

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Tomasz Chamera

Podpis.....

Hsp70 reguluje aktywność dezagregazy Hsp104
w odpowiedzi drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
na stres

Hsp70 regulates the activity of Hsp104 disaggregase
in the response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to stress.

Praca przedstawiona
Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
celem uzyskania stopnia
doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Liberek
Promotor pomocniczy: Dr Agnieszka Kłosowska
Pracownia Biochemii Białek
Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej
MWB UG-GUMed

Gdańsk 2019

OŚWIADCZENIE

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

.....

data

.....

własnoręczny podpis

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	7
2. SKRÓTY I OZNACZENIA	9
3. WSTĘP	10
3.1. Wprowadzenie.....	10
3.2. Białka opiekuńcze w systemie kontroli jakości białek u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	11
3.2.1. Dezagregacja i fałdowanie	12
3.2.2. Degradacja źle sfałdowanych białek i agregatów	13
3.2.3. Izolacja agregatów białkowych.....	15
3.3. Charakterystyka białek biorących udział w procesie dezagregacji u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	16
3.3.1. Dezagregaza Hsp104.....	17
3.3.2. Ssa1.....	23
3.3.3. JDP: Ydj1 i Sis1	27
3.3.4. Czynniki wymiany nukleotydów – NEF: Sse1 i Sse2, Fes1 i Snl1	29
3.4. Funkcje białka Hsp70 podczas procesu dezagregacji	31
3.4.1. Rearanżacja agregatów białkowych przez system Hsp70/JDP	32
3.4.2. Dokowanie dezagregazy do kompleksu Hsp70-JDP-agregat	33
3.4.3. Aktywacja dezagregazy Hsp100 przez oddziaływanie białka Hsp70 z domeną M.....	34
3.4.4. Reaktywacja łańcucha polipeptydowego opuszczającego kanał dezagregazy Hsp100 ...	36
3.5. Hsp104 jako potencjalne narzędzie w terapii chorób neurodegeneracyjnych	37
4. CEL PRACY.....	39
5. MATERIAŁY I METODY.....	40
5.1. Materiały.....	40
5.1.1. Szczepy bakteryjne	40
5.1.2. Szczepy drożdżowe	40
5.1.3. Plazmidy bakteryjne	40
5.1.4. Plazmidy drożdżowe	41
5.1.5. Startery do reakcji PCR	41
5.1.6. Antybiotyki.....	43
5.1.7. Białka	43
5.1.7.1. Białka opiekuńcze z <i>E.coli</i>	43
5.1.7.2. Białka opiekuńcze z <i>S. cerevisiae</i>	43
5.1.7.3. Białka użyte jako substraty reakcyjne	43
5.1.7.4. Białka enzymatyczne	43
5.1.8. Przeciwciała	44
5.1.9. Pożywki do hodowli bakterii.....	44
5.1.10. Pożywki do hodowli drożdży	44
5.1.11. Złoża chromatograficzne	45
5.1.12. Zestawy komercyjne	45
5.1.13. Bufory	45

5.1.13.1.	Bufory do oczyszczania białek.....	45
5.1.13.2.	Bufory reakcyjne	47
5.1.13.3.	Inne	47
5.2.	Metody.....	49
5.2.1.	Izolacja plazmidowego DNA	49
5.2.2.	Izolacja genomowego DNA.....	49
5.2.3.	Wprowadzenie genu <i>HSP104</i> do wektora pFA6a-GFP (S65T)-His3MX6 oraz pFA6a-link-mCherry-SpHis5 - FastCloning.....	49
5.2.4.	Wprowadzenie sekwencji: <i>HSP104</i> - GFP (S65T)-His3MX6 i <i>HSP104</i> - link-mCherry-SpHis5 do komórek <i>S. cerevisiae</i> – rekombinacja homologiczna	50
5.2.5.	Analiza Western Blot poziomu białek w komórkach <i>S. cerevisiae</i>	51
5.2.6.	Mikroskopia fluorescencyjna.....	51
5.2.7.	Ocena kolokalizacji białek fuzyjnych.....	52
5.2.8.	Mutageneza miejscowo specyficzna	52
5.2.9.	Przygotowanie komórek kompetentnych	53
5.2.9.1.	Komórki kompetentne <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	53
5.2.9.2.	Komórki super kompetentne <i>E. coli</i> DH5α.....	53
5.2.10.	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	53
5.2.11.	Elektroforeza białek z żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	54
5.2.11.1.	Przygotowanie żeli	54
5.2.11.2.	Elektroforeza i barwienie żeli.....	54
5.2.12.	Oznaczenie stężenia białek i DNA.....	54
5.2.13.	Izolacja białek:	55
5.2.13.1.	Hsp104	55
5.2.13.2.	Ssa1	56
5.2.13.3.	Ydj1	56
5.2.13.4.	GFP	57
5.2.13.5.	ClpB	58
5.2.14.	Transformacja komórek <i>E. coli</i> metodą szoku cieplnego	58
5.2.15.	Transformacja komórek <i>S. cerevisiae</i>	58
5.2.16.	Ocena termotolerancji komórek <i>S. cerevisiae</i>	59
5.2.17.	Ocena toksyczności wariantów białka Hsp104 w komórkach <i>S. cerevisiae</i>	59
5.2.18.	Pomiar aktywności ATPazowej wariantów białka Hsp104	60
5.2.19.	Pomiar zdolności tworzenia struktur oligomerycznych wariantów białka Hsp104 (w obecności ATP) przy wykorzystaniu metody dynamicznego rozpraszania światła - DLS	60
5.2.20.	Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP	61
5.2.21.	Reaktywacja termicznie zagregowanej lucyferazy	61
5.2.22.	Interferometria bio-powierzchniowa – BLI.....	62
5.2.22.1.	Przygotowanie biosensora.....	62
5.2.22.2.	Analiza oddziaływań in vitro	62
5.2.23.	Proteoliza FITC-kazeiny.....	62
5.2.24.	Alkaliczna liza drożdży	63
6.	WYNIKI	64
6.1.	Substytucja Y507A w białku Hsp104 nie wpływa na oddziaływanie z Hsp70, w porównaniu do homologicznej zmiany w białku ClpB	64

6.2.	Feniloalanina w pozycji 508 białka Hsp104 odpowiada za współdziałanie z białkiem Hsp70	66
6.3.	Wariant białka Hsp104 F508A nie wykazuje zdolności do fizycznego oddziaływania z system Hsp70/JDP.....	70
6.4.	Analiza heteroheksamerów Hsp104 złożonych z podjednostek WT oraz wariantu F508A	74
6.4.1.	Teoretyczna analiza tworzenia heksamerów.....	74
6.4.2.	Eksperymentalna analiza heteroheksamerów złożonych z podjednostek Hsp104 WT i Hsp104 F508A	77
6.4.3.	Model teoretyczny a eksperymentalna analiza heteroheksamerów	78
6.5.	Analiza <i>in vivo</i> funkcjonalności wariantu Hsp104 F508A.	79
6.5.1.	Lokalizacja białka fuzyjnego Hsp104-GFP (WT i F508A) w komórkach <i>S. cerevisiae</i> podczas szoku termicznego.....	79
6.5.2.	Kolokalizacja fuzyjnych białek: Hsp104-mCherry (wariant WT i F508A) i lucyferaza-mCitrine podczas szoku termicznego.....	82
6.5.3.	Gen <i>hsp104 F508A</i> nie zapewnia termotolerancji komórkom drożdży.....	84
6.6.	Wariant białka Hsp104 F508G/A509K oraz białka ClpB G504F/K505A nie wykazuje aktywności dezagregacyjnej	86
6.7.	Białko Hsp104 D484K/F508A – wariant nie oddziałujący z Ssa1 i niewymagający jego obecności przy aktywacji.....	88
6.8.	Białko Hsp70 przesuwą preferencję substratową dezagregazy Hsp104 w stronę białek uwięzionych w agregatach.	92
7.	DYSKUSJA	98
7.1.	Identyfikacja miejsca oddziaływania między Hsp104 a Hsp70	98
7.2.	Hsp70 kieruje Hsp104 do agregatów w komórkach drożdży.....	99
7.3.	Specyficzność gatunkowa wpływa na oddziaływanie pomiędzy Hsp70 i Hsp104 lub ClpB	100
7.4.	Oddziaływanie pomiędzy Hsp70 a Hsp104 wpływa na wydajność dezagregazy.....	101
7.5.	Aktywność dezagregazy jest zależna od ilości funkcjonalnych miejsc oddziaływania z Hsp70.....	101
7.6.	Toksyczność dezagregazy zależy od nadaktywności białka oraz od zdolności do oddziaływania z Hsp70 a Hsp104	103
7.7.	Hsp70 wpływa na specyficzności substratową Hsp104.....	104
8.	BIBLIOGRAFIA	106
9.	ZAŁĄCZNIKI	117

1. STRESZCZENIE

Dezagregaza Hsp104 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* należąca do rodziny białek opiekuńczych odgrywa kluczową rolę w reaktywacji białek uwięzionych w agregatach. Monomer Hsp104 składa się z domeny N-końcowej (NTD), dwóch domen wiążących nukleotydy typu AAA+ (NBD1 i NBD2), domeny M (MD) związanej z NBD1 i krótkiej domeny C-końcowej (CTD). Formą aktywną dezagregazy jest heksamer z kanałem umieszczonym centralnie wewnątrz struktury. Podczas reaktywacji, Hsp104 uwalnia łańcuch polipeptydowy z agregatów i translokuje go przez kanał centralny, przez co polipeptyd opuszczający kanał dezagregazy może odzyskać strukturę natywną. Efektywny proces dezagregacji wymaga współpracy pomiędzy Hsp104 a białkiem opiekuńczym Hsp70. Hsp70 wiąże się z agregatami, co umożliwia rekrutację Hsp104 do agregatów. Dodatkowo, oddziaływanie Hsp70 z domeną M Hsp104 aktywuje dezagregazę. Oddziaływanie pomiędzy Hsp70 a Hsp104 jest ważne dla procesu dezagregacji, lecz miejsce oddziaływania pomiędzy tymi białkami nie zostało jeszcze poznane.

W mojej pracy doktorskiej skupiłem się na roli białka Ssa1, drożdżowego Hsp70, w regulacji aktywności Hsp104 i określeniu znaczenia współpracy między tymi białkami dla efektywnej i wydajnej dezagregacji. Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych domen M, pochodzących z homologów Hsp104 z różnych organizmów, zidentyfikowałem w Hsp104 fenyloalaninę znajdującą się w pozycji 508, jako miejsce oddziaływania z Ssa1. Substytucja fenyloalaniny na alaninę w tej pozycji powoduje zerwanie oddziaływania pomiędzy dezagregazą a Ssa1, przez co dezagregaza nie jest w stanie wiązać się z agregatami, co uniemożliwia inicjację dezagregacji. Analizy *in vivo* pokazały, że drożdże posiadające mutację F508A nie wykazują odporności na stres temperaturowy, jednocześnie białko Hsp104 F508A nie jest w stanie rozpoznać agregatu w warunkach stresu komórkowego.

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują również, że oddziaływanie między dezagregazą a Hsp70 jest istotne dla ochrony komórek przed potencjalnie toksyczną aktywnością Hsp104, polegającą na rozfałdowywaniu natywnych białek posiadających nieustrukturyzowane regiony. Oddziaływanie Hsp104 z Hsp70 związanym z agregatami, przesuwa specyficzność substratową dezagregazy od białek z nieustrukturyzowanymi regionami do białek uwięzionych w agregatach.

Abstract

The Hsp104 disaggregase from *Saccharomyces cerevisiae* is a chaperone protein which plays a key role in reactivation of proteins which are trapped in aggregates. The Hsp104 monomer consists of the N-terminal domain (NTD), two AAA+ - type nucleotide binding domains: NBD1 and NBD2, NBD1-associated M-domain (MD) and short C-terminal domain (CTD). The active form of the disaggregase is a hexamer containing a channel located centrally inside the structure. During reactivation, Hsp104 releases the polypeptide chain from aggregates and translocates it through its central channel, whereby the polypeptide leaving the channel of disaggregase can be refolded to its native state. An effective disaggregation process requires cooperation between Hsp104 and Hsp70 chaperones. Hsp70 binds aggregates, which makes the recruitment of Hsp104 to aggregates possible. Additionally, the interaction of Hsp70 with the M domain of Hsp104 activates the disaggregase. The cooperation between Hsp70 and Hsp104 is crucial for the disaggregation process, but the site of interaction between these proteins has not yet been recognized.

In my doctoral thesis, I aimed to establish the role of yeast Hsp70 – Ssa1 in the regulation of Hsp104 activity. I also defined the significance of Hsp70 and Hsp104 interaction in performing effective and efficient disaggregation process. Based on the comparison of amino acid sequences of the M domain from Hsp104 homologs from different species, I identified the phenylalanine at position 508 in Hsp104 as the site of interaction with Ssa1.

The substitution of phenylalanine to alanine in this position impairs the cooperation between the disaggregase and Ssa1 which makes the disaggregase unable to bind with aggregates, which prevents the disaggregation initiation. *In vivo* analysis showed that yeast cells carrying the F508A mutation in Hsp104 do not show resistance to temperature stress and at the same time Hsp104 F508A protein is unable to recognize the aggregate under conditions of cellular stress.

My results also show that the interaction between the disaggregase and Hsp70 is important to protect cells from the potentially toxic activity of Hsp104 - unfolding native proteins with unstructured regions. The interaction of Hsp104 and Hsp70 shifts the substrate specificity of the disaggregase from non-aggregated proteins with unstructured regions towards proteins trapped in aggregates.

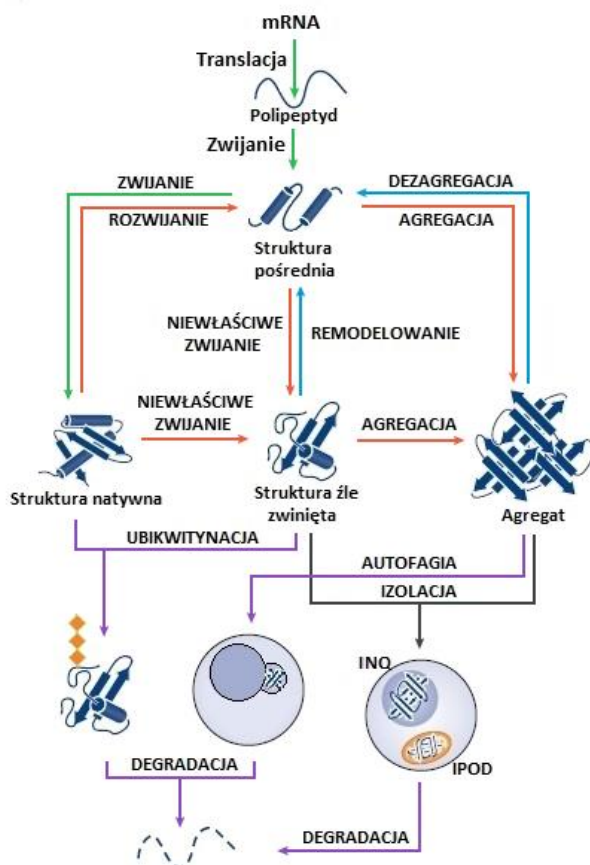
2. SKRÓTY I OZNACZENIA

AAA+	ang. ATPases Associated with various cellular Activities - ATPazy związane z różnymi aktywnościami komórkowymi
ADP	ang. Adenosine Diphosphate – difosforan adenozyne
Amp^R	ang. Ampicilin Resistance - gen oporności na ampicylinę
APS	ang. Ammonium Persulfate - nadsiarczan amonu
ATP	ang. Adenosine Triphosphate - trifosforan adenozyne
BLI	ang. Bio-Layer Interferometry – interferometria biowarstwowa
BPIA	ang. Benzophenone-4-iodoacetamide – 4-jodoacetamid benzofenonu
BSA	ang. Bovine Serum Albumin - albumina surowicy bydłowej
CK	ang. Creatine Kinase - kinaza kreatynowa
CTD	ang. C-terminal Domain – domena C-końcowa
DLS	ang. Dynamic Light Scattering – dynamiczne rozpraszanie światła
DMS	ang. Dimethyl Sulfide – siarczek dimetylu
DMSO	ang. Dimethyl Sulfoxide - dimetylosulfotlenek
DNA	ang. Deoxyribonucleic Acid – kwas deoksyrbonukleinowy
dNTP	ang. Deoxynucleoside 5'-triphosphates - mieszanina deoksynukleotydów
DTT	ang. Dithiotreitol - ditiotreitól
EDTA	ang. Ethylenediaminetetraacetate - kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy
GFP	ang. Green Fluorescent Protein – białko zielonej fluorescencji
HAP	ang. Hsp104 with ClpA fragment for interaction with ClpP - Hsp104 z fragmentem ClpA dla oddziaływania z ClpP
HEPES	ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid - kwas hydroksyetylodietylenodiaminoetanolsulfonowy
HSP	ang. Heat Shock Proteins – białka szoku cieplnego
IBB PAN	Instytut Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk
IPTG	ang. Isopropyl-β-D-thiogalactoside - izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd
JDP	ang. J-Domain Protein – białka posiadające domenę J
Kan^R	ang. Kanamycin resistance - gen oporności na kanamycynę
KBmIK	Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej
KPi	ang. Potassium Phosphate Buffer - bufor fosforanowo-potasowy
kpz	1000 par zasad
LA	ang. Luria Agar – podłoże bakteryjne stałe
LB	ang. Luria Broth – podłoże bakteryjne płynne
LDH	ang. Lactate Dehydrogenase - dehydrogenaza mleczanowa
MD	ang. Middle domain – domena środkowa
MgOAc	ang. Magnesium Acetate – octan magnezu
NAD+	ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy forma utleniona
NADH	ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy forma zredukowana
NBD	ang. Nucleotide Binding Domain – domena wiążąca nukleotyd
NTD	ang. N-terminal Domain – domena N-końcowa
NEF	ang. Nucleotide Exchange Factor – czynnik wymiany nukleotydów
obr/min	obroty na minutę
OD₆₀₀	ang. Optical Density - gęstość optyczna hodowli, absorpcja zawiesiny bakterii przy długości fali 600 nm
PCR	ang. Polymerase Chain Reaction - łańcuchowa reakcja polimerazy
PEP	ang. Phosphoenolpyruvate - fosfoenolpirogronian
PK	ang. Pyruvate Kinase – kinaza pirogronianowa
PMSF	ang. Phenylmethanesulfonyl Fluoride - fluorek fenylometylosulfonylu - inhibitor proteaz serynowych
RCMLa	ang. Carboxymethylated Lactalbumin - karboksymetylowana laktalbumina
SBD	ang. Substrate Binding Domain – domena wiążąca substrat
SDS	ang. Sodium Dodecyl Sulfate - sól sodowa siarczanu dodecyłu
SDS-PAGE	ang. SDS - polyacrylamide gel electrophoresis - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, w obecności SDS
SC	ang. Synthetic Complete – syntetyczna, pożywka drożdżowa
SOB	ang. Super Optimal Broth - pełna pożywka bakteryjna
ssDNA	ang. single-stranded DNA – jednoniciowy DNA
TCA	ang. Trichloroacetic Acid - Kwas trichlorooctowy
TEMED	ang. Tetramethylethylenediamine - N,N,N',N'- Tetrametyloetylenodiamina
WT	ang. Wild Type - typ dziki (dotyczy szczepów i białek)
YPD	ang. Yeast Extract – Pepton + Dextrose – pełna pożywka drożdżowa
ZFLR	ang. Zinc-Finger-Like Region – region/motyw palca cynkowego

3. WSTĘP

3.1. Wprowadzenie

Termin „proteostaza” odnosi się do właściwego utrzymania proteomu komórkowego i obejmuje wiele mechanizmów, które kierują losem białek od syntezy do degradacji. Białka powinny fałdować się w dokładnie zdefiniowane struktury trzecio- i czwartorzędowe i pozostać w takiej formie, aby spełniać swoje funkcje biologiczne. Jednakże wszystkie białka w komórce są stale narażone na wewnętrzne i zewnętrzne czynniki stresowe, które upośledzają proteostazę. Do czynników wewnętrznych należą m.in. błędy translacyjne, mutacje, ograniczona ilość tRNA, wadliwe mRNA, natomiast do czynników zewnętrznych, wysoka temperatura, zmiany warunków osmotycznych, metale ciężkie, głód aminokwasowy czy stres oksydacyjny. Występowanie tych czynników powoduje powstawanie źle zwiniętych białek, które mogą tworzyć większe struktury – agregaty, upośledzające funkcjonowanie komórki. Komórki wykorzystują trzy główne procesy, które pozwalają uniknąć akumulacji agregatów białkowych: dezagregacja i ponowne fałdowanie białek, degradacja białek znajdujących się w agregatach oraz izolacja agregatów (Sontag, i wsp., 2017; Tyedmers i wsp., 2010). W każdy z powyższych procesów zaangażowane są białka opiekuńcze, zwane również chaperonami, które dodatkowo promują zwijanie nowo syntetyzowanych białek i utrzymanie ich natywnej konformacji (Ryc.1).



Rycina 1 | Model sieci proteostatycznej w komórce. We wszystkich komórkach występuje system kontroli jakości białek, który reguluje poziom białek w formie natywnej, a także kontroluje procesy prowadzące do zaburzenia proteostazy (czerwone strzałki). System kontroli można podzielić na trzy główne ścieżki: synteza i fałdowanie łańcuchów polipeptydowych (zielone strzałki), przywrócenie i utrzymanie struktury natywnej (niebieskie strzałki) oraz degradacja zarówno białek w formie natywnej, które nie spełniają już swojej funkcji komórkowej, jak i struktur szkodliwych dla komórki (fioletowe strzałki). W ramach szlaku degradacji można wymienić trzy główne ścieżki: degradacja przez system ubikwityna-proteasom, autofagia oraz izolacja struktur niekorzystnych w rejonach INQ lub IPOD (czarna strzałka), która także prowadzi do degradacji. Zmodyfikowano na podstawie Hipp i wsp., 2019.

3.2. Białka opiekuńcze w systemie kontroli jakości białek u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Puła białek opiekuńczych w proteomie drożdży *S. cerevisiae* składa się z 69 białek opiekuńczych i białek współdziałających (Kampinga i Craig, 2010; Voos i Rottgers 2002; Young i wsp., 2004), z czego około 40 występuje w cytozolu (Załącznik 1). Białka opiekuńcze (Białka szoku cieplnego, ang. HSP – Heat Shock Protein) zostały podzielone na rodziny (JDP (Hsp40), Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 i sHsp) w oparciu o masę cząsteczkową monomerów. Dodatkowo, opierając się na pełnionej funkcji komórkowej, wśród białek opiekuńczych można wyróżnić: holdazy, które wiążą się do nieprawidłowo zwiniętych białek, zapobiegając ich agregacji, foldazy, które uczestniczą w ponownym fałdowaniu rozwiniętych łańcuchów polipeptydowych i przywróceniu im właściwej konformacji oraz dezagregazy, które wiążą się do zagregowanych białek uwalniając pojedyncze łańcuchy polipeptydowe, dzięki czemu umożliwiają powrót zagregowanych białek do struktury natywnej (Diaz-Villanueva i wsp., 2015).

Część genów kodujących białka opiekuńcze ulega ekspresji konstytutywnie, niezależnie od czynników środowiskowych, jednakże ekspresja sporej ich grupy jest indukowana, głównie w warunkach stresowych. Indukcję syntezy białek opiekuńczych zaobserwowano po raz pierwszy w odpowiedzi na szok cieplny i dlatego zostały one nazywane białkami szoku cieplnego (HSP). Transkrypcja genów kodujących białka szoku cieplnego w drożdżach jest regulowana przez 3 czynniki transkrypcyjne: Hsf1 (ang. Heat Shock Factor 1), Msn2 i Msn4 (Trott i Morano, 2004). Wystąpienie warunków stresowych powoduje aktywację Hsf1, które zostaje ufosforylowane i tworzy homotrimer, który jest transportowany do jądra komórkowego. Hsf1 przyłącza się do konserwowanej sekwencji DNA, w obszarze promotorów genów HSP, nazywanej elementem odpowiedzi na szok cieplny - HSE (ang. Heat Shock Element), przez co indukuje wzrost transkrypcji genów HSP (Jolly i Morimoto, 2000; Soti i Csermely, 2007). Białka Msn2 i Msn4 w warunkach fizjologicznych znajdują się w cytoplazmie i są związane przez białko Bmh2. Czynniki stresowe powodują defosforylację regionów lokalizacji jądrowej – NLS (ang. Nuclear Localization Signal) i eksport do jądra komórkowego, gdzie oddziałują z regionem STRE (ang. Stress Response Element), powodując ekspresję genów białek opiekuńczych (Estruch, 2000; Görner i wsp., 2002).

3.2.1. Dezagregacja i fałdowanie

W systemie kontroli jakości białek dezagregacja i ponowne fałdowanie są procesami, które pozwalają powrócić źle sfałdowanym lub zagregowanym białkom do ich struktury natywnej, a co za tym idzie - do puli funkcjonalnych białek (Mayer i Bukau, 2005). U drożdży za ten proces odpowiadają białka Hsp104, Hsp70, JDP i NEF. Hsp104 jest dezagregazą należącą do rodziny ATPaz AAA+, odpowiada za wyswobodzenie łańcucha polipeptydowego z agregatu oraz translokuje go przez swój kanał centralny w celu umożliwienia mu powrotu do struktury natywnej. Hsp70 pełni rolę zarówno holdazy jak i foldazy. W procesie dezagregazy wiąże łańcuchy polipeptydowe uwięzione w agregatach, rekrutuje Hsp104 oraz aktywuje dezagregazę umożliwiając translokację polipeptydu. Białka JDP (ang. J-Domain Protein - białka zawierające domenę J, wcześniej Hsp40) oraz NEF (ang. Nucleotide Exchange Factor - czynnik wymiany nukleotydów) są ko-chaperonami Hsp70, które regulują aktywność tego białka. Obecność tych czterech białek podczas szoku termicznego pozwala na przeprowadzenie efektywnego procesu dezagregacji. Dodatkowo, w procesie

dezagregacji uczestniczy białko Hsp26, które oddziałuje z rozwiniętymi białkami i agregatami, zapobiegając tworzeniu się większych, zagregowanych struktur (Haslbeck i wsp., 1999).

Funkcje wspomnianych białek oraz mechanizm dezagregacji zostaną szerzej omówione w dalszych częściach pracy (Rozdział 3.3. oraz 3.4).

3.2.2. Degradacja źle sfałdowanych białek i agregatów

Białka opiekuńcze biorą udział w kierowaniu źle sfałdowanych białek do systemów degradacji: systemu ubikwityna/proteasom (UPS - ang. Ubiquitin/Proteasome System) oraz autofagii. Degradacja białek jest procesem istotnym dla przeżycia komórek. UPS służy głównie do degradacji pojedynczych białek przez proteasom, podczas gdy autofagia usuwa agregaty lub białka związane z błoną. Oba szlaki są kolejnym elementem regulacji i utrzymania homeostazy komórkowej, umożliwiając powrót reszt aminokwasowych do puli cząsteczek potrzebnych do syntezy nowych białek (Kwon i Ciechanover, 2017; Menzies i wsp., 2015).

Główną drogą degradacji w komórce jest degradacja zależna od ubikwitynacji. W procesie tym uczestniczy grupa białek zaangażowanych w rekrutację substratów przeznaczonych do degradacji, ich znakowaniu ubikwityną oraz transporcie do proteasomu (Löw, 2011). Proteasom składa się z podjednostki regulacyjnej 19S, rozpoznającej substraty oraz podjednostki funkcjonalnej 20S, która zawiera miejsca proteolityczne (Groll i wsp., 1997). Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny do substratu przeznaczonego do degradacji jest katalizowane przez grupę enzymów: E1 (aktywacja cząsteczki ubikwityny), E2 (przenoszenie z jednego enzymu na drugi) i E3 (ligaza ubikwitynowa – przeniesienie ubikwityny na substrat). U drożdży zidentyfikowano jeden enzym E1, 11 białek E2 i 60 - 100 E3, odpowiedzialnych za proces ubikwitynacji (Finley i wsp., 2012). Wielokrotne powtórzenie tego procesu skutkuje powstaniem łańcucha poliubikwityny na powierzchni substratu (Finley i wsp., 2012), która jest rozpoznawana przez proteasom. Podjednostka 19S usuwa cząsteczki ubikwityny oraz częściowo rozwija substraty, umożliwiając wprowadzenie substratów i proteolizę w podjednostce 20S (Tanaka, 2009).

Autofagia odnosi się do wewnątrzkomórkowej degradacji wakuolarnej lub lizosomalnej. Proces ten jest obecnie uznawany za centralny regulator homeostazy komórkowej, który decyduje o przeżyciu komórek (Reggiori i Klionsky 2013).

W drożdżach autofagię można podzielić na dwa główne typy: mikroautofagię i makroautofagię. (Shintani i Klionsky, 2004). W mikroautofagii substrat przeznaczony do degradacji jest bezpośrednio lokalizowany na błonie wakuoli, a następnie wchłonięty do środka. W makroautofagii substrat jest zamykany w pęcherzykach cytozolowych z podwójną błoną (autofagosom), które następnie łączą się z wakuolą uwalniając do światła wakuoli zawartość, która ulega degradacji przez proteazy wakuolarne takie jak: endoproteinazy: A (PrA) i B (PrB), karboksypeptydazy: Y (CpY) i S (CpS) oraz aminopeptydazy: I (API) oraz Y (Ape3) (Johansen i Lamark, 2011; Hecht i wsp., 2014).

Do drożdżowych białek opiekuńczych zaangażowanych w procesy degradacji należą między innymi białka Hsp70 (Ssa1) i Hsp110 (Sse1), które uczestniczą w ubikwitynacji i ostatecznie degradacji substratów (Heck i wsp., 2010). Hsp70 w procesie degradacji oddziałuje z białkami CHIP i BAG1. Białko CHIP zawiera trzy motywy TPR (ang. Tetratricopeptide Repeat), dzięki czemu oddziałuje z SBD Hsp70, oraz tzw. domenę U-box charakterystyczną dla ligaz ubikwitynowych (E3). Natomiast białko BAG1 (Rozdział 3.3.4.) może wiązać się do NBD Hsp70 poprzez domenę BAG, oraz dodatkowo dzięki domenie UBL (ang. Ubiquitin-Like Protein) może oddziaływać z proteasomem 26S. Hsp70 wiążąc rozwinięty substrat próbuje przywrócić mu jego strukturę natywną, jeśli jednak ten proces się nie powiedzie, do Hsp70 przyłącza się białko CHIP. Związanie tego białka uruchamia proces poliubikwitylacji substratu związanego z Hsp70 razem z E1, E2 i E3. Następnie, oddziaływanie białka BAG1 jednocześnie z Hsp70 oraz z proteasomem 26S pomaga w przekazaniu tak wyznakowanego ubikwityną substratu do proteasomu, co prowadzi do jego degradacji (McClellan i wsp., 2005). Białko Hsp110 (Sse1) (Rozdział 3.3.4) pełni funkcję głównego czynnika wymiany nukleotydów dla Hsp70. W procesie degradacji Sse1 oddziałuje z podjednostką regulatorową 19S proteasomu. Oddziaływanie pomiędzy tymi białkami jest wymagane do związania się Hsp70 z proteasomem, co prowadzi do efektywnej degradacji substratów związanych z Hsp70 (Kandasamy i Andréasson, 2018).

Kolejnymi białkami zaangażowanymi w proces degradacji są ko-chaperony białek Hsp70, Ydj1 oraz Hlj1, należące do rodziny JDP. W białku Ydj1 (Rozdział 3.3.3.) zidentyfikowano miejsce oddziaływania z ligazą ubikwitynową Rsp5/Nedd4. Oddziaływanie pomiędzy Rps5 i Ydj1 ułatwia transport substratów związanych z Ydj1 do UPS, a co za tym idzie - ich degradację przez proteasom (Fang i wsp., 2014).

Natomiast białko Hlj1 zlokalizowane w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER), gdzie bierze udział w degradacji białek ER (Youker i wsp., 2004).

W proces degradacji białek zaangażowane jest także białko Hsp104. Białko Hsp104 (Rozdział 3.3.1.) występuje w dwóch szlakach degradacji: w szlaku związanym z ER (ERAD - ang. Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation) oraz w szlaku związanym z mitochondriami (MAGIC - ang. Mitochondria As Guardian In Cytosol). W badaniach nad szlakiem ERAD pokazano, że białka ER przeznaczone do degradacji zostają oznaczone ubikwityną przez jedną z ligaz ubikwitynowych, w zależności od miejsca występowania tych białek: w błonie lub świetle ER przez ligazę Hrd1, w części cytoplazmatycznej przez ligazę Doa10). Następnie do tak wyznakowanego substratu przyłącza się kompleks Cdc48 (Cdc48 jest białkiem opiekuńczym pełniącym rolę holdazy białek pochodzących z ER), który translokuje substrat z ER do degradacji przez proteasom 26S. Wykazano, że oprócz kompleksu Cdc48 w procesie translokacji aktywnie uczestniczy Hsp104. Hsp104 poprzez oddziaływanie z Cdc48 zapobiega agregowaniu białek uwolnionych z błony ER oraz ułatwia ich translokację do proteasomu (Neal i wsp., 2017, Preston i wsp., 2018).

Badania nad szlakiem MAGIC pokazały, że Hsp104 jest wymagane do rozpoznania zagregowanych białek oraz przeniesienia ich do kompleksów importowych w błonie mitochondrialnej: TOM oraz TIM (zewnątrz- i wewnątrz błonowa translokaza mitochondrialna). Przeniesienie substratów do macierzy mitochondrialnej prowadzi do ich degradacji przez proteazy mitochondrialne, takie jak Pim1. Co ciekawe pokazano, że proces ten jest niezależny od cytozolowych Hsp70, np. Ssa1 (Ruan i wsp., 2017).

3.2.3. Izolacja agregatów białkowych

Podczas gdy dezagregacja i degradacja są pierwszą linią obrony przed negatywnymi dla komórki skutkami powstawania źle sfałdowanych białek, komórki wykształciły dodatkowy system, który izoluje źle sfałdowane i zagregowane białka od innych dobrze funkcjonujących elementów komórki (Alberti, 2012). Taki mechanizm ogranicza toksyczność uszkodzonych i nieprawidłowo sfałdowanych, zagregowanych białek, które mogą wchodzić w niepożądane interakcje z prawidłowo funkcjonującymi białkami i tworzyć w komórkach agregaty. Mechanizm izolacji zapobiega także dziedziczeniu agregatów przez komórki potomne (Hill i wsp., 2017).

Można wymienić trzy główne przedziały kontroli w których zostają skupione zagregowane i źle zwinięte białka: miejsce kontroli jakości jądrowej (INQ – ang. Intranuclear quality control compartment, wcześniej JUNQ - ang. Juxtannuclear quality control compartment), miejsce kontroli jakości związane z wakuolą (IPOD – ang. Insoluble Protein Deposit) oraz depozyt cytozolowy - CytoQ (Chen i wsp., 2011; Kaganovich i wsp., 2008; Tyedmers i wsp., 2010; Miller i wsp., 2015). Podczas utrzymujących się warunków stresowych, źle sfałdowane białka zostają przetransportowane do dwóch głównych depozytów: INQ i IPOD.

Białka cytozolowe znakowane ubikwityną, poprzez oddziaływanie z białkiem Sis1, importowane są przez pory jądrowe i umieszczane w INQ, gdzie następuje ich oligomeryzacja przez białko Btn2 (Malinowska i wsp., 2012; Park i wsp., 2013; Specht i wsp., 2011). INQ znajduje się w sąsiedztwie jąderka i zawiera źle sfałdowane białka pochodzące zarówno z cytozolu jak i jądra komórkowego. Z regionem INQ związane są proteasomy i Hsp104. Wykazuje on znaczną mobilność, dzięki czemu uszkodzone białka mogą przemieszczać się do i z INQ (Kaganovich i wsp., 2008).

Nieubikwitynowane białka (głównie białka amyloidogenne) poprzez oddziaływanie z Btn2 są transportowane do IPOD (Kaganovich i wsp., 2008). Z IPOD, związane jest także białko Hsp104. Obszar ten jest mniej dynamiczny w porównaniu do INQ i zazwyczaj powstaje w wyniku długotrwałego stresu oraz utrzymuje się długo po jego zaniknięciu (Specht i wsp., 2011).

Oprócz wymienionych powyżej depozytów białkowych można wymienić także tzw. CytoQ. CytoQ tworzą się podczas szoku termicznego, przy udziale białek Hsp42 oraz Btn2 i składają się z nieprawidłowo sfałdowanych, nieamyloidogennych białek. Występują na peryferiach komórki jako liczne, małe skupiska, które z czasem ulegają fuzji tworząc kilka obszarów w cytoplazmie (Miller et al, 2015; Schneider i wsp., 2018).

3.3. Charakterystyka białek biorących udział w procesie dezagregacji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

W proces dezagregacji u drożdży *S. cerevisiae* zaangażowane jest kilka klas białek opiekuńczych tj. Hsp100, Hsp70, JDP i NEF, które współdziałają ze sobą w celu przywrócenia struktury natywnej źle zwiniętym białkom znajdujących się w agregatach powstałych w wyniku stresu komórkowego. Kluczowym elementem systemu dezagregacyjnego jest dezagregaza Hsp104 zdolna do translokacji źle sfałdowanego

polipeptydu, umożliwiając mu powrót do struktury natywnej. Do prawidłowego funkcjonowania tego białka niezbędna jest obecność Ssa1, należącego do rodziny Hsp70, które dostarcza substratów do Hsp104 i aktywuje dezagregazę. Natomiast białka należące do klas JDP (Ydj1 i Sis1) i NEF (Sse1/2, Fes1, Snl1) regulują aktywność ATPazową Ssa1. W poniższym rozdziale zostaną scharakteryzowane poszczególne komponenty składające się na drożdżowy system dezagregacyjny.

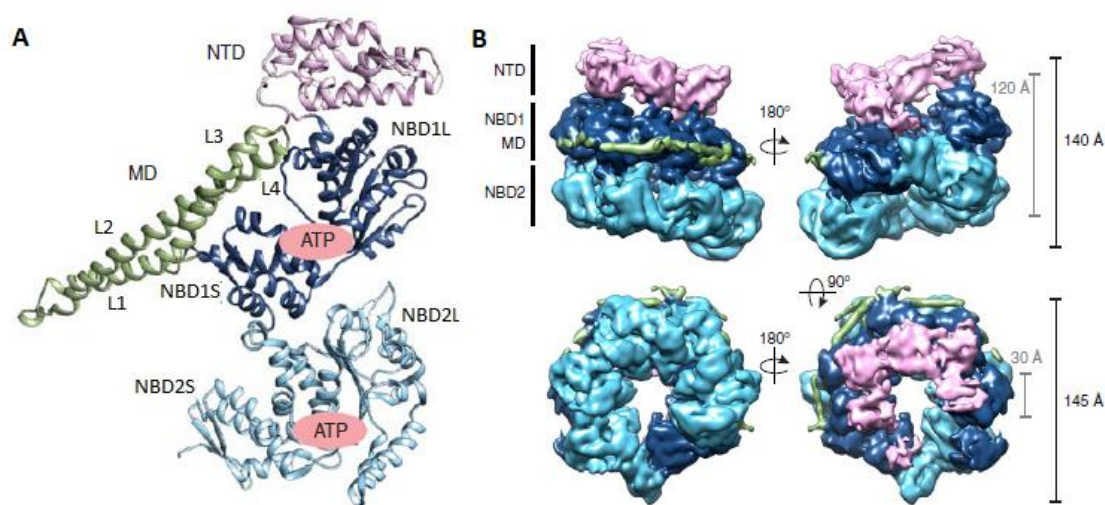
3.3.1. Dezagregaza Hsp104

Białko Hsp104 z drożdży *S. cerevisiae* (bakteryjny homolog: ClpB u *E.coli*) należy do rodziny białek Hsp100, które występują we wszystkich organizmach z wyjątkiem Metazoa. Co ciekawe u zwierząt jedynym organizmem, w którym zidentyfikowano białko z homologicznymi fragmentami do Hsp104/ClpB są gąbki *Amphimedon queenslandica*, gdzie zgodność z sekwencją Hsp104 z drożdży *S. cerevisiae* wynosi 22% (Erives i Fassler, 2015). U ludzi zidentyfikowano białko CLPB, którego nazwa może być myląca i świadczyć o tym, że należy ono do dezagregaz, jednak homologia tego białka z innymi przedstawicielami rodziny Hsp100 odnosi się tylko do jednej z domen AAA+, a oprócz tego białko CLPB zawiera powtórzenia ankirynowe nie występujące w rodzinie Hsp100 (Wortmann i wsp., 2015).

Rodzina białek Hsp100 obejmuje konserwatywną grupę ATPaz AAA+, którą można podzielić w zależności od liczby domen wiążących nukleotydy. Białka należące do klasy 1 są heksamerami, które zawierają dwie domeny wiążące nukleotydy (Martin i wsp., 2005). W tej grupie można wyróżnić m.in.: białka bakteryjne ClpA, ClpB, ClpC i ClpE, jak również homologi tych białek w roślinach, np. ClpB1, ClpC, ClpD oraz u drożdży - Hsp104. Do drugiej klasy białek Hsp100, które zawierają tylko jedną domenę wiążącą nukleotydy, należą m.in.: białka ClpM, ClpN oraz ClpX i ClpY/HslU (Schirmer i wsp., 1996).

Białko Hsp104 należy do klasy 1 ATPaz i dzięki energii uzyskanej z hydrolizy ATP jest zdolne do rozwijania łańcuchów polipeptydowych uwięzionych zarówno w nieuporządkowanych agregatach powstających w skutek denaturacji białek, jak i w uporządkowanych agregatach, takich jak priony i inne amyloidy. (Parsell i wsp., 1994; Mogk i wsp., 1999; Glover i wsp., 1998; DeSantis i wsp., 2012; Park i wsp., 2014; Zhao i wsp., 2017; Yokom i wsp., 2016; Duran i wsp., 2017; Gates i wsp., 2017).

Monomer Hsp104 zbudowany jest z domeny N-końcowej (NTD) zaangażowanej w oddziaływanie z substratem (Rosenzweig i wsp., 2015; Doyle i wsp., 2012), pierwszej i drugiej domeny wiążącej nukleotydy (NBD1 oraz NBD2), odpowiedzialnych za hydrolizę ATP i translokację peptydu, domeny M (MD) pełniącej rolę regulacyjną i uczestniczącej w oddziaływaniu z białkiem Hsp70 (Lee i wsp., 2013; DeSantis i wsp., 2014), oraz krótkiej domeny C-końcowej (CTD) biorącej udział w heksameryzacji (Mackay i wsp., 2008). Aktywną formą białka jest heksamer tworzący asymetryczną strukturę przypominającą trzy pierścienie z centralnym kanałem (Ryc. 2).

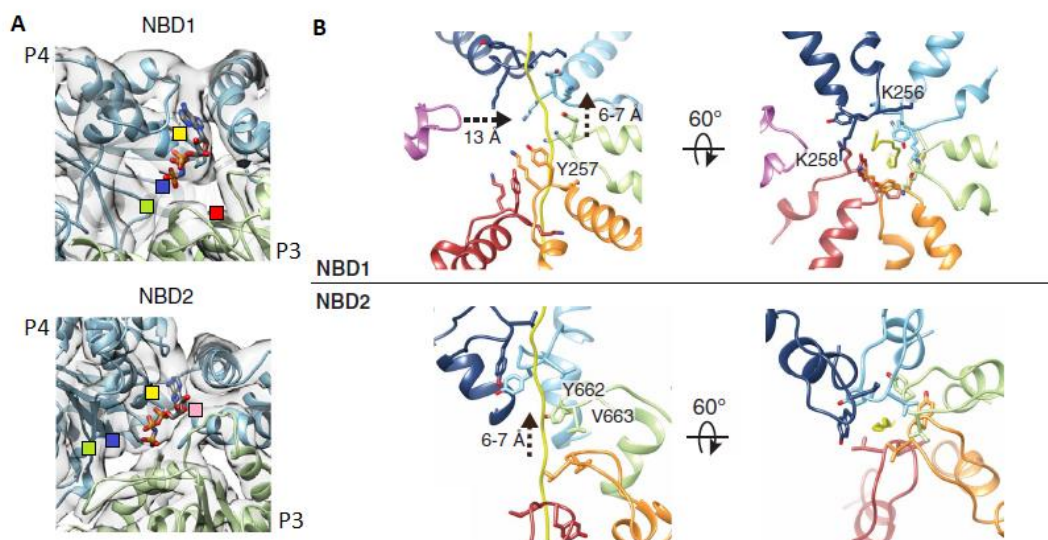


Rycina 2 | Struktura białka Hsp104. A | Organizacja domen w monomerze białka Hsp100. Białka Hsp104/ClpB zbudowane są z 4 domen: domeny N-końcowej (NTD) (kolor fioletowy), pierwszej domeny wiążącej nukleotydy (NBD1) złożonej z dwóch regionów: NBD1L i NBD1S (podjednostki L-duża, S-mała) (kolor granatowy), domeny środkowej (MD) złożonej z 4 α -helis (L1-L4) (kolor zielony), drugiej domeny wiążącej nukleotydy (NBD2) także złożonej z podjednostek (NBD2L i NBD2S) (kolor niebieski), oraz domeny C-końcowej (niezaznaczono). W obu NBD zaznaczono miejsca wiązania i hydrolizy ATP. Model na podstawie struktury ClpB z *T. thermophilus*, określonej za pomocą cryo-EM. Zmodyfikowano na podstawie: Shorter i Southworth, 2019; **B | Struktura heksameru Hsp104.** Aktywną formą białka Hsp104 jest heksamer, w strukturze którego można wyróżnić trzy pierścienie, odpowiadające poszczególnym domenom w monomerze białka (kolorystyka tak jak w A). Wysokość heksameru wynosi 140 Å natomiast szerokość 145 Å. Średnica kanału centralnego powstałego w wyniku heksameryzacji wynosi ok. 30 Å. Model na podstawie struktury Hsp104 z *C. thermophilum*, określonej za pomocą cryo-EM. Zmodyfikowano na podstawie: Yokom i wsp., 2016.

Pierwszy pierścień w heksamerze jest utworzony przez NTD. NTD jest odpowiedzialna za związanie łańcucha polipeptydowego, a następnie ułożenie go w centralnym kanale białka. Przed związaniem łańcucha polipeptydowego wejście do kanału dezagregazy jest zasłonięte przez NTD, co uniemożliwia translokację polipeptydu. Taki stan białka zabezpiecza komórkę chroniąc częściowo rozwinięte lub nieuporządkowane regiony prawidłowo zwiniętych i funkcjonalnych białek przed mylnym rozpoznaniem przez dezagregazę. Za efektywność w wiązaniu substratu do NTD odpowiada w dużej mierze długość i mobilność łącznika pomiędzy tą domeną

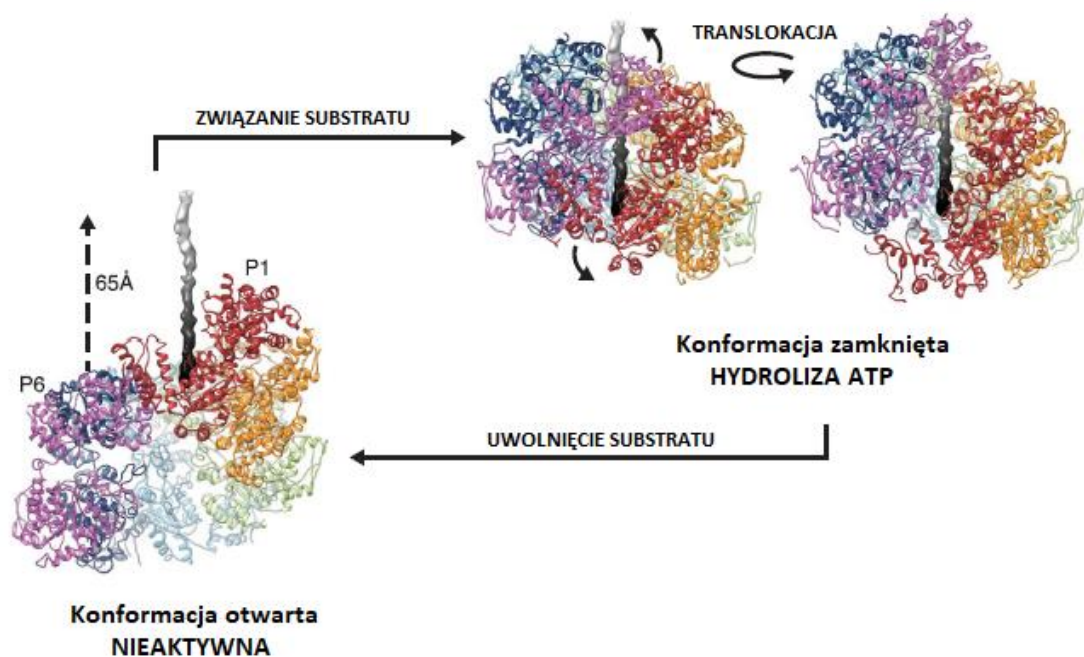
a NBD1. Badania strukturalne białka ClpB ujawniły na powierzchni NTD hydrofobowy region złożony z czterech reszt aminokwasowych (W6, L14, L91, L111), do którego wiąże się łańcuch polipeptydowy. Delecja całej NTD ClpB razem z substytucją wysoce konserwowanej tyrozyny w pozycji 234 na alaninę ($\Delta N/Y234A$), powoduje zahamowanie translokacji łańcucha polipeptydowego. Warianty ClpB ΔN oraz ClpB Y234A wykazują nieznaczną translokację polipeptydu. Natomiast wariant ClpB, w którym wprowadzono alaniny w regionie odpowiedzialnym za początkowe związanie łańcucha polipeptydowego w NTD, wykazuje prawie całkowity brak zdolności translokacji pomimo faktu, że pętle tyrozynowe odpowiedzialne za translokację łańcucha przez kanał zostały zachowane (Rosenzweig i wsp., 2015). Dodatkowo badania nad ClpB pokazały, że NTD uczestniczy w stymulacji aktywności ATP-azowej heksamery (Doyle i wsp., 2012; Rosenzweig i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2012). Natomiast badania nad Hsp104 pokazały, że delecja NTD powoduje słabsze wiązanie włókien prionowych Sup35 i Ure2 oraz zaburza wiązanie modelowego substratu, kazeiny, jak i spowalnia dezagregację termicznie zagregowanej lucyferazy. Jednakże obecność NTD nie jest konieczna do wystąpienia termotolerancji w drożdżach (Hung i Masison, 2006; Kummer i wsp., 2016; Sweeny i wsp., 2015; Winkler i wsp., 2012b).

Kolejne dwa pierścienie białka Hsp104 są uformowane przez domeny: pierwszy pierścień - NBD1 oraz MD, a drugi przez NBD2 oraz CTD. Obie NBD zbudowane są z dwóch podjednostek: L (large) i S (small), należą do grupy AAA + ATPaz i zawierają wysoce konserwowane motywy: Walker A (GX4GKT/S, gdzie X oznacza dowolną resztę aminokwasową) i sensor 2 (GAR), niezbędne do wiązania nukleotydu, Walker B (YYYYDE, gdzie Y oznacza hydrofobową resztę aminokwasową) i sensor 1 (N/T), kluczowe dla hydrolizy ATP, oraz palce argininowe które są zaangażowane zarówno w wiązanie, jak i hydrolizę nukleotydu (Erzberger i Berger, 2006, Sweeny i Shorter, 2016; Biter i wsp., 2012; Heuck i wsp., 2016; Schaupp i wsp., 2007; Schirmer i wsp., 2001; Zeymer i wsp., 2014). Miejsce wiązania ATP znajduje się na granicy podjednostek tworzących heksamer zarówno w NBD1, jak i NBD2 (Heuck i wsp., 2016; Yokom i wsp., 2016) (Ryc. 3A).



Rycina 3 | Motywy strukturalne w NBD1 i NBD2 odpowiedzialne za wiązanie i hydrolizę ATP oraz translokację peptydu. A | Kieszonki nukleotydowe w domenach wiążących nukleotyd (NBD1 i NBD2). Zarówno w NBD1 jak i NBD2 na granicy podjednostek P4 (kolor niebieski) oraz P3 (kolor zielony) występują miejsca wiązania i hydrolizy ATP. Na modelu zaznaczono motywy: Walkera A (żółty kwadrat), Walkera B (zielony kwadrat), sensor 1 (niebieski kwadrat), sensor 2 (różowy kwadrat) oraz miejsce palca argininowego (czerwony kwadrat). **B | Model obrazujący rozmieszczenie pętli tyrozynowych wewnątrz kanału białka Hsp104.** Do światła kanału zarówno w NBD1 jak i NBD2 są prezentowane pętle tyrozynowe, które wiążą i translokują łańcuch polipeptydowy przez kanał dezagregazy. Odległość pomiędzy poszczególnymi pętlami tyrozynowymi w kanale wynosi od 6-7Å. Reszty K256 i K258 w NBD1 jak i reszta V663 w NBD2, wystają w kierunku sąsiednich pętli tyrozynowych, stabilizując układ spiralny. Zmodyfikowano na podstawie: Yokom i wsp., 2016; Gates i wsp., 2017.

W obrębie obydwu NBD do światła kanału centralnego eksponowane są pętle zawierające konserwowane reszty tyrozyny, które tworzą układ schodkowy. Reszty tyrozyn oddziałują z dodatnio naładowanymi i aromatycznymi resztami w łańcuchu polipeptydowym i translokują go przez NBD1 oraz NBD2 (Weibezahn i wsp., 2004; Schlieker i wsp., 2004, Tessarz i wsp., 2008, Sweeny i wsp., 2015; Deville i wsp., 2017; Gates i wsp., 2017) (Ryc. 3B). Wyniki badań wskazują, że NBD2 stanowi główny motor napędzający translokację łańcucha polipeptydowego, chociaż aktywność NBD1 jest wystarczająca do dezagregacji. Wydajna hydroliza ATP w przynajmniej jednej z dwóch NBD stabilizuje oddziaływanie Hsp104-substrat. Badania pokazały także, że im wydajniejsza hydroliza ATP, tym szybszy i wydajniejszy proces dezagregacji (Franzmann i wsp., 2011; Hattendorf i Lindquist, 2002; Lum i wsp., 2008; Schaupp i wsp., 2007; Shorter i Lindquist, 2006; Woo i wsp., 1992).



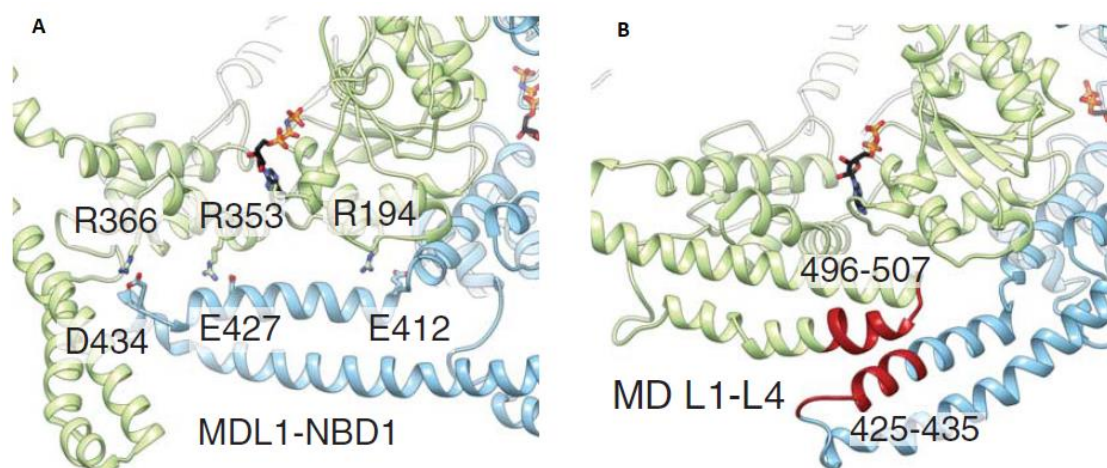
Rycina 4 | Model zmian konformacyjnych białka Hsp104 podczas translokacji polipeptydu. Podczas procesu dezagregacji białko Hsp104 przyjmuje dwie główne konformacje: otwartą (nieaktywną), w której poszczególne podjednostki heksameru są ze sobą luźno związane, oraz zamkniętą podczas której następuje hydroliza ATP i translokacja polipeptydu przez kanał centralny. W konformacji otwartej podjednostka P1 znajduje się w najwyższym położeniu, a heksamer przyjmuje strukturę lewoskrętnej spirali. Po związaniu łańcucha, heksamer przechodzi do konformacji zamkniętej, gdzie podjednostka P6 przesuwa się o około 65 Å w górę białka i obraca się w kierunku kanału, co powoduje powstanie struktury prawoskrętnej i zwężenie kanału o około 10 Å. Dzięki tym zmianom konformacyjnym, powiązanych z hydrolizą ATP możliwa jest translokacja łańcucha polipeptydowego przez kanał. Zmodyfikowano na podstawie: Gates i wsp., 2017.

W przeciągnięciu polipeptydu przez kanał jest bezpośrednio zaangażowanych pięć podjednostek heksameru, które ułożone są spiralnie co około 8-10 Å, oplatając translokowany łańcuch. Szósta podjednostka nie oddziałuje z substratem, tworzy łącznik zamykający heksamer. Przez ułożenie spiralne heksameru, szósta podjednostka jest opuszczona znacznie niżej, niż pierwsza (różnica wysokości pomiędzy podjednostkami 6 a 1 wynosi około 50 Å), przez co oddziałuje swoją NBD1 z NBD2 podjednostki pierwszej, inaczej niż w reszcie heksameru, gdