ciśnieniu 1000 psi. Lizat wirowałam przez godzinę przy 75600 g w temp. 4°C (Beckman Coulter, rotor JA-30.50). Uzyskany supernatant nanosiłam 2-krotnie na 1 ml złoża agarozowego opłaszczanego zredukowanym glutationem (Fluka), przygotowanego uprzednio w szklanej kolumnie i zrównoważonego 25 ml buforu L1. Następnie złożo płukałam kolejno 100 ml buforu L1 i 10 ml buforu L3 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 1 mM DTT (ditiotreititol); 10% (v/v) glicerol, 0,05% (v/v) Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP) i ponownie 10 ml buforu L1.

Następnie białko eluowałam ze złoża 10 ml buforu L1 z dodatkiem 50 mM zredukowanego glutationu (pH 7,0), zbierając 1 ml frakcje, których jakość pod względem czystości i ilości oceniałam za pomocą metody SDS-PAGE. Najlepsze frakcje połączyłam i dializowałam wobec 1 litra buforu C1 (20 mM MOPS pH 7,0; 25 mM NaCl; 1mM DTT (ditiotreitól), 0,05% (v/v) Triton X-100), który wymieniałam trzykrotnie w godzinnych odstępach czasu. Następnie roztwór białka Isu1-GST nanosiłam na kolumnę z 1 ml złoża CM Sepharose<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences) zrównoważoną uprzednio 20 ml buforu C1, całość płukałam 40 ml buforu C1, po czym eluowałam białko Isu1-GST buforem C1 z liniowo wzrastającym stężeniem soli od 25 mM do 600 mM NaCl (0,4 ml./min.; objętość frakcji 1,2 ml; całkowita objętość 50 ml). Frakcje analizowałam za pomocą metody SDS-PAGE, najlepsze z nich połączyłam i dializowałam w litrze buforu C2 (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% (v/v) glicerol; 0,05 M NaCl; 5 mM  $\beta$ -merkaptotanol; 0,05% (v/v) Triton X-100), który wymieniałam trzykrotnie w godzinnych odstępach czasu. Następnie roztwór białka Isu1-GST nanosiłam na kolumnę z 1 ml złoża Q-Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) zrównoważoną uprzednio 20 ml buforu C2, całość płukałam 40 ml buforu C2, po czym eluowałam białko 10 ml buforu C2 zawierającym 600 mM NaCl, zbierając 0,5 ml frakcje, których jakość oceniałam metodą SDS-PAGE (Metody 3.4.). Najbardziej stężone z nich łączyłam i dializowałam wobec litra buforu C3 (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% (v/v) glicerol; 0,2 M KCl; 5 mM  $\beta$ -merkaptotanol; 0,05% (v/v), Triton X-100), wymieniając go trzykrotnie w godzinnych odstępach czasu. Uzyskany preparat białka Isu1-GST dzieliłam na 50  $\mu$ l porcje, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -70°C

#### 7.7.10 Ct *Isu<sub>his</sub>*

Bakterie *E.coli* C41(DE3) niosące plazmid pET21d ISU1Ct-His<sub>6</sub> kodujący białko Ct Isu1 z ogonem polihistydynowym zaszczerpiłam do pożywki LB z dodatkiem ampicyliny i hodowałam przez noc w 37°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem (140rpm). Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki płynnej LB do OD<sub>600</sub>=0,1 i inkubowałam w 30°C w wytrząsarce powietrznej (160 obr/min) do uzyskania gęstości optycznej OD<sub>600</sub>=0,6, wówczas indukowałam produkcję białka poprzez dodanie IPTG do stężenie końcowego 1mM. Nadprodukcję prowadziłam przez 3 godziny. Następnie hodowlę zwirowałam (4620 g/ 10 minut/4°C / rotor JLA-10.500 Beckman Coulter) i otrzymałam ok. 20 g osadu, który podzieliłam na porcje i każdą z nich zawiesiłam w około 30 ml buforu I1 (25mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% glicerol, 1mM PMSF, 0.5 M KCl, 0.05% Triton X- 100, 50mM imidazol, pH 8.0). Tak zwieszona w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie prasą Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam (1 godzina/4°C/75600 g / rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę ze złożem Ni-NTA. Supernatant nakładałam trzykrotnie grawitacyjnie na kolumnę zrównoważoną buforem I1 (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 1mM PMSF, 0.5 M KCl, 0.05% Triton X- 100, 50mM imidazol, pH 8.0). Złoże ze związanymi białkami płukałam buforami I2 (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 1mM PMSF, 1 M KCl, 0.05% Triton X-100, 50mM imidazol, pH 8.0) i I3 (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 1mM PMSF, 150mM KCl, 0.05% Triton X-100, 50mM imidazol, pH 8.0). Następnie białko eluowałam ze złoża, stosując liniowy gradient imidazolu (50–500mM) w buforze I1, zbierając 40 ml frakcji (przepływ 0,4ml/min; objętość frakcji 1 ml), które następnie analizowałam techniką SDS-PAGE. W następnej kolejności białko CtIsu1 było inkubowane z 100 mM KCN przez 1 godz. w 25 °C. Aby pozbyć się KCN z próby zastosowałam filtrację żelową na kolumnie PD10 w buforze F (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM KCl, 10 % glicerol). Najczystsze preparaty zostały porcjowane, zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w -70°C do momentu użycia.

### 7.7.11 Ct Isu1-GST

Do nadprodukcji białka Isu1-GST wykorzystałam bakterie *E.coli* szczep C41(DE3) niosący plazmid pET3aCtISU1(GST tag). Na pierwszym etapie bakterie hodowałam przez noc w 400 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny w wytrząsarce wodnej przy 180 obr/min w 30°C. Następnego dnia hodowlę nocną odmlodziłam do OD<sub>600</sub>=0,1 w 6 l płynnej pożywki LB z dodatkiem antybiotyku. Bakterie hodowałam w 30°C do OD<sub>600</sub>=0,6, po czym zaindukowałam nadprodukcję białka poprzez dodanie roztworu IPTG do końcowego stężenie 1mM. Przez następne 3 godziny prowadziłam nadprodukcję. Kolejnym etapem było wirowanie hodowli przez 10 min 4620 g w 4°C w rotorze JLA 10.500 (Beckman). Uzyskany osad zawiesiłam w około 70 ml buforu C1 (25 mM Tris-HCl pH8,0; 10% glicerol; 1mM PMSF; 200 mM NaCl; 0,05% Triton X-100; 1 mM DTT). Bakterie zawieszono w buforze lizowałam trzykrotnie, używając prasy Frencha oraz stosując ciśnienie 1500 psi. Potem otrzymany lizat komórkowy wirowałam przez 1 godzinę 75600 g w 4°C w rotorze JA 30.50 Ti (Beckman). Uzyskany supernatant wykorzystałam dalej w kolejnych krokach oczyszczania. Procedura oczyszczania była przeprowadzona w 4°C z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej wypełnionej złożem CL-4B ze zredukowanym glutationem. Na wstępie złożę zrównoważyłam 10 ml buforu C1. Następnie otrzymany po wirowaniu supernatant nakładałam grawitacyjnie na kolumnę i płukałam kolejno buforami w celu wyeluowania białek, które niespecyficzenie oddziałują ze złożem w następującej kolejności:

- 100 ml buforu C1 bez dodatku roztworu PMSF (25 mM Tris-HCl pH8,0; 10% glicerol; 200 mM NaCl; 0,05% Triton X-100; 1 mM DTT),
- 10 ml buforu C1 z dodatkiem 1 mM ATP i 10 mM MgCl<sub>2</sub> (25 mM Tris-HCl pH8,0; 10% glicerol; 1mM PMSF; 200 mM NaCl; 0,05% Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 10 mM MgCl<sub>2</sub> )
- 10 ml C1 (25 mM Tris-HCl pH8,0; 10% glicerol; 1mM PMSF; 200 mM NaCl; 0,05% Triton X-100; 1 mM DTT)

Białko CtIsu1-GST eluowałam buforem C1 z dodatkiem 50 mM zredukowanego glutationu i zbierałam frakcje po 1 ml. Frakcje zawierające białko CtIsu1-GST zostały połączone. Następnie mieszaninę (objętość 2,5ml) nakładałam na kolumnę do sączenia molekularnego PD-10 (GE Healthcare) zrównoważoną 25 ml buforu C (20mM Tris-HCl pH 8,0; 10% glicerol; 1mM DTT; 20mM KCl), płukałam kolumnę 3,5 ml buforu C i zbierałam frakcje po 0,5 ml. Zebrane próby zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam do dalszych doświadczeń w -70°C.

### 7.7.12 Sc Nfs1(Isd11)<sub>his</sub>

Białko Nfs1 oczyszczałam zgodnie z opublikowaną procedurą. (165)Bakterie *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus niosące plazmid pETDuet-1 z *NFS1(ISD11)*, kodujący dojrzałą formę białka Nfs1 z Isd11 typu dzikiego zaszczepiłam do 500 ml pożywki LB (*ang. Lysogeny Broth*) suplementowanej ampicyliną (50 mg/l) oraz chloramfenikolem (36 mg/l) i hodowałam w przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem (37°C, 180 obr./min.). Następnego dnia hodowlę nocną wykorzystałam do uzyskania 10 litrów hodowli bakteryjnej o gęstości OD<sub>600</sub>=0,1 (pożywka LB z dodatkiem ampicyliny i chloramfenikolu), którą hodowałam w fermentorze, aż do uzyskania gęstości OD<sub>600</sub>=0,6, po czym indukowałam produkcję białka dodając IPTG (izopropyl-β-D-



tiogalaktopiranozyd) do stężenia końcowego 1 mM oraz PLP (fosforan pirydoksalu) do stężenia 50  $\mu$ M i etanol do stężenia 3% (v/v). Całość hodowałam przez 12 godzin w 20°C z włączonym mieszaniem 180 obr./min., a następnie zwirowałam (4620 g; 10 min.; Beckman Coulter; rotor JLA-10.500). Każde 10 g osadu bakteryjnego zawiesiłam w 30 ml buforu NA (50 mM NaPi pH 6,5; 300 mM NaCl; 10% (v/v) glicerol; 20 mM imidazol pH 6,5; 1 mM PMSF (fluorek fenylometrylosulfonylu)) i zamroziłam w ciekłym azocie. Następnie komórki rozmroziłam w zlewce z wodą i lodem, dwukrotnie poddałam lizie, wykorzystując prasę Frencha (ciśnienie 1000 psi) i zwirowałam (4°C; 1 godzina; 75600 g; Beckman Coulter; rotor JA 30.50). Supernatant zawierający białka naniosłam 2-krotnie na 2,5 ml złoża niklowe (Ni-NTA agarosa), które przygotowałam wcześniej w szklanej kolumnie i zrównoważyłam 25 ml buforu NA (bez PMSF). Następnie złożo płukałam 200 ml buforu NA (bez PMSF), po czym związane z nim białko eluowałam liniowo wzrastającym stężeniem imidazolu (20-250 mM) w buforze NA (bez PMSF), zbierając całkowitą objętość 35 ml (0,4 ml/min.; objętość frakcji 1 ml). Na ostatnim etapie złożo płukałam 30 ml buforu NA (bez PMSF) zawierającego 400 mM imidazol. W następnej kolejności oceniłem zawartość oraz czystość izolowanego białka w poszczególnych frakcjach, stosując metodę SDS-PAGE. Najczystsze frakcje zawierające kompleks Nfs1(Isd11) połączyłam (ok. 20 ml) i zagęściłam poprzez wirowanie (2000g, Sigma, rotor: 11333, 4°C) w probówce Centriprep 10K (Millipore) zawierającej filtr zatrzymujący cząsteczki o wielkości większej niż 10 kDa, czyli przepuszczający bufor, ale nie cząsteczki Nfs1 (~50 kDa) i Isd11 (~11 kDa) tworzące stabilny kompleks. Zagęszczony preparat (ok. 5 ml) sączyłam następnie na kolumnie PD-10 (GE Healthcare), aby wymienić bufor NA na bufor F (40 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 100 mM KCl; 1 mM DTT (ditiotreitol); 5% (v/v) glicerol; 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Frakcje z kompleksem Nfs1(Isd11) połączyłam i przygotowałam 50  $\mu$ l porcje, które zamroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -70°C.

### 7.7.13 Sc Hsc20<sub>his</sub>

Białka typu dzikiego Sc Hsc20<sub>his</sub> według poniższej procedury (Dutkiewicz i in. 2003). (180)

Bakterie *E. coli* szczepu C41(DE3) niosące plazmid pET21d Hsc20-his typu dzikiego hodowałam w 400 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100  $\mu$ g/ml) przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem (37°C, 180 obr./min.). Następnego dnia uzyskaną hodowlą zaszczipiałam sześć hodowli po 1000 ml LB z ampicyliną (100  $\mu$ g/ml) do OD<sub>600</sub>=0,1 i hodowałam w wytrząsarce powietrznej (37°C, 180 obr./min.). Gdy hodowla osiągała OD<sub>600</sub>=0,6 indukowałam nadprodukcję białka Hsc20 poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Kontynuowałam hodowlę przez 3 godziny i następnie zwirowałam (4620 g; 10 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JLA-10.500). Uzyskany osad bakteryjny zawieszałam w buforze J1 (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% (v/v) glicerol; 0,5 M NaCl; 1 mM PMSF (fluorek fenylometrylosulfonylu); 30 mM imidazol pH 8,0) w proporcji 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie.

Komórki następnie rozmrażałam w lodzie, lizowałam trzykrotnie przy pomocy prasy Frencha (ciśnienie 1000 psi) i zwirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant mieszałam w temperaturze 4°C, stopniowo dodając siarczan amonu (0,35 g/ml) w celu precypitacji białek. Po godzinnej inkubacji mieszaninę wirowałam (75600 g.; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti), a uzyskany osad zawieszałam w 20 ml buforu J1 i dializowałam wobec tego samego buforu przez noc w temperaturze 4°C. Wszystkie dalsze etapy oczyszczania prowadziłam w temperaturze 4°C.

Roztwór białka trzykrotnie nanosiłam grawitacyjnie na 2,5 ml złoża niklowego Ni-NTA agarose (Novagen), uprzednio przygotowanego w szklanej kolumnie i zrównoważonego 25 ml

buforu J1. Następnie złoże płukałam 100 ml buforu J1, potem 25 ml buforu J2 (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% (v/v) glicerol; 1 M NaCl; 1 mM PMSF; 30 mM imidazol pH 8,0; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP) i ponownie 25 ml buforu J1. Związane białko eluowałam liniowym gradientem imidazolu (30-300 mM) w buforze J1, zbierając całkowitą objętość 30 ml (przepływ 0,4 ml/min., frakcje 0,8 ml). Ilość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie najlepsze z nich pod względem czystości i ilości łączyłam i dializowałam wobec litra buforu J3 (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% (v/v) glicerol; 50 mM NaCl; 5 mM β-merkaptioetanol), wymieniając bufor trzykrotnie co godzinę. Następnie roztwór białka nakładałam na kolumnę zawierającą 4 ml złoża Q-Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare), zrównoważonego wcześniej 40 ml buforu J3. W następnej kolejności złoże płukałam 40 ml buforu J3 i eluowałam białko liniowym gradientem soli NaCl (50-300 mM) w buforze J3, zbierając całkowitą objętość 40 ml (przepływ 0,5 ml/min., frakcje 1 ml). Frakcje analizowałam pod kątem zawartości białka metodą SDS-PAGE, łącząc później te o największej zawartości białka i dializując wobec litra buforu J3, wymieniając bufor trzykrotnie co godzinę. Uzyskany preparat białka Hsc20 porcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -70°C.

#### 7.7.14 Sc Ssq1<sub>his</sub>

Mitochondrialne białko Hsp70 –Ssq1 oczyszczałam zgodnie z opublikowaną wcześniej procedurą (Manicki i in. 2014) (231).

W celu uzyskania preparatu białka Ssq1 bakterie *E. coli* szczepu BL21(DE3) transformowałam plazmidem pRSFDuet1-SSQ1His/HEP1. Konstruktor ten pozwalał na nadprodukcję białka Ssq1 w obecności białka Hep1 (Human Escort Protein 1), które z kolei bezpośrednio determinowało większą rozpuszczalność nadprodukowanego mitochondrialnego białka Hsp70 w komórkach bakteryjnych. (244) Bakterie *E. coli* szczepu BL21(DE3) niosące plazmid pRSFDuet1-SSQ1His/HEP1 hodowałam w 400 ml pożywki LB z dodatkiem kanamycyny (50 µg/ml) przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem (30°C, 180 obr./min.). Następnego dnia uzyskaną hodowlą zaszczepiałam sześć hodowli po 1000 ml LB z kanamycyną (50 µg/ml) do OD<sub>600</sub>=0,1 i hodowałam w wytrząsarce powietrznej (30°C, 180 obr./min.). Gdy hodowla osiągała OD<sub>600</sub>=0,6 indukowałam nadprodukcję białka Ssq1 poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Kontynuowałam hodowlę przez 4 godziny i następnie zwirowałam bakterie (4620 g; 10 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JLA-10.500). Uzyskany osad bakteryjny zawieszałam w buforze Q1 (20 mM HEPES-KOH pH 7,5; 150 mM KCl; 20 mM imidazol, 10% (v/v) glicerol, 1 mM PMSF, 2 mM octan magnezu) w proporcji 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie.

Komórki następnie rozmrażałam w trakcie inkubacji w lodzie, lizowałam trzykrotnie przy pomocy prasy Frencha (ciśnienie 1000 psi) i zwirowałam (75600 g, 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant nosiłam w temperaturze 4°C na kolumnę chromatograficzną zawierającą 2,5 ml złoża niklowego Ni-NTA agarose (Novagen), uprzednio zrównoważoną 25 ml buforu Q1. Złoże następnie płukałam kolejno: 50 ml buforu Q1; 50 ml buforu Q2 (Q1 + 0,05% Triton X-100); 20 ml buforu Q3 (Q1 + 1 mM ATP); 20 ml buforu Q4 (Q1 + 1 M KCl). Białko eluowałam liniowym gradientem imidazolu (40-250 mM) w buforze Q1, zbierając całkowitą objętość 30 ml (przepływ 0,3 ml/min, frakcje 1 ml). Chcąc uzyskać jak najwięcej białka wprowadziłam dodatkowy etap elucji 20 ml buforu Q5 (Q1 + 250 mM imidazol), zbierając frakcje po 1 ml. Następnie frakcje analizowałam pod kątem zawartości białka metodą SDS-PAGE, łącząc później te o największej zawartości białka i zagęszczając je przez wirowanie (4000 g, Sigma, rotor 11192, 4°C) w probówce Centriprep 50k (Milipore).

Probówka ta zawierała filtr zatrzymujący cząstki o masie większej niż 50 kDa, czyli mtHsp70 (~70 kDa). Zagęszczony preparat (~7 ml) dializowałem wobec litra buforu Q6 (20 mM HEPES-KOH pH 8,0; 100 mM KCl; 10% (v/v) glicerol; 5 mM  $\beta$ -merkaptobetanol), wymieniając bufor trzykrotnie co godzinę. Uzyskany preparat białka mtHsp70 porcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -70°C.

#### 7.6.14 Sc Mge1<sub>his</sub>

Bakterie *E.coli* BL21(DE3) niosące plazmid pET21dScMge1 kodujący białko Sc Mge1-His<sub>8</sub> zaszczerpiłam do pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100  $\mu$ g/ml) i hodowałam komórki przez noc w temperaturze 37 °C. Następnie nocna hodowla została odmłodzona do OD<sub>600</sub>=0,1 w 6 litrach pożywki LB uzupełnionej ampicyliną do stężenia 100  $\mu$ g/ml. Komórki hodowane były do momentu osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0,6 i wtedy indukowałam nadprodukcję białka Mge1 poprzez dodanie do hodowli IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Hodowla była prowadzona przez 3 h w 37°C. Następnie hodowlę zwirowałam (4620 g /10 minut/4°C / rotor JLA-10.500 Beckman Coulter), w ten sposób otrzymałam ok. 20 g osadu, który podzieliłam na dwie porcje i każdą z nich zawiesiłam w około 30 ml buforu S (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 150 M NaCl). Zawieszone w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie, wykorzystując prasę Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam (1 godzina/4°C/25 000 obr./min. / rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę z 2 ml złoża Ni-NTA (Novagen (EMD Millipore Corp.)Billerica, MA, USA) zrównoważonego buforem S. Po etapie nakładania przepłukałam złożę buforem S, a w następnej kolejności wyeluowałam związane białko ze złoża, stosując liniowy gradient imidazolu (10-250 mM) w buforze S. Frakcje zawierające czysty preparat białka Mge1 zostały zebrane, połączone i zagęszczone przy użyciu filtrów (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Merck Millipore, Tullagreen, Cork, Ireland, 10 kDa). Uzyskany preparat dializowałam wobec buforu SZ (50mM Tris pH 7.4, 10% glicerol, 25mM NaCl), a następnie rozporcjowałam i przechowywałam w -70 °C do momentu użycia.

#### 7.6.15 Ulp1

Do zaszczerpienia nocnej hodowli wykorzystałam konserwę bakteryjną *E.coli* zawierającą plazmid pET z wklonowanym genem proteazy Ulp1SUMO, którą otrzymałam dzięki uprzejmości Dr Małgorzaty Ropelewskiej z Zakładu Biologii Molekularnej. Do 200 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem kanamycyny dodałam zawiesinę bakteryjną i inkubowałam w 37°C łaźni wodnej z wytrząsaniem (140 obr./min). Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 2 l płynnej pożywki LB do OD<sub>600</sub>=0,1 i inkubowałam w 30°C w wytrząsarce powietrznej (160rpm) do uzyskania OD<sub>600</sub>=0,6. Wówczas indukowałam produkcję białka poprzez dodanie IPTG do stężenia końcowego 1mM. Nadprodukcję prowadziłam przez 3h. Po tym czasie hodowlę zwirowałam (4620 g/ 7 minut/4°C /rotor JLA-10.500 Beckman Coulter) i otrzymałam ok. 10 g bakterii, które podzieliłam na dwie porcje i zawiesiłam w buforze ST (50mM NaPi pH 8,0; 300mM NaCl; 0,05% Triton X-100), stosując 3ml buforu/1g bakterii. Tak zawieszona w buforze komórki poddałam trzykrotnie lizie, stosując prasę Frencha (ciśnienie 1500 psi) i zwirowałam (30min/4°C/75600 g / rotor JA 30.50 Beckman Coulter). W ten sposób uzyskałam supernatant gotowy do nałożenia na kolumnę ze złożem Ni-NTA. Supernatant nakładałam trzykrotnie grawitacyjnie na kolumnę zrównoważoną buforem ST

(50mM NaPi pH 8,0; 300mM NaCl;; 0,05% Triton X-100). Następnie złoże płukałam odpowiednio następującymi buforami

-50 ml T1(50 mM NaPi 8.0, 300 mM NaCl, , 0,05% Triton X-100, 10% glicerol, 10 mM imidazol),

-50 ml T2(50 mM NaPi 8.0, 300 mM NaCl, , 0,05% Triton X-100, 10% glicerol, 20 mM imidazol),

-50 ml T3(50 mM NaPi 8.0, 300 mM NaCl, , 0,05% Triton X-100, 10% glicerol, 40 mM imidazol).

Białko ze złoża eluowałam 5 ml buforu TE (50 mM NaPi 8.0, 300 mM NaCl, , 0,05% Triton X-100, 10% glicerol, 250 mM imidazol) i zbierałam frakcje po 0,5 ml.

Frakcje zawierające białko Ulp w największym stężeniu połączyłam i dializowałam wobec 3 l buforu T4 (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 500 uM DTT; 1% IGEPAL NP-40;; 250 mM NaCl; 50% glicerol) ze zmianą buforu co 45 min (1/45min). Po dializie gotowy preparat białkowy porcjaowałam, mroziłam w ciekłym azocie i następnie przechowywałam w-70<sup>0</sup>C do czasu dalszych analiz.

#### 7.6.15.1 Trawienie proteazą Ulp1

Białko z ogonem SUMO inkubowałam w chłodni przez 1,5 h używając do tego miksera z rotacją. Po tym czasie do próbki dodawałam złoże Ni-NTA zrównoważone w buforze U(25 mM Tris pH 8.0; 150 mM NaCl; 10 % glicerol; 1 mM PMSF). Po 1,5 h inkubacji wirowałam próbkę (75600 g; 2 min; Sigma; rotor 12134) i pobierałam roztwór białka znad osadu ze złoża.

#### 7.6.16 GST

Bakterie *E. coli* C41(DE3) nosące plazmid pGEX-KG, kodujące białko GST, zaszczerpiłam do 400 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 mg/l) i hodowałam przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem (180 obr./min.) w 37°C. Następnego dnia do wyjałowionych dużych kolb szklanych zawierających 1 litr pożywki LB (ang. *Lysogeny Broth*) z ampicyliną, dodałam część hodowli nocnej tak, aby finalnie osiągnąć gęstość optyczną hodowli OD<sub>600</sub>=0,1. Całość inkubowałam w cieplarni powietrznej z wytrząsaniem (180 obr./min.) w temp. 30°C, aż do osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0,6, po czym indukowałam nadprodukcję białka przez dodanie IPTG (izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd) do stężenia końcowego 1 mM. Po 4 godzinach hodowlę zwirowałam (15°C, 4620 g, 10 min, Beckman Coulter, rotor JLA-10.500), a każde uzyskane 10 g osadu zawiesiłam w 30 ml buforu L1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 1 mM DTT (ditiotretol); 10% (v/v) glicerol, 0.05% (v/v) Triton X-100) z dodatkiem 1 mM PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu) i zamrażałam w ciekłym azocie. Następnie bakterie rozmrażałam w litrowej zlewce wypełnionej wodą i lodem, po czym lizowałam 2-krotnie z użyciem prasy Frencha przy ciśnieniu 1000 psi. Lizat wirowałam przez godzinę przy 75600 g w temp. 4°C (Beckman Coulter, rotor JA-30.50). Uzyskany supernatant zawierał dużą ilość nadprodukowanego białka GST, dlatego dalszą procedurę oczyszczania wykonywałam dwukrotnie, za każdym razem stosując tylko połowę objętości supernatantu. Roztwór białek nałożyłam 2-krotnie na kolumnę zawierającą 1 ml złoża agarozowego opłaszczanego zredukowanym glutationem (Fluka), zrównoważonego 25 ml buforu L1. Następnie złoże płukałam kolejno: 100 ml buforu L1, oraz 10 ml buforu L3 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 1 mM DTT; 10% (v/v) glicerol, 0.05% (v/v) Triton X-100, 10 mM

MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP) i ponownie 10 ml buforu L1. Białko eluowałam ze złoża 10 ml buforu L1 z dodatkiem 50 mM zredukowanego glutationu (pH 7,0), zbierając 1 ml frakcje. Na błonę nitrocelulozową nakładałam 2 ul każdej próbki i zanurzałam w czerni amidowej aby ocenić, czy białko znajduje się w próbce. Aby ocenić jakość oczyszczania, przygotowałam próbki z frakcji zawierających białko w buforze Laemmli i analizowałam metodą SDS-PAGE. Frakcje zawierające fragment GST w największej ilości połączyłam i dializowałam wobec 1 litra buforu E (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 10% (v/v) glicerol), który wymieniałam trzykrotnie w godzinnych odstępach czasu. Otrzymany preparat oczyszczonego białka dzieliłam na 50 µl porcje, które zamroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -70°C

## 7.8 Oznaczanie stężenia oczyszczonych białek

Na ostatnim etapie oczyszczania poszczególnych białek, przed porcjowaniem i zamrażaniem preparatu, pobierałam po 2 µl każdego z nich i nanosiłam na błonę nitrocelulozową, którą następnie barwiłam w roztworze czerni amidowej (0,1% (w/v) czerni amidowa; 25% (v/v) izopropanol; 10% (v/v) kwas octowy). Na podstawie intensywności uzyskanego sygnału przygotowywałam rozcieńczenia próbki w dwukrotnie stężonym buforze Laemmli, które inkubowałam w 100°C przez 5 minut. Z tak przygotowanych próbek pobierałam i nanosiłam na żel kolejno 2 µl, 4 µl i 6 µl, oraz do kolejnych ścieżek nanosiłam 1 µg, 2 µg, 3 µg i 4 µg białka BSA przygotowanego w dwukrotnie stężonym buforze Laemmli. Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego (SDS-PAGE) żel poliakrylamidowy barwiłam w Coomassie Brilliant Blue, a następnie skanowałam i przeprowadzałam analizę densytometryczną, wykorzystując oprogramowanie ImageJ. Wartości sygnału otrzymane dla prążków 1-4 µg BSA wykorzystywałam do przygotowania krzywej wzorcowej, wobec której szacowałam stężenie uzyskanych preparatów białkowych..

## 7.9 Dichroizm kołowy

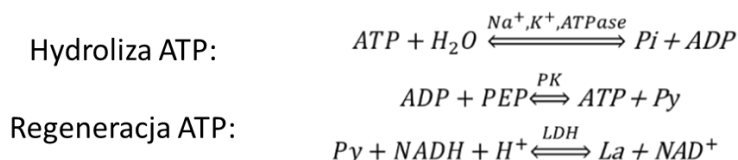
Pomiary widm dichroizmu kołowego wykonałam z wykorzystaniem spektrometru Jasco J-1500 CD w zakresie od 197 do 260 nm co 1 nm w temperaturze 20°C. Stężenie białka podczas pomiaru wynosiło 5 µM dla HscB, HscA i Hsc20 oraz 2,5 µM dla Ssq1. Pomiary przeprowadziłam w buforze CD (20 mM fosforan potasu pH 8,0, 80 mM KCl) w kwarcowej kuwecie o długości drogi optycznej 1 mm. Uzyskane widma białek wyrażone w milistopniach (mdeg), skorygowałam o wpływ buforu i następnie przedstawiłam jako wartości eliptyczności molowej na resztę aminokwasową  $[\Theta]$  (deg\*cm<sup>2</sup>/dmol). Temperatury topnienia (T<sub>M</sub>) białek zmierzyłam przy długość fali 220 nm dla HscB, 218,4 nm dla HscA, 222,7 nm dla Hsc20 i 220,4 nm dla Ssq1. Zastosowane długości fali odpowiadają w każdym przypadku obserwowanym szczytom na uzyskanym widmie CD dla określonego białka. Zmiany sygnału CD w funkcji temperatury zarejestrowałam jako zmiany w milistopniach (mdeg) wraz ze wzrostem temperatury od 20 do 85°C z szybkością 0,5°C/min. Uzyskane dane analizowałam w oparciu o oprogramowanie Spectra Manager ver. 2, JASCO w celu wyznaczenia wartości T<sub>M</sub> dla każdego z badanych białek.

## 7.10 Pomiar aktywności ATPazowej białek Hsp70 z wykorzystaniem [ $\gamma$ -P33]ATP

Aktywność ATPazy białek Hsp70 mierzono według procedury opisanej w literaturze [23]. W doświadczeniach, w których było miareczkowane białko J mieszanina reakcyjna zawierała 0,5  $\mu$ M HscA, 10  $\mu$ M IscU oraz HscB we wskazanych stężeniach lub z 0,5  $\mu$ M Ssq1, 10  $\mu$ M Isu1, 0,5  $\mu$ M Mge1 oraz Hsc20 we wskazanych stężeniach w buforze A (40 mM kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1- piperazynoetanosulfonowy (HEPES–KOH), pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM ditiotreitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> i 10% (v/v) glicerol). Reakcje (15  $\mu$ l) były inicjowane przez dodanie ATP z dodatkiem [ $\gamma$ -P33]ATP (2  $\mu$ Ci, 2200 Ci/mmol, HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, Niemcy) do końcowego stężenia 120  $\mu$ M. Następnie inkubowałam mieszaninę reakcyjną w 25°C, a reakcję zatrzymywałam po 15 min przez dodanie 100  $\mu$ l roztworu 1 M kwasu nadchlorowego i 1 mM fosforanu sodu. Po dodaniu 400  $\mu$ l 20 mM molibdenianu amonu i 400  $\mu$ l octanu izopropylu, próbki mieszałam, a w następnej kolejności prowadziłam rozdział fazy nieorganicznej i organicznej przez krótkie wirowanie. Po wirowaniu pobrałam 150  $\mu$ l górnej fazy zawierającej radioaktywny kompleks ortofosforanowo-molibdenianowy i dodałam do 4 ml płynu scyntylicyjnego. W ten sposób przygotowane próby były mierzone w liczniku scyntylicyjnym firmy Beckman LS 6000TA. Reakcje kontrolne pozbawione białka zostały uwzględnione we wszystkich eksperymentach. Wartości hydrolizy ATP uzyskane w wyników pomiarów zostały dopasowane do przebiegu równania Michaelisa-Mentena przy zastosowaniu oprogramowania GraphPad Prism 7 (wersja 7.02, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 7.11 Pomiar aktywności ATPazy białek Hsp70 z użyciem systemu sprzężonych enzymów LDH/PK

Pomiar podstawowej aktywności ATPazowej białek Hsp70 – HscA i Ssq1 z zastosowaniem systemu sprzężonych enzymów LDH (dehydrogenaza mleczanowa) /PK (kinaza pirogronianowa) przeprowadzono według opisanej wcześniej metody (188).



JG Nørby, *Methods in Enzymology* 1988

Aby określić powinowactwo białek Hsp70 - HscA i Ssq1 wobec ATP, przygotowałam dwie mieszaniny reakcyjne. Pierwsza zawierała 1  $\mu$ M HscA lub 2,5  $\mu$ M Ssq1 i 2,5  $\mu$ M Mge1 w buforze CA (50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 150 mM KCl, 20 mM octan magnezu, 1 mM ditiotreitol), natomiast druga mieszanina reakcyjna zawierała 0,265 mM NADH, 100 U/ml dehydrogenazy mleczanowej (LDH), 70 U/ml kinazy pirogronianowej (PK), 2,8 mM fosfoenolopirogronian (PEP) oraz ATP o określonym stężeniu w buforze CA. Reakcje były inicjowane przez dodanie mieszaniny z ATP do mieszaniny reakcyjnej zawierającej białka Hsp70.

W trakcie pomiaru powstający w wyniku hydrolizy ADP był przekształcany ponownie do ATP przez kinazę pirogronianową, która dostarcza grupę fosforanową z fosfoenolopirogronianu. Jednocześnie dochodziło do przekształcenia fosfoenolopirogronianu w pirogronian, który stanowi substrat dla dehydrogenazy mleczanowej. Enzym ten przeprowadza reakcję redukcji pirogronianu w mleczan i podczas tego procesu następuje utlenienie NADH do NAD<sup>+</sup>. Tak więc po zainicjowaniu reakcji poprzez dodanie ATP w

następnej kolejności wykonywałam pomiar zmian absorbancji NADH przy 340 nm przez 500 s w 23° C . Do pomiarów wykorzystywałam spektrofotometr JASCO V-660 UV-Vis.

### **7.12 Pomiar aktywności ATPazowej białek Hsp70 z wykorzystaniem zestawu EnzChek Phosphate Assay Kit firmy Molecular Probes**

Aktywność ATPazy HscA lub Ssq1 (0,5  $\mu$ M) w obecności lub przy braku nadmiaru IscU/CtIsu1 (50  $\mu$ M) i HscB/Hsc20 (50  $\mu$ M) mierzyłam w 23 °C, wykorzystując komercyjny zestaw EnzChek Phosphate Assay Kit firmy Molecular Probes. Pomiar polegał na monitorowaniu ilości uwalnianego fosforanu w teście enzymatycznym [50] przy użyciu spektrofotometru JASCO V-660 UV-Vis. W przypadku mieszanin reakcyjnych zawierających białko eukariotyczne Ssq1, dodawałam również białko Mge1 (0,5  $\mu$ M). Pomiar aktywności w tym doświadczeniu wykonywałam w buforze HKM (50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditiotritol) w obecności 1 mM ATP. Przygotowane reakcje o objętości 500  $\mu$ l zawierały bufor, białka o wskazanym stężeniu, odczynnik 100 mM MESG (rybozyd 2-amino-6-merkapt-7-metylopuryna). Reakcja była inicjowana poprzez dodanie do reakcji 0,5 U PNP (fosforylasy nukleozydów purynowych). W obecności nieorganicznego fosforanu substrat MESG (rybozyd 2-amino-6-merkapt-7-metylopuryny) jest przekształcany przez enzym - fosforylazę nukleozydów purynowych (PNP) do rybozy-1-fosforanu 2-amino-6-merkapt-7-metylopuryny. Ta enzymatyczna zmiana substratu MESG skutkuje zmianą długości fali przy, której ma miejsce maksymalna absorbancja mieszaniny reakcyjnej z 330 nm (maksimum absorpcji substratu MESG) do 360 nm (maksimum absorpcji produktu). Mieszanina reakcyjna z białkami po dodanie do reakcji odczynnika PNP inkubowana była przez 10 min w 22°C . Następnie pomiar przeprowadzony był przy długości fali 360 nm w czasie 8 min po dodaniu ATP do reakcji.

### **7.13 Precypitacja kompleksów białkowych (*ang. pull-down*)**

#### **7.13.1 Przygotowanie złoza agarozowego opłaszczonego zredukowanym glutationem**

Złoże przygotowywałam w plastikowej próbówce o objętości 50 ml, do której dodawałam 210 mg (70 mg/1ml złoza) sproszkowanego złoza agarozowego opłaszczonego zredukowanym glutationem i zawieszałam w buforze PD (40 mM HEPES-KOH pH 7,5; 5% (v/v) glicerol; 100 mM KCl; 1 mM DTT (ditiotritol); 10 mM MgCl<sub>2</sub>) i inkubowałam z rotacją w 4°C przez noc. Następnego dnia złoże wirowałam (1000 g; 4°C; 5 min; Sigma rotor 11192), usuwałam supernatant znad złoza, a następnie 3 krotnie płukałam złoże buforem PD (12ml). Po każdym płukaniu złoże wirowałam i odciągałam supernatant. Następnie osad przenosiłam do plastikowej próbówki o objętości 15 ml i dopełniałam do 15 ml buforem PD uzupełnionym o 0,1% (v/v) roztwór Tritonu X-100. Tak zawieszona złoże inkubowałam z rotacją w temperaturze 4°C przez 2,5 godziny, po czym trzykrotnie płukałam złoże buforem PD. Powstały osad ze złoza dopełniałam buforem PD uzupełnionym o 0,1% (w/v) roztwór białka BSA (*Bovine Serum Albumin*) i inkubowałam z rotacją przez 2,5 godziny w temperaturze 4°C. Po inkubacji złoże wirowałam i płukałam 3 krotnie buforem PD. Na noc osad zawieszałam w

5 ml świeżego buforu PD i inkubowałam w 4°C. Następnego dnia złoże wirowałam (1000 g; 4°C; 5 min; Sigma rotor 11192), po czym usunęłam supernatant i zawieszałam złoże w świeżym w buforze PD w stosunku objętościowym 1:1. Tak przygotowane złoże przechowywałam w lodówce, a przed każdym doświadczeniem płukałam je trzykrotnie świeżym buforem PD.

### 7.13.2 Procedura precypitacji kompleksów białkowych (ang pull-down)

Reakcję przygotowywałam w 0,5 ml probówkach typu eppendorf, w których umieszczałam 75µl buforu PD (40 mM HEPES-KOH pH 7,5; 5% (v/v) glicerol; 100 mM KCl; 1 mM DTT (ditiotreitól); 10 mM MgCl<sub>2</sub>) oraz analizowane białka. Finalna objętość mieszaniny wynosiła 150 µl. W reakcjach podstawowych białkiem wiążącym się do złoża było białko Isu1-GST lub IscU-GST. W próbach kontrolnych było to białko GST. Do przygotowanych reakcji dodawałam ATP do końcowego stężenia 3 mM i inkubowałam w termobloku przez 15-30 min w 25 lub 30°C (w zależności od reakcji). Po inkubacji z każdej reakcji pobierałam 5% reakcji w celu kontroli ilościowej reakcji na żelu poliakrylamidowym, a następnie do pozostałej objętości dodawałam 40 µl zawiesiny złoża agarozowego opłaszczanego zredukowanym glutationem. Następnie próbki inkubowałam z rotacją w 4 °C lub w temperaturze pokojowej, a po 1 h wirowałam (4°C; 1000g; 2 min.; Sigma, rotor 12148). W następnej kolejności wykorzystując pompę próżniową, ostrożnie usuwałam supernatant znad złoża i dodawałam 500 µl buforu PD. Probki energicznie mieszałam po czym znowu wirowałam (4°C; 1000g; 2 min.; Sigma, rotor 12148) i po odciążeniu buforu znad złoża dodawałam świeżego buforu PD. Tę czynność powtarzałam trzykrotnie, aby pozbyć się niespecyficznie związanych białek ze złożem. Po ostatnim powtórzeniu, po odciążeniu supernatantu, 20 µl osadzonego złoża zawieszałam w 20 µl buforu Laemmli i inkubowałam w 100°C przez 10 minut. Tak przygotowane próbki wirowałam (14000 obr./min.; 30 s; Sigma; rotor 12134), po czym pobierałam 15 µl każdej z nich i analizowałam ich skład metodą SDS-PAGE.

### 7.14 Analizy ewolucyjne

Zostały wykonane przez mgr Milenę Stolarską, doktorantkę Zakładu Biochemii Ewolucyjnej.

Sekwencje aminokwasowe ortologów eukariotycznych mitochondrialnych białek Hsp70 (mtHsp70), DnaK i HscA oraz cytozolowego Hsp70 – Ssa1 zostały pobrane z bazy danych OMA. Następnie sekwencje zostały zestawione przy użyciu Clustal Omega przy zastosowaniu domyślnych parametrów. Zestawienie sekwencji zostało następnie przekształcone w Ukryty Model Markova (ang. Hidden Markov Models) przy użyciu programu hmmbuild z pakietu HAMMER. Dla każdej z pozycji zestawienia obliczone zostało prawdopodobieństwo *a posteriori*, określające poziom pewności dla każdej pozycji każdej sekwencji. Pozycje o średnim prawdopodobieństwie poniżej 0,7 zostały usunięte z zestawienia wykorzystanego w dalszej analizie filogenetycznej. Przy użyciu programu IQ-tree przeprowadzono 1000 przeszukań, stosując metodę maksymalnej wiarygodności oraz 1000 powtórzeń *bootstrap*, stosując model substytucji aminokwasów LG oraz model ewolucji GAMMA z czterema kategoriami tempa zmienności oraz pozycjami niezmiennymi (LG + I + G), który został wyznaczony jako model najlepiej pasujący do danych.



Z bazy danych Uniprot pobrane zostały proteomy 339 zwierząt, 661 grzybów, 113 roślin oraz 38 protistów. Żeby poznać dystrybucję filogenetyczną białek HscA i HscB ortologi 1 do 1 każdego z białek zostały pobrane z bazy danych OMA i zestawione przy użyciu programu Clustal Omega przy domyślnych parametrach. Oba zestawienia sekwencji zostały następnie przekształcone w Ukryte Modele Markowa (ang. Hidden Markov Models) przy użyciu programu hmmbuild z pakietu HAMMER. Proteomy zostały przeszukane przygotowanymi modelami przy użyciu programu hmmsearch.

Następnie sekwencje rozpoznane jako potencjalne ortologi HscA zostały, w celu dalszej weryfikacji, zestawione z referencyjnymi sekwencjami Hsp70 oraz dodane do drzewa filogenetycznego przedstawionego na rycinie 27 przy użyciu algorytmu ulokowania opartego na funkcji wiarygodności (ang. *likelihood-based placement algorithm*) z programu RaxML. Sekwencje, które na drzewie zostały umieszczone w kładzie HscA zostały uznane za wyniki pozytywne, natomiast te, które grupowały się poza kładem HscA zostały uznane za wyniki fałszywie pozytywne. Sekwencje te zostały zweryfikowane także za pomocą zwrotnego BLAST do proteomu *E. coli*.

### **7.15 Rekonstrukcja centrum FeS w obrębie molekularnego rusztowania, białka Isu1/IscU w obecności DTT**

Procedura została przeprowadzona w komorze beztlenowej firmy COY wypełnionej mieszaniną gazów 95% N<sub>2</sub> oraz 5% H<sub>2</sub>. Białka (IscU/Isu1, CyaY/Yfh1, IscS/Nfs1(Isd11)), inkubowane były przez noc w komorze beztlenowej w celu usunięcia tlenu z próbek. W postaci proszku zostały również wprowadzone do komory odczynniki: cytrynian amonu żelaza III (FAC, ang. *ferric ammonium citrate*), kwas L-askorbinowy, L-cysteina, ditiotreitol (DTT). Bufor reakcyjny (2x stężony) składał się z 50 mM Tris pH 8.0, 350 mM KCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glicerol, 0,1% Triton X-100. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 400 µl i zawierała ona dodatkowo:

- 300 µM cytrynian amonu żelaza III (FAC)
- 1 mM kwas L-askorbinowy
- 5 mM DTT
- 500 µM L-cysteina

oraz białka o stężeniu: 100 µM IscU/Isu1, 5 µM IscS/Nfs1(Isd11), 5 µM CyaY/Yfh1

Reakcję rekonstrukcji centrum FeS w obrębie IscU/Isu inicjowałam poprzez nastrzyk desulfurazą cysteinową po minucie od przygotowania mieszaniny reakcyjnej. Syntezę centrum FeS obserwowałam poprzez monitorowanie zmiany widma CD w zakresie 300-700 nm, wykorzystując podczas pomiarów kuwetę o długości drogi optycznej 10 mm

## **7.16 Reakcja rekonstrukcji biosyntezy centrów FeS w obrębie IscU w oparciu o oczyszczony zestaw białek maszynerii ISC**

### **7.16.1 Usuwanie cynku z IscU**

W celu usunięcia jonu cynku z oczyszczonego białka IscU próbka zawierająca IscU inkubowana była z roztworem DTPA(kwas pentetynowy) o stężeniu 163 mM oraz z DTT (ditiotretiol) o stężeniu 1M. Po 1,5 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej próbka była nakładana na kolumnę Hi trap 16/60 Superdex75, która była zrównoważona buforem T(20 mM Tris pH8.0, 250 mM NaCl, 10 mM DTT). Po zebraniu frakcji zagęściłam je do 500 ul, umieściłam w namiocie beztlenowym i nałożyłam na kolumnę P5, aby pozbyć się DTT z próbki. Zebrany 1 ml próbki zagęściłam do około 300 ul i dodałam glicerol do końcowego stężenia 70%. Stężenie białka mierzyłam spektrofotometrycznie i białko przygotowane w ten sposób było gotowe do użycia w kolejnych doświadczeniach.

### **7.16.2 Fe-IscU**

W celu przygotowania Fe-IscU, na wstępie usuwałam jon cynku przez inkubację Zn-ISCU z DTPA (zgodnie z metodą opisaną w pkt 7.8.1), a następnie w celu usunięcia nadmiaru DTPA próbka została nałożona na kolumnę Hi trap 16/60 Superdex 75. Następnie w ten sposób przygotowane białko apoIscU (100  $\mu$ M) inkubowałam z siarczanem amonu żelaza (10  $\mu$ M). W tym celu na kropelkę zawierającą roztwór żelaza, dodawałam białko IscU i delikatnie mieszałam, po czym na kolejnym etapie dodawałam bufor R(20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl) do objętości 100  $\mu$ l. Reakcje, których celem było uzyskanie preparatu Fe-IscU przeprowadzałam w komorze beztlenowej Jacomex ( $O_2 < 2$ ppm) w temperaturze pokojowej. W celu sprawdzenia, czy uzyskałam białko Fe-IscU przeprowadzałam pomiar widm dichroizmu kołowego w zakresie 250-500 nm wykorzystując podczas pomiarów kuwetę o długości drogi optycznej 10 mm.

### **7.16.3 Rekonstytucja centrów FeS w obrębie bakteryjnego białka IscU**

Syntezę centrów FeS w obrębie bakteryjnego białka IscU przeprowadziłam w warunkach beztlenowych. Mieszanina reakcyjna zawierała  $Fe^{2+}$  (Siarczan Amonu żelaza (II), sól Mohra) (100  $\mu$ M) oraz IscU (100  $\mu$ M), IscS (10  $\mu$ M), Fdx/FdxR (5  $\mu$ M) i NADPH (200  $\mu$ M) w buforze P (50 mM NaPi pH 8,0, 150 mM NaCl). Mieszaninę przeniosłam do szczelnie zamkniętej kuwety o długości drogi optycznej 10 mm i reakcję inicjowałam L-cysteiną (100  $\mu$ M) wprowadzoną gazoszczelną strzykawką firmy Hamilton. Widma absorpcji uzyskałam w oparciu o pomiary przeprowadzone na spektrometrze Secomam UVIKON XL natomiast pomiary widma CD przeprowadziłam wykorzystując spektrometr Jasco J-815. Kinetykę reakcji monitorowałam wykorzystując spektrofotometr UV-Vis przy długości fali 456 nm.

### **7.16.4 Przygotowanie białka Fdx w formie apo**

1. Białko Fdx w formie apo przygotowywałam według opublikowanej procedury (245) Na wstępie inkubowałam białko Fdx (2,5 mg/ml) w komorze beztlenowej w łaźni lodowej przez noc w celu usunięcia tlenu z próbek.
2. Do 650  $\mu$ l białka dodałam odpowiednio 25  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu (14,3 M) i uzupełniłam wodą do objętości 1 ml.

3. Następnie inkubowałam próbki na lodzie przez 5 min i dodawałam stężony HCl do końcowego stężenia 0,5M w mieszaninie reakcyjnej i ponownie inkubowałam na lodzie przez kolejne 5 min do momentu precypitacji białka.
4. Po uzyskaniu precypitatów wirowałam próbki przez 10 min 12,000 g w 4°C. Po wirowaniu usunęłam supernatant i płukałam próbki, dodając 500 µl wody z dodatkiem 0,1% β-merkaptotolanu i wirując próbki.
5. Po usunięciu wody do każdej z prób dodałam 250 µl buforu (50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,3), następnie delikatnie wymieszałam i inkubowałam próbki na lodzie przez 10-15 min do momentu rozpuszczenia białka. Jeśli było to potrzebne dodawałam po 1 µl 1M Tris do uzyskania klarownego roztworu.

### **7.16.5 Przygotowanie białka GrxD w formie apo**

Białko GrxD w formie apo przygotowałam według opublikowanej procedury (246). Na wstępie białko inkubowałam ze 100 mM ditiotretiolem (DTT) i 100 mM kwasem wersenowym (EDTA) w 4 °C przez 2h . Następnie mieszaninę nakładałam na kolumnę Hi trap 16/600 Superdex 75 zrównoważonej buforem T (20 mM Tris pH8.0, 250 mM NaCl, 10 mM DTT), aby zmienić bufor i pozbyć się zredukowanych jonów metali. Przeprowadzony rozdział pozwolił na uzyskanie białka GrxD w formie apo. Zebrane próbki zagęściłam do objętości 500 µl i następnie w celu usunięcia DTT z próbki użyłam kolumny P5, na którą nałożyłam zagęszczone białko w komorze beztlenowej. Zebrany 1 ml białka zagęściłam do około 300 µl i dodałam glicerol do końcowego stężenia 70%.

### **7.16.6 Pomiar transferu centrum FeS z IscU do białka apo Fdx**

#### **7.16.6.1 W obecności białka GrxD**

Aby zbadać wpływ białka GrxD na transfer centrum Fe-S z holo IscU do białka apo Fdx przygotowałam mieszaninę reakcyjną, która obejmowała: 10 µM IscU, 2 µM IscS, 60 µM apo Fdx oraz 20 µM apo GrxD w buforze R o następującym składzie 50 mM HEPES-KOH pH 7.5; 150 mM KCl ;10 mM MgCl<sub>2</sub>. Ponadto stężenia pozostałych komponentów reakcji były następujące: 400 µM cytrynianu amonu żelaza III ; 100 µM askorbinian sodu ; 100 µM L-cysteina ; 10 mM GSH. W celu detekcji transferu centrum Fe-S z IscU do Fdx wykonałam pomiary dichroizmu kołowego (CD), rejestrując widmo w zakresie widzialnym (300 nm- 700 nm). Zapis widm rozpocząłam zaraz po starcie reakcji poprzez nastryk L-cysteiną i wykonywałam je cyklicznie przez 4 godziny (0,12,30,60,120,180,240 min), tak by obserwować proces tworzenia się charakterystycznego widma dla holo Fdx. W doświadczeniach kontrolnych mieszanina reakcyjna nie zawierała białek IscU oraz GrxD lub było pominięte tylko białko GrxD.

### 7.16.6.2 W obecności białek opiekuńczych HscA/HscB

W celu zbadania wpływu białek opiekuńczych HscA/HscB na proces transferu centrum Fe-S z IscU do apo Fdx do reakcji obejmującej 10  $\mu\text{M}$  IscU, 2  $\mu\text{M}$  IscS, 80  $\mu\text{M}$  apo Fdx dodawałam białka opiekuńcze - 4  $\mu\text{M}$  HscA i 4  $\mu\text{M}$  HscB wraz z 1mM ATP. Ponadto mieszanina reakcyjna zawierała źródło żelaza w postaci 400  $\mu\text{M}$  cytrynianu amonu żelaza III (*ang. Ferric Ammonium Citrate*), 100  $\mu\text{M}$  askorbinian sodu, 100  $\mu\text{M}$  L-cysteina oraz 10 mM zredukowany glutation GSH, który w tym przypadku pełnił funkcję czynnika redukującego. Bufor reakcyjny obejmował 50 mM HEPES-KOH pH7.5, 150 mM KCl oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . W celu detekcji centrum Fe-S w obrębie Fdx wykorzystywałam spektroskopię dichroizmu kołowego, rejestrując widma w zakresie widzialnym (od 300 nm do 700 nm). Zapis widm rozpoczęłam zaraz po starcie reakcji zainicjowanej poprzez nastrzyk L-cysteiny i wykonywałam je cyklicznie przez 5 godzin i po inkubacji mieszaniny reakcyjnej przez noc (O/N) (0min, 300min, O/N), tak by obserwować proces rekonstrukcji centrum w obrębie Fdx.

### 7.17 Pomiar transferu centrum FeS z IscU do białka apo GrxD

Reakcja była przygotowana w buforze R (50 mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM KCl 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) i obejmowała białka systemu ISC : 50 $\mu\text{M}$  IscU, 5  $\mu\text{M}$  IscS, 100  $\mu\text{M}$  apoGrxD, 4  $\mu\text{M}$  /4  $\mu\text{M}$  HscA/HscB oraz 5  $\mu\text{M}$  Fdx/FdxR. Ponadto mieszanina reakcyjna zawierała żelazo  $\text{Fe}^{2+}$  (Siarczan Amonu żelaza (II), sól Mohra )50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  L-cysteina oraz 1 mM ATP, natomiast źródło elektronów stanowiło NADPH. Pierwszym etapem reakcji było zainicjowanie syntezy centrum Fe-S w obrębie białka IscU, które pełniło funkcję molekularnego rusztowania, pomiar CD został wykonany zaraz po nastrzyku L-cysteiny inicjującym reakcję. Następnie do reakcji dodałam (poprzez nastrzyk) białko akceptorowe – 100  $\mu\text{M}$  GrxD w formie apo oraz system białek opiekuńczych HscA/HscB. Pomiar trwał 6 minut.

Następnie aby zbadać kinetykę tej reakcji przeprowadziłam pomiar zmiany sygnału dichroizmu kołowego przy długości fali 556nm. Przyrost sygnału przy tej długości fali świadczył o formowaniu białka holo GrxD. Doświadczenia zostały przeprowadzone w buforze RI (50 mM Tris pH 8.0; 150 mM KCl ;10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), w którym dodatkowo były obecne 1 mM ATP, 25  $\mu\text{M}$  L-cysteina, 100  $\mu\text{M}$  NADPH, 50  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  (Siarczan Amonu żelaza (II), sól Mohra). Stężenia białek w reakcji: 50 $\mu\text{M}$  IscU, 5  $\mu\text{M}$  IscS, 5  $\mu\text{M}$  Fdx/FdxR, 100  $\mu\text{M}$ , apoGrxD, 4/4  $\mu\text{M}$  HscA/HscB. Pomiary przeprowadzałam, wykorzystując spektrometr CD Jasco J-815, w kuwecie pomiarowej o długości drogi optycznej 10mm.

## 8. Bibliografia

1. **Beinert H., Holm R.H., Münck E.** Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*. 1997, 277, strony 653–659.
2. **Rees D.C.** Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* 71. 2002.
3. **Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S., Mulder D.W., Shepard E.M., Broderick J.B.,** [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2015, 1853, strony 1350–1369.
4. **Hu Y., Ribbe M.W.** Biosynthesis of the metalloclusters of nitrogenases. *Annu. Rev. Biochem.* 2016, 85, strony 455–483.
5. **Buren S., Jimenez-Vicente E., Echavarri-Erasun C., Rubio L.M.** Biosynthesis of nitrogenase cofactors. *Chem. Rev.* 2020, 120, strony 4921–4968.
6. **Stehling O., Lill, R.** The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2013, 5.
7. **Lill R Mühlenhoff U.** Maturation of iron–sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem.* 2008, 77, strony 669–700.
8. **Lill R Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U.** The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012, 182, strony 1491–1508.
9. **Andreini C., Rosato A., Banci L.** The relationship between environmental dioxygen and iron-sulfur proteins explored at the genome level. *PLoS One*. 2017, 12, e0171279.
10. **Zheng L., White R.H., Cash V.L., Jack R.F., Dean D.R.** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, strony 2754–2758.
11. **Agar J.N., Zheng L., Cash V.L., Dean D.R., Johnson M.K.** Role of the IscU protein in iron-sulfur cluster biosynthesis: IscS-mediated assembly of a [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster in IscU. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, strony 2136–2137.
12. **Yuvaniyama P., Agar J.N., Cash V.L., Johnson M.K., Dean D.R.** NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, strony 599–604.
13. **Johnson D.C., Dean D.R., Smith A.D., Johnson M.K.** Structure, function and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 2005, 74, strony 247–281.
14. **Lill R.** Function and biogenesis iron-sulphur proteins. *Nature*. 2009, 460, strony 831–838.
15. **Black K.A., Dos Santos P.C.** Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015, 1853, strony 1470–1480.
16. **Shi R., Proteau A., Villarroya M., Moukadiri I., Zhang L., Trempe J.F., Matte A., Armengod M.E., Cygler M.** Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* e1000354, 2010, 8.

17. **Marinoni E.N. de Oliveira J.S., Nicolet Y., Raulfs E.C., Amara P., Dean D.R., Fontecilla-Camps J.C.** (IscS-IscU)<sub>2</sub> complex structures provide insights into Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> biogenesis and transfer. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012, 51, strony 5439–5442.
18. **Boniecki M.T., Freibert S.A., Muhlenhoff U., Lill R., Cygler M.** Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat. Commun.* 2017, 8, str. 1287.
19. **Fox N.G., Yu X., Feng X., Bailey H.J., Martelli A., Nabhan J.F., Strain - Damerell C., Bulawa C., Yue W.W., Han S.** Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism, 10 (2). *Nat. Commun.* 2019, 10, str. 2210.
20. **Jacobson MR, Brigle KE, Bennett LT, Setterquist RA, Wilson MS, Cash VL, Beynon J, Newton WE, Dean DR.** Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* 1989, 171(2), strony 1017-27.
21. **Zheng L., White R.H., Cash V.L., Jack R.F., Dean D.R.** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, strony 2754–2758.
22. **Zheng L., Dean D.R.,** Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* . 1994, 269, strony 18723–18726.
23. **Black K.A., Dos Santos P.C.,** Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* . 2015, 1853, strony 1470–1480.
24. **Bandyopadhyay S., Naik S.G., O’Carroll I.P., Huynh B.H., Dean D.R., Johnson M.K., Dos Santos P.C.,** A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier,. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, strony 14092–14099.
25. **Dos Santos P.C., Smith A.D., Frazzon J., Cash V.L., Johnson M.K., Dean D.R.,** Iron-sulfur cluster assembly - NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, strony 19705-19711.
26. **Setubal J.C. dos Santos P., Goldman B.S., Ertesvag H., Espin G., Rubio L.M., Valla S., Almeida N.F., Balasubramanian D., Cromes L., Curatti L., Du Z., Godsy E., Goodner B., Hellner-Burris K., Hernandez J.A., Houmiel K., Imperial J., Kennedy C. et al.** Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes,. *J Bacteriol* . 2009, 191, strony 4534–4545.
27. **Braymer J. J., Freibert, S. A., Rakwalska-Bange, M., Lill, R.** Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 2021, 1868, str. 118862.
28. **Takahashi Y., Tokumoto U.,** A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids,. *J. Biol. Chem.* . 2002, 277, strony 28380–28383.
29. **Patzer S.I., Hantke K.** SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*,. *J. Bacteriol.* . 1999, 181, strony 3307–3309.
30. **Zheng M., Wang X., Templeton L.J., Smulski D.R., LaRossa R.A., Storz G.** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide,. *J. Bacteriol.* . 2001, 183, strony 4562–4570.

31. **Garcia P.S., Gribaldo S., Py B., Barras F.** The SUF system: an ABC ATPase-dependent protein complex with a role in Fe-S cluster biogenesis,. *Res. Microbiol.* 2019, 170 , strony 426–434.
32. **Outten F.W.** Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: beyond the Proteobacteria,. *Biochim. Biophys. Acta* . 2015, 1853, strony 1464–1469.
33. **Perard J. de Choudens S.O.** Iron-sulfur clusters biogenesis by the SUF machinery: close to the molecular mechanism understanding,. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018, 23, strony 581–596.
34. **Boyd E.S. Thomas K.M., Dai Y., Boyd J.M., Outten F.W.** Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: insights from the Suf pathway,. *Biochemistry.* 2014, 53 , strony 5834–5847.
35. **Tanaka N. Kanazawa M., Tonosaki K., Yokoyama N., Kuzuyama T., Takahashi Y.** Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron-sulfur clusters,. *Mol. Microbiol.* 2016, 99, strony 835–848.
36. **Outten F.W. Wood M.J., Munoz F.M., Storz G.** The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *E. coli*,. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, strony 45713–45719.
37. **Layer G. Gaddam S.A., Ayala-Castro C.N., Ollagnier-de Choudens S., Lascoux D., Fontecave M., Outten F.W.,** SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly,. *J. Biol. Chem.* . 2007, 282, strony 13342–13350.
38. **Yuda E. Tanaka N., Fujishiro T., Yokoyama N., Hirabayashi K. Fukuyama, K., Wada K., Takahashi Y.** Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters, . *Scientific Reports.* 2017, 7.
39. **Zheng C. Guo S., Tennant W.G., Pradhan P.K., Black K.A., Dos Santos P.C.** The thioredoxin system reduces protein persulfide intermediates formed during the synthesis of thio-cofactors in *Bacillus subtilis*,. *Biochemistry* . 2019, 58, strony 1892–1904.
40. **Wollers S. Layer G., Garcia-Serres R., Signor L., Clemancey M., Latour J.M., Fontecave M., de Choudens S.O.** 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.* . 2010, 285, strony 23329-23339.
41. **Saini A. Mapolelo D.T., Chahal H.K., Johnson M.K., Outten F.W.** SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during in vivo Fe-S cluster formation on SufB,. *Biochemistry.* 2010, 49, strony 9402–9412.
42. **Nachin L. Loiseau L., Expert D., Barras F.** SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress,. *EMBO J.* 2003, 22, strony 427–437.
43. **Expert D. Boughammoura A., Franza T.** Siderophore-controlled iron assimilation in the Enterobacterium *Erwinia chrysanthemi* evidence for the involvement of bacterioferritin and the Suf iron-sulfur cluster assembly machinery,. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, str. 3656.
44. **Hirabayashi K. Yuda E., Tanaka N., Katayama S., Iwasaki K. Matsumoto, , T. Kurisu G., Outten F.W., Fukuyama K., Takahashi Y., Wada K.** Functional dynamics revealed by the structure of the SufBCD complex, a novel ATP-binding cassette (ABC) protein that serves as a scaffold for Iron-sulfur cluster biogenesis. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, strony 29717-29731.

45. **Blanc B., Clemancey M., Latour J.M., Fontecave M., de Choudens S.O.** Molecular investigation of iron sulfur cluster assembly scaffolds under stress,. *Biochemistry*. 2014, 53 , strony 7867–7869.
46. **Chahal H.K., Outten F.W.** Separate Fe - S scaffold and carrier functions for SufB (2)C(2) and SufA during in vitro maturation of 2Fe-2S Fdx,. *J. Inorg. Biochem.* 2012, 116 , strony 126–134.
47. **Gupta V., Sendra M., Naik S.G., Chahal H.K., Huynh B.H., Outten F.W., Fontecave M., Ollagnier de Choudens S.** Native *Escherichia coli* SufA, coexpressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to FeS target enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, strony 6149-6153.
48. **Zheng L., Cash V.L., Flint D.H., Dean D.R.** Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*,. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, strony 13264–13272.
49. **Lill R., Freibert S.A.** Mechanisms of mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2020, 89, strony 471–499.
50. **Ali V., Shigeta Y., Tokumoto U., Takahashi Y., Nozaki T.** An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions,. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, strony 16863-16874.
51. **Freibert S.A., Goldberg A.V., Hacker C., Molik S., Dean P., Williams T.A., Nakjang S., Long S., Sendra K., Bill E., Heinz E., Hirt R.P., Lucocq J.M., Embley T.M., Lill R.** Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis. *Nat. Commun.* 2017, 8, str. 13932.
52. **Eme L., Spang A., Lombard J., Stairs C.W., Ettema T.J.G.** Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol.* 2017, 15 , strony 711–723.
53. **Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Backstrom D., Juzokaite L., Vancaester E., Seitz K.W., Anantharaman K., Starnawski P., Kjeldsen K.U., Stott M.B., Nunoura T., Banfeld J.F., Schramm A., Baker B.J., Spang A., Ettema T.J.,** Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature.* 2017, 541, strony 353-358.
54. **Baussier C., Fakroun S., Aubert C., Dubrac S., Mandin P., Py B., Barras F.** Making iron-sulfur cluster: structure, regulation and evolution of the bacterial ISC system. *Adv. Microb. Physiol.* 2020, 76, strony 1–39.
55. **Freibert S.A., Weiler B.D., Bill E., Pierik A.J., Mühlenhoff U., Lill R.** Biochemical reconstitution and spectroscopic analysis of iron-sulfur proteins. *Methods Enzymol.* 2018, 599, strony 197–226.
56. **Zimorski V., Ku C., Martin W.F., Gould S.B.** Endosymbiotic theory for organelle origins,. *Curr. Opin. Microbiol.* . 2014, 22, strony 38-48.
57. **Howe C.J., Barbrook A.C., Nisbet R.E.R., Lockhart P.J., Larkum A.W.D.** The origin of plastids,. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences.* 2008, 363, strony 2675–2685.
58. **Lu Y.** Assembly and transfer of iron-sulfur clusters in the plastid,. *Front. Plant Sci.* 2018, 9 , str. 336.
59. **Przybyla-Toscano J., Roland M., Gaymard F., Couturier J., Rouhier N.** Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018, 23 , strony 545-566.



60. **Ye H. Pilon M., Pilon-Smits E.A.** CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts,. *New Phytol.* 2006, 171 , strony 285–292.
61. **Van Hoewyk D. Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Herbert S.K., Kugrens P., Pilon M., Pilon-Smits E.A.H.** Chloroplast iron-sulfur cluster protein maturation requires the essential cysteine desulfurase CpNifS,. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104, strony 5686–5691.
62. **Ye H. Abdel-Ghany S.E., Anderson T.D., Pilon-Smits E.A.H., Pilon M.** CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe-S cluster formation,. *J. Biol. Chem.* . 2006, 281, strony 8958–8969.
63. **Murthy N. Ollagnier-de-Choudens S., Sanakis Y., Abdel-Ghany S.E., Rousset C., Ye H., Fontecave M., Pilon-Smits E.A.H., Pilon M.** Characterization of Arabidopsis thaliana SufE2 and SufE3 - functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and NAD synthesis. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, strony 18254-18264.
64. **Hu X.Y. Kato Y., Sumida A., Tanaka A., Tanaka R.** The SUFBC2D complex is required for the biogenesis of all major classes of plastid Fe-S proteins,. *Plant J.* 2017, 90, strony 235–248.
65. **Touraine B. Vignols F., Przybyla-Toscano J., Ischebeck T., Dhalleine T., Wu H.C, Magno C., Berger N., Couturier J., Dubos C., Feussner I., Caffarri S., Havaux M., Rouhier N., Gaymard F.,** Iron-sulfur protein NFU2 is required for branched-chain amino acid synthesis in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* 2019, 70, strony 1875-1889.
66. **Roland M. Przybyla-Toscano J., Vignols F., Berger N., Azam T., Christ L., Santoni V., Wu H.C., Dhalleine T., Johnson M.K., Dubos C., Couturier J., Rouhier N.,** The plastidial Arabidopsis thaliana NFU1 protein binds and delivers 4Fe-4S clusters to specific client proteins. *J. Biol. Chem.* 2020, 295, strony 1727-1742.
67. **Nath K. O'Donnell J.P., Lu Y.,** Chloroplastic iron-sulfur scaffold protein NFU3 is essential to overall plant fitness,. *Plant Signaling & Behavior* . 2017, 12.
68. **Nath K. Wessendorf R.L., Lu Y.,** A nitrogen-fixing subunit essential for accumulating 4Fe-4S-containing photosystem I core proteins,. *Plant Physiol.* 2016, 172, strony 2459–2470.
69. **Lill R. Kispal G.** Maturation of cellular Fe/S proteins: the essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* . 2000, 25, strony 352-356.
70. **Lill R.** Function and biogenesis iron-sulphur proteins. *Nature.* 2009, 460, strony 831-838.
71. **Roger A.J. Munoz-Gomez S.A., Kamikawa R.** The origin and diversification of mitochondria,. *Curr. Biol.* 2017, 27 , strony R1177–R1192.
72. **Adam A.C. Bornhövd C., Prokisch H., Neupert W., Hell K.** A.C. Adam, C. Bornhövd, H. Prokisch, W. Neupert, K. Hell, The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria,. *EMBO J.* 2006, 25, strony 174–183.
73. **Angerer H.** The superfamily of mitochondrial Complex1\_LYR motif-containing (LYRM) proteins,. *Biochem. Soc. Trans.* 2013, 41 , strony 1335–1341.
74. **Nowinski S.M. Van Vranken J.G., Dove K.K., Rutter J.** Impact of mitochondrial fatty acid synthesis on mitochondrial biogenesis,. *Curr. Biol.* . 2018, 28, strony R1212–R1219.
75. **Shi Y. Ghosh M.C., Tong W.H., Rouault T.A.** Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis,. *Hum. Mol. Genet.* . 2009, 18, strony 3014-3025.

76. **Wiedemann N. Urzica E., Guiard B., Müller H., Lohaus C., Meyer H.E., Ryan M.T., Meisinger C., Mühlenhoff U., Lill R., Pfanner N.** Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins,. *EMBO J.* 2006, 25, strony 184–195.
77. **Dutkiewicz R. Nowak M.** Molecular chaperones involved in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis,. *J. Biol. Inorg. Chem.* . 2018, 23, strony 569–579.
78. **Camaschella C. Campanella A., De Falco L., Boschetto L., Merlini R., Silvestri L., Levi S., Iolascon A.** The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload,. *Blood* . 2007, 110, strony 1353–1358.
79. **Rodriguez-Manzanique M.T. Tamarit J., Belli G., Ros J., Herrero E.** Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes,. *Mol. Biol. Cell.* 2002, 13, strony 1109–1121.
80. **Uzarska M.A. Dutkiewicz R., Freibert S.A., Lill R. Mühlenhoff U.** The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation,. *Mol. Biol. Cell.* 2013, 24, strony 1830–1841.
81. **Weiler B.D. Bruck M.C., Kothe I., Bill E., Lill R., Mühlenhoff U.** 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.* 2020, 117, strony 20555–20565.
82. **Mühlenhoff U. Richter N., Pines O., Pierik A.J., Lill R.** Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins,. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, strony 41205–41216.
83. **Sheftel A.D. Wilbrecht C., Stehling O., Niggemeyer B., Elsasser H.P., Mühlenhoff U., Lill R.** The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation,. *Mol. Biol. Cell* . 2012, 23, strony 1157–1166.
84. **Gelling C. Dawes I.W., Richhardt N., Lill R., Mühlenhoff U.** Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes,. *Mol. Cell. Biol.* . 2008, 28, strony 1851–1861.
85. **Long S. Changmai P., Tsaousis A.D., Skalicky T., Verner Z., Wen Y.Z., Roger A.J., Lukes J.** Stage-specific requirement for Isa1 and Isa2 proteins in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei* and heterologous rescue by human and *Blastocystis* orthologues. *Mol. Microbiol.* 2011, 81, strony 1403-1418.
86. **Cameron J.M. Janer A., Levandovskiy V., Mackay N., Rouault T.A., Tong W.H., Ogilvie I., Shoubridge E.A., Robinson B.H.** Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* 2011, 89, strony 486-495.
87. **Bych K. Kerscher S., Netz D.J., Pierik A.J., Zwicker K., Huynen M.A., Lill R., Brandt U., Balk J.,** The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly,. *EMBO J.* . 2008, 27, strony 1736–1746.
88. **Beilschmidt L.K. Puccio H.M.,** Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease,. *Biochimie.* 2014, 100, strony 48–60.
89. **Stehling O. Wilbrecht C., Lill R.** Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease,. *Biochimie.* 2014, 100, strony 61–77.
90. **Gervason S. Larkem D., Mansour A.B., Botzanowski T., Muller C.S., Pecqueur L., Le Pavec G., Delaunay-Moisan A., Brun O., Agramunt J., Grandas A., Fontecave M., Schunemann V., Cianferani S., Sizun C., Toledano M.B., D’Autreaux B.,**

Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat. Commun.* 2019, 10, str. 3566.

91. **Patra S. Barondeau D.P.** Mechanism of activation of the human cysteine desulfurase complex by frataxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* . 2019, 116, strony 19421–19430.

92. **Webert H. Freibert S.A., Gallo A., Heidenreich T., Linne U., Amlacher S., Hurt E., Mühlenhoff U., Banci L., Lill R.** Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* . 2014, 5, str. 5013.

93. **Mühlenhoff U. Gerber J., Richhardt N., Lill R.** Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* . 2003, 22, strony 4815–4825.

94. **Kispal G. Csere P., Prohl C., Lill R.** The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* . 1999, 18, strony 3981–3989.

95. **Biederbick A. Stehling O., Rösser R., Niggemeyer B., Nakai Y., Elsässer H.P., Lill R.** Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell. Biol.* . 2006, 26, strony 5675–5687.

96. **Pandey A.K. Pain J., Dancis A., Pain D.** Mitochondria export iron-sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron-sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. *J. Biol. Chem.* . 2019, 294, strony 9489–9502.

97. **Sipos K. Lange H., Fekete Z., Ullmann P., Lill R., Kispal G.,** Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* . 2002, 277, strony 26944–26949.

98. **Paul V.D. Lill R.** Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta* . 2015, 1853, strony 1528–1539.

99. **Ciof-Baffoni S. Nasta V., Banci L.** Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics*. 2018, 10, strony 49–72.

100. **Lill R.** From the discovery to molecular understanding of cellular iron-sulfur protein biogenesis. *Biol. Chem.* 2020, 401, strony 855–876.

101. **Pena-Diaz P. Lukes J.** Fe-S cluster assembly in the supergroup Excavata. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018, 23, strony 521–541.

102. **Netz D.J. Mascarenhas J., Stehling O., Pierik A.J., Lill R.** Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol.* 2014, 24, strony 303–312.

103. **Netz D.J. Pierik A.J., Stümpfg M., Bill E., Sharma A.K., Pallesen L.J., Walden W.E., Lill R.** A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, strony 12365–12378.

104. **Netz D.J. Pierik A.J., Stümpfg M., Mühlenhoff U., Lill R.** The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat. Chem. Biol.* . 2007, 3, strony 278–286.

105. **Pallesen L.J. Solodovnikova N., Sharma A.K., Walden W.E.** Interaction with Cfd1 increases the kinetic lability of FeS on the Nbp35 scaffold. *J. Biol. Chem.* . 2013, 288, strony 23358–23367.

106. **Grossman J.D. Gay K.A., Camire E.J., Walden W.E., Perlstein D.L.** Coupling nucleotide binding and hydrolysis to Iron-sulfur cluster acquisition and transfer

revealed through genetic dissection of the Nbp35 ATPase site., *Biochemistry* . 2019, 58, strony 2017–2027.

107. **Stehling O., Jeoung J.H., Freibert S.A., Paul V.D., Banfer S., Niggemeyer B., Rosser R., Dobbek H., Lill R.** Function and crystal structure of the dimeric P-loop ATPase CFD1 coordinating an exposed [4Fe-4S] cluster for transfer to apoproteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018, 115, strony E9085-E9094.

108. **Zhang Y., Lyver E.R., Nakamaru-Ogiso E., Yoon H., Amutha B., Lee D.-W., Bi E., Ohnishi T., Daldal F., Pain D., Dancis A.** Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis., *Mol. Cell. Biol.* 2008, 28, strony 5569–5582.

109. **Netz D.J., Stümpfg M., Doré C., Mühlenhoff U., Pierik A.J., Lill R.** Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis., *Nat. Chem. Biol.* . 2010, 6, strony 758–765.

110. **Netz D.J., Genau H.M., Weiler B.D., Bill E., Pierik A.J., Lill R.** The conserved protein Dre2 uses essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly., *Biochem. J.* . 2016, 473, strony 2073–2085.

111. **Uzarska M.A., Nasta V., Weiler B.D., Spantgar F., Ciof-Baffoni S., Saviello M.R., Gonnelli L., Muhlenhoff U., Banci L., Lill R.,** Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *Elife.* 2016, 5, str. e16673.

112. **Schrettl M Haas H.** Iron homeostasis—Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? . *Curr Opin Microbiol.* 2011, 14, strony 400–405.

113. **Philpott CC Leidgens S, Frey AG.** Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. . *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1823, strony 1509–1520.

114. **Anderson CP Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA.** Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. . *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1823, strony 1468–1483.

115. **Thompson JW Bruick RK.** Protein degradation and iron homeostasis. . *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1823, strony 1484–1490.

116. **Mühlenhoff U Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E, et al.** Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron–sulfur cluster. *Ce. Cell Metab.* 2010, 12, strony 373-385.

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

118. **Blanc B Gerez C, Ollagnier de Choudens S.** Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: Biochemistry of the bacterial ISC system. . *Biochim Biophys Acta.* 2015, Tom (6), 1853, strony 1436-47.

119. **Beilschmidt L. K., Puccio, H. M.** Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie.* 2014, 100, strony 48–60.

120. **Richards T. A., van der Giezen, M.** Evolution of the Isd11-IscS complex reveals a single alpha-proteobacterial endosymbiosis for all eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution.* 2006, Tom 23, 7, strony 1341–1344.

121. **Wiedemann N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., et al.** Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *The EMBO Journal.* 2006, Tom 25, 1, strony 184–195.

122. **Vickery L.E. i Cupp-Vickery J.R.** Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* . 2007, 42, strony 95-111.
123. **Silberg J.J., Hoff K.G. i Vickery L.E.** The Hsc66-Hsc20 chaperone system in *Escherichia coli*: Chaperone activity and interactions with the DnaK-DnaJ-grpE system. *J. Bacteriol.* . 1998, 180, strony 6617–6624.
124. **Shakamuri P. Zhang B., Johnson M.K.** 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.* . 2012, 134, strony 15213–15216.
125. **Kampinga H. H., Craig, E. A.** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews.* 2010, 11, strony 579–592.
126. **Mayer M., and B. Bukau.** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2005, 62, strony 670-684.
127. **Kim YE Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU.** Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem.* . 2013, 82, strony 323-355.
128. **Craig E Ziegelhoffer T, Nelson J, Laloraya S, Halladay J.** Complex multigene family of functionally distinct Hsp70s of yeast. *Symp Quant Biol.* 1995, 60, str. 441.
129. **Brown CR McCann JA, Chiang HL.** The heat shock protein Ssa2p is required for import of fructose-1, 6-bisphosphatase into Vid vesicles. . *J Cell Biol.* 150, 2000, Tom 65.
130. **Sharma D Masison DC.** . Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept Lett.* 16, 2009, Tom 6, strony 571-81.
131. **Zhuravleva A Clerico EM, Gierasch LM.** An interdomain energetic tug-of-war creates the allosterically active state in Hsp70 molecular chaperones. *Cell.* 2012, 151, strony 1296-1307.
132. **Dutkiewicz R., Nowak, M., Craig, E. A., Marszalek, J.** Fe–S cluster Hsp70 chaperones: the ATPase cycle and protein interactions. *Methods in enzymology.* 2017, 595, strony 161-184.
133. **Qi R Sarbeng EB, Liu Q, Le KQ, Xu X, Xu H, Yang J, Wong JL, Vorvis C, Hendrickson WA, Zhou L, Liu Q.** Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat Struct Mol Biol.* 2013, 20, strony 900-907.
134. **Mapa K Sikor M, Kudryavtsev V, Waegemann K, Kalinin S, Seidel CA, Neupert W, Lamb DC, Mokranjac D.** The conformational dynamics of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Mol Cell.* 2010, 38, strony 89-100.
135. **Craig EA Huang P, Aron R, Andrew A.** The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. . *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2006, 156, strony 1-21.
136. **Cyr DM.** Swapping nucleotides, tuning Hsp70. . *Cell.* 2008, 133, strony 945-947.
137. **Hennessy F Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME, Blatch GL.** Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. . *Prot Sci.* 2005, 14, strony 1697-1709.
138. **Cheetham M.E., and A.J. Caplan.** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones.* 1998, 3, strony 28-36.
139. **Cyr D.M., T. Langer, and M.G. Douglas.** DnaJ-like proteins:molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *TrendsBiochem Sci.* 1994, 19, strony 176-181.
140. **Fan C.-Y., S. Lee, and D.M. Cyr.** Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell stress & chaperones.* 2003, 8, str. 309.

141. **Li J., X. Qian, and B. Sha.** Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. *Protein and peptide letters*. 2009, 16, str. 606.
142. **Summers D.W., P.M. Douglas, C.H. Ramos, and D.M. Cyr.** Polypeptide transfer from Hsp40 to Hsp70 molecular chaperones. *Trends Biochem Sci*. 2009, 34, strony 230-233.
143. **Summers D.W., K.J. Wolfe, H.Y. Ren, and D.M. Cyr.** The Type II Hsp40 Sis1 cooperates with Hsp70 and the E3 ligase Ubr1 to promote degradation of terminally misfolded cytosolic protein. *PLoS One*. . 2013, 8, str. e52099.
144. **Hartl F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl.** Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. . *Nature*. 2011, 475, strony 324-332.
145. **Vergheze J., J. Abrams, Y. Wang, and K.A. Morano.** Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012, 76, strony 115-158.
146. **Dragovic Z., Broadley S.A., Shomura Y., Bracher A., and Hartl F.U.** Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *The EMBO journal*. 2006a, 25, strony 2519-2528.
147. **Moro F Muga A.** Thermal adaptation of the yeast mitochondrial Hsp70 system is regulated by the reversible unfolding of its nucleotide exchange factor. *J Mol Biol* . 2006, 358, strony 1367–1377.
148. **Grimshaw JP Jelesarov I, Schonfeld HJ, Christen P.** Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system. *J Biol Chem* . 2001, 276, strony 6098–6104.
149. **Grimshaw JP Jelesarov I, Siegenthaler RK, Christen P.** Thermosensor action of GrpE. The DnaK chaperone system at heat shock temperatures. *J Biol Chem* . 2003, 278, strony 19048–19053.
150. **Groemping Y Reinstein J.** Folding properties of the nucleotide exchange factor GrpE from *Thermus thermophilus*: GrpE is a thermosensor that mediates heat shock response. *J Mol Biol* . 2001, 314, strony 167–178.
151. **Dutkiewicz R Marszalek J, Schilke B, Craig EA, Lill R, Muhlenhoff U.** The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p. *J Biol Chem*. 2006, 281, strony 7801–7808.
152. **Cupp-Vickery JR Peterson JC, Ta DT and Vickery LE.** Crystal structure of the molecular chaperone HscA substrate binding domain complexed with the IscU recognition peptide ELPPVKIHC. *J Mol Biol*. 2004, 342, strony 1265–1278.
153. **Tapley LE and Vickery TL.** Preferential substrate binding orientation by the molecular chaperone HscA. *J Biol Chem*. 2004, 279, strony 28435–28442.
154. **Hoff KG Silberg JJ and Vickery LE.** Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2000, 97, strony 7790–7795.
155. **Silberg JJ Tapley TL, Hoff KG and Vickery LE.** Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron-sulfur cluster assembly protein IscU. *J Biol Chem* . 2004, 279, strony 53924–53931.
156. **Zhu X Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A and Ogata CM.** Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. 1996, 272, strony 1606–1614.
157. **Cupp-Vickery LE and Vickery JR.** Crystal structure of Hsc20, a J-type Co-chaperone from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 2000, 304, strony 835–845.

158. **Walsh P Bursac D, Law YC, Cyr D and Lithgow T.** The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* 2004, 5, strony 567–571.
159. **Fuzery AK Tonelli M, Ta DT, Cornilescu G, Vickery LE and Markley JL.** Solution structure of the iron-sulfur cluster cochaperone HscB and its binding surface for the iron-sulfur assembly scaffold protein IscU. *Biochemistry* . 2008, 47, strony 9394–9404.
160. **Fuzery AK Oh JJ, Ta DT, Vickery LE and Markley JL.** Three hydrophobic amino acids in Escherichia coli HscB make the greatest contribution to the stability of the HscB-IscU complex. *BMC Biochem* . 2011, 12, str. 3.
161. **Kim JH Alderson TR, Frederick RO and Markley JL.** Nucleotide-dependent interactions within a specialized Hsp70/Hsp40 complex involved in Fe-S cluster biogenesis. *J Am Chem Soc* . 2014, 136, strony 11586–11589.
162. **Ciesielski S. J., Schilke, B. A., Osipiuk, J., Bigelow, L., Mulligan, R., Majewska, J., et al.** Interaction of J-protein co-chaperone Jac1 with Fe-S scaffold Isu is indispensable in vivo and conserved in evolution. *Journal of Molecular Biology.* 2012, 417, strony 1-12.
163. **Andrew AJ Dutkiewicz R, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J.** Characterization of the interaction between J-protein Jac1 and Isu1, the scaffold for Fe-S cluster biogenesis. *J Biol Chem.* 2006, 281, strony 14580-14587.
164. **Kim J. H., Fuzery, A. K., Tonelli, M., Ta, D. T., Westler, W. M., Vickery, L. E., et al.** Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry.* 2009, 48, strony 6062–6071.
165. **Majewska J., Ciesielski, S. J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, A., Delewski, W., et al.** Binding of the chaperone Jac1 protein and cysteine desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013, 288, strony 29134–29142.
166. **Delewski W., Paterkiewicz, B., Manicki, M., Schilke, B., Tomiczek, B., Ciesielski, S. J., Marszalek, J.** Iron–sulfur cluster biogenesis chaperones: evidence for emergence of mutational robustness of a highly specific protein–protein interaction. *Molecular Biology and Evolution.* 2016, 33, strony 643-656.
167. **Tomiczek B., Delewski, W., Nierzwicki, L., Stolarska, M., Grochowina, I., Schilke, B., Marszalek, J.** Two-step mechanism of J-domain action in driving Hsp70 function. *PLoS computational biology.* 2020, 16, str. e1007913.
168. **Dutkiewicz R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E. A., Marszalek, J.** Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004, 279, strony 29167–29174.
169. **Hoff K. G., Ta, D. T., Tapley, T. L., Silberg, J. J., Vickery, L. E.** Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein Fe–S Cluster Hsp70 Chaperones IscU. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002, 277(30), strony 27353–27359.
170. **Dutkiewicz R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E. A., & Marszalek, J.** Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004, 279, strony 29167–29174.
171. **Gray MW.** Mitochondrial evolution. . *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2012, 4, str. a011403.

172. **Schilke B Williams B, Knieszner H, Pukszta S, D'silva P, Craig EA, Marszalek J.** Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. . *Curr Biol.* 2006, 16, strony 1660-1665.
173. **Kominek J Marszalek J, Neuveglise C, Craig EA, Williams BL.** The complex evolutionary dynamics of Hsp70s: a genomic and functional perspective. *Genome Biology and Evolution* . 2013, 5, strony 2460-2477.
174. **Kleczewska M Grabinska A, Jelen M, Stolarska M, Schilke B, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R.** Biochemical Convergence of Mitochondrial Hsp70 System Specialized in Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020, Tom 9, 21, str. 3326.
175. **Craig E., Marszalek, J.** A specialized mitochondrial molecular chaperone system: A role in formation of Fe/S centers. . *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59, strony 1658–1665.
176. **Martijn A. Huynen Berend Snel, Peer Bork, Toby J. Gibson.** The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Human Molecular Genetics.* 2001, 10, strony 2463–2468.
177. **Taylor JW Berbee ML.** Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia.* 2006, 98, strony 838-49.
178. **Vickery LE Cupp-Vickery JR.** Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* . 2007, 42, strony 95-111.
179. **Craig EA Huang P, Aron R, Andrew A.** The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. . *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2006, 156, strony 1-21.
180. **Dutkiewicz R Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek, J.** Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis: similarities to and differences from its bacterial counterpart. *Journal of Biological Chemistry.* 2003, 278, strony 29719-29727.
181. **Pukszta S., Schilke, B., Dutkiewicz, R., Kominek, J., Moczulska, K., Stepień, B., .. & Marszalek, J.** Co-evolution-driven switch of J-protein specificity towards an Hsp70 partner. *EMCO reports.* 2010, 11, strony 360-365.
182. **Delewski W., Paterkiewicz, B., Manicki, M., Schilke, B., Tomiczek, B., Ciesielski, S. J., Marszalek, J.** Iron–sulfur cluster biogenesis chaperones: evidence for emergence of mutational robustness of a highly specific protein–protein interaction. *Molecular Biology and Evolution.* 2016, 33, strony 643-656.
183. **Craig E. A., Marszalek, J.** Encyclopedia of life sciences . *ELS.* 2011.
184. **Huynen M.A. i inni.** The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. . *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10, strony 2463–2468.
185. **Gray M.W.** Mitochondrial evolution. . *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, 4, str. a011403.
186. **Marszalek J.** Mitochondrial Hsp70 - function and evolution. *Postepy Biochem.* 2016, Tom 62, 2, strony 69-76.
187. **Fernández-Sáiz V., Moro, F., Arizmendi, J. M., Acebrón, S. P., Muga, A.** Ionic contacts at DnaK substrate binding domain involved in the allosteric regulation of lid dynamics. *Journal of Biological Chemistry.* 2006, 281, strony 7479-7488.
188. **Rauch J. N., Zuiderweg, E. R., Gestwicki, J. E.** Non-canonical interactions between heat shock cognate protein 70 (Hsc70) and Bcl2-associated anthranogene (BAG) co-chaperones are important for client release. *Journal of Biological Chemistry.* 2016, 291, strony 19848-19857.



189. **Vickery L. E., Silberg, J. J., Ta, D. T.** Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Science*. 1997, 6, strony 1047-1056.
190. **Pareek G Samaddar M, D'Silva P.** Primary sequence that determines the functional overlap between mitochondrial heat shock protein 70 Ssc1 and Ssc3 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* . 2011, 286, strony 19001-19013.
191. **Nørby JG.** Coupled assay of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. . *Methods Enzymol.* 1988, 156, strony 116-9.
192. **Nguyen B. i inni.** Thermodynamic Bounds on the Ultra- and Infra-affinity of Hsp70 for Its Substrates. *Biophys. J.* 2017, 113, strony 362–370.
193. **Barducci A. i De Los Rios P.** Non-equilibrium conformational dynamics in the function of molecular chaperones. . *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015, 30, strony 161–169.
194. **Webert H Freibert SA, Gallo A, Heidenreich T, Linne U, Amlacher S, Hurt E, Mühlenhoff U, Banci L, Lill R.** Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. . *Nat Commun.* 2014, 5, str. 5013.
195. **Liu Q., Liang C. i Zhou L.** Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. *Protein Sci.* 2019, 29, strony 378-390.
196. **Mayer M.P. i Gierasch L.M.** Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, strony 2085-2097.
197. **Kampinga H.H. i Craig E.A.** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, 11, strony 579-592.
198. **Bonomi F Iametti S, Morleo A, Ta D, Vickery LE.** Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. *Biochemistry* . 2008, 47, strony 12795-12801.
199. **Adinolfi S. et al.** Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009, 16, strony 390–396.
200. **Agar J. N. et al.** IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. . *Biochemistry.* 39, strony 7856–7862.
201. **Vranish JN Das D, Barondeau DP.** Real-Time Kinetic Probes Support Monothiol Glutaredoxins As Intermediate Carriers in Fe-S Cluster Biosynthetic Pathways. . *ACS Chem Biol.* 2016, 11, strony 3114-3121.
202. **Ollagnier-de-Choudens S Mattioli T, Takahashi Y, Fontecave M.** Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. . *J Biol Chem.* 2001, 276, strony 22604-7.
203. **Parent A. et al.** Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. . *Nat. Commun.* . 2015, Tom 6, 5686.
204. **Hall D.O. et al.** Electron spin resonance spectra of spinach ferredoxin. . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1966, 23, strony 81–84.
205. **Palmer G. and Sands, R.H.** On the magnetic resonance of spinach ferredoxin. . *J. Biol. Chem.* 1966, 241, str. 253.
206. **Vranish JN Das D, Barondeau DP.** Real-Time Kinetic Probes Support Monothiol Glutaredoxins As Intermediate Carriers in Fe-S Cluster Biosynthetic Pathways. . *ACS Chem Biol.* 2016, 11, strony 3114-3121.
207. **Chandramouli K Johnson MK.** HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. . *Biochemistry.* 2006, 45, strony 11087-95.

208. **Silberg J. J., Tapley, T. L., Hoff, K. G., and Vickery, L. E.** Regulation of the HscA ATPase Reaction Cycle by the Co-chaperone HscB and the Iron-Sulfur Cluster Assembly Protein IscU. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, strony 53924-53931.
209. **Iametti S Barbiroli A, Bonomi F.** Functional implications of the interaction between HscB and IscU in the biosynthesis of FeS clusters. . *J Biol Inorg Chem.* 2015, 20, strony 1039-48.
210. **Chandramouli K Johnson MK.** HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferrredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* . 2006, 45, strony 11087-11095.
211. **Alliegro MC.** Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal Biochem.* 2000, Tom 282, 1, strony 102-106.
212. **Braymer JJ Lill R.** Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem.* 292, 2017, Tom 31, strony 12754-12763.
213. **Schilke B. i inni.** The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* 1996, 134, strony 603-613.
214. **Christin P.-A., Weinreich D.M. i Besnard G.** Causes and evolutionary significance of genetic convergence. *Trends Genet.* 2010, 26, strony 400-405.
215. **Galperin M.Y. i Koonin E.V.** Divergence and Convergence in Enzyme Evolution. *J. Biol. Chem.* 2011, 287, strony 21–28.
216. **Storz J.F.** Causes of molecular convergence and parallelism in protein evolution. . *Nat. Rev. Genet.* 2016, 17, strony 239–250.
217. **Voisine C. i inni.** Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98, strony 1483-1488.
218. **Craig E.A. i Marszalek J.** Hsp70 Chaperones. *John Wiley & Sons.*, 2011.
219. **Agar J.N. i inni.** IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry.* 2000, 39, strony 7856-7862.
220. **Ramelot T.A. i inni.** Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site. *J. Mol. Biol.* 2004, 344, strony 567-583.
221. **Iannuzzi C. i inni.** The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein. . *Protein Sci.* 2014, 23, strony 1208–1219.
222. **Kim J.H., Tonelli M. i Markley J.L.** Disordered form of the scaffold protein IscU is the substrate for iron-sulfur cluster assembly on cysteine desulfurase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012, 109, strony 454–459.
223. **Lin C.W. i inni.** Molecular Mechanism of ISC Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Revealed by High-Resolution Native Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, strony 6018–6029.
224. **Huynen MA Snel B, Bork P, Gibson TJ.** The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. . *Hum Mol Genet.* 2001, 10, strony 2463–2468.
225. **Roche B Agrebi R, Huguenot A, Ollagnier de Choudens S, Barras F, Py B.** Turning *Escherichia coli* into a Frataxin-Dependent Organism. . *PLoS Genet.* 21, 2015, Tom 11, 5, str. e1005134.

226. **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, D'Autréaux B. et al.** Iron Insertion at the Assembly Site of the ISCU Scaffold Protein Is a Conserved Process Initiating Fe-S Cluster Biosynthesis. *J Am Chem Soc.* 28, 2022, Tom 144, 38, strony 17496-17515.
227. **Lill R Kispal G.** Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000, Tom 25, 8, strony 352-6.
228. **Craig EA Marszalek J. A.** specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cell Mol Life Sci.* 2002, Tom 59, 10, strony 1658-65.
229. **Mühlenhoff U Gerber J, Richhardt N, Lill R.** Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 2003, Tom 22, 18, strony 4815-25.
230. **Shi R Proteau A, Villarroja M, Moukadiri I, Zhang L, Trempe JF, Matte A, Armengod ME, Cygler M.** Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* 2010, Tom 8, 4.
231. **Manicki M Majewska J, Ciesielski S, Schilke B, Blenska A, Kominek J, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R.** Overlapping binding sites of the frataxin homologue assembly factor and the heat shock protein 70 transfer factor on the Isu iron-sulfur cluster scaffold protein. *J Biol Chem.* 2014, Tom 289, 44, strony 30268-30278.
232. **Hausmann A Samans B, Lill R, Mühlenhoff U.** Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem.* 2008, Tom 283, 13, strony 8318-30.
233. **Knieszner H Schilke B, Dutkiewicz R, D'Silva P, Cheng S, Ohlson M, Craig EA, Marszalek J.** Compensation for a defective interaction of the hsp70 ssq1 with the mitochondrial Fe-S cluster scaffold isu. *J Biol Chem.* 2005, Tom 280, 32, strony 28966-72.
234. **Andrew AJ Song JY, Schilke B, Craig EA.** Posttranslational regulation of the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *Mol Biol Cell.* 2008, Tom 19, 12, strony 5259-66.
235. **Ciesielski SJ Schilke B, Marszalek J, Craig EA.** Protection of scaffold protein Isu from degradation by the Lon protease Pim1 as a component of Fe-S cluster biogenesis regulation. *Mol Biol Cell.* 2016, Tom 27, 7, strony 1060-8.
236. **Blommel PG Martin PA, Seder KD, Wrobel RL, Fox BG.** Flexi vector cloning. *Methods Mol Biol.* 2009, 498, strony 55-73.
237. **Vickery LE Silberg JJ, Ta DT.** Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from Escherichia coli. *Protein Sci.* 1997, Tom 6, 5, strony 1047-56.
238. **Schwartz CJ Djaman O, Imlay JA, Kiley PJ.** The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, Tom 97, 16, strony 9009-14.
239. **Kim JH Frederick RO, Reinen NM, Troupis AT, Markley JL.** [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.* 2013, Tom 135, 22, strony 8117-20.
240. **Picciochi A Saguez C, Boussac A, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 and other

evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*. 2017, Tom 46, 51, strony 15018-26.

241. **Jenkins C.M. and Waterman, M.R.** NADPH-Flavodoxin Reductase and Flavodoxin from *Escherichia coli*: Characteristics as a Soluble Microsomal P450 Reductase. *Biochemistry*. 1998, 37, strony 6106-6113.

242. **Jin Hae Kim Ronnie O Frederick, Nichole M Reinen, Andrew T Troupis, John L Markley.** [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.* 2013, 135, strony 8117-20.

243. **Hall DA Vander Kooi CW, Stasik CN, Stevens SY, Zuiderweg ER, Matthews RG.** Mapping the interactions between flavodoxin and its physiological partners flavodoxin reductase and cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, Tom 98, 17, strony 9521-6.

244. **Havalová H Ondrovičová G, Keresztesová B, Bauer JA, Pevala V, Kutejová E, Kunová N.** Mitochondrial HSP70 Chaperone System-The Influence of Post-Translational Modifications and Involvement in Human Diseases. . *Int J Mol Sci.* 2021, Tom 22, 15, str. 8077.

245. **Stehling O Smith PM, Biederbick A, Balk J, Lill R, Mühlenhoff U.** Investigation of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Methods Mol Biol.* 2007, 372, strony 325-42.

246. **Picciochi A Saguez C, Boussac A, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*. 2007, Tom 46, 51, strony 15018-26.

247. **Hartl F.U., and M. Hayer-Hartl.** Molecular chaperones in the cytosol:from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002, 295, strony 1852-1858.

248. **Laloraya S Dekker PJ, Voos W, Craig EA, Pfanner N.** Mitochondrial GrpE modulates the function of matrix Hsp70 in translocation and maturation of preproteins. *Mol Cell Biol.* 1995, 15, strony 7098–7105.

249. **Mühlenhoff U Gerber J, Richhardt N, Lill R.** Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 2003, 22, strony 4815-4825.

250. **Dutkiewicz R Marszalek J, Schilke B, Craig EA, Lill R, Mühlenhoff U.** The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p. *J Biol Chem.* 2006, 281, strony 7801-7808.

251. **Hoff KG Silberg JJ, Vickery LE.** Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97, strony 7790-7795.

252. **Kim J. H., Füzéry, A. K., Tonelli, M., Ta, D. T., Westler, W. M., Vickery, L. E., & Markley, J. L.** Structure and dynamics of the iron– sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. . *Biochemistry.* 2009, 48.

253. **Füzéry A. K., Oh, J. J., Ta, D. T., Vickery, L. E., & Markley, J. L.** Three hydrophobic amino acids in *Escherichia coli* HscB make the greatest contribution to the stability of the HscB-IscU complex. *BMC biochemistry.* 2011, 12, strony 1-9.

254. **Genevaux P Georgopoulos C, Kelley WL.** The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. . *Mol Microbiol.* 2007, 66, strony 840-857.

255. **Hoff K. G., Silberg, J. J., & Vickery, L. E.** Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 2000, 97, strony 7790-7795.

256. **Sasaki M. Maki J., Oshiman K., Matsumura Y., and Tsuchido T.** Purification of cytochrome P450 and ferredoxin, involved in bisphenol A degradation, from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, strony 8024-8030.

257. **Wu SP Mansy SS, Cowan JA.** Iron-sulfur cluster biosynthesis. Molecular chaperone DnaK promotes IscU-bound [2Fe-2S] cluster stability and inhibits cluster transfer activity. *Biochemistry*. 2005, 44, strony 4284–4293.

258. **Shakamuri P Zhang B, Johnson MK.** 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.* 2012, Tom 134, 37, strony 15213-6.

259. **Freibert SA Weiler BD, Bill E, Pierik AJ, Mühlenhoff U, Lill R.** Biochemical Reconstitution and Spectroscopic Analysis of Iron-Sulfur Proteins. *Methods Enzymol.* 2018, Tom 599, strony 197-226.

260. **Rouhier N Couturier J, Johnson MK, Jacquot JP.** Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. 2010 Jan;35(1):43-52. *Trends Biochem Sci.* 2010, Tom 35, 1, strony 43-52.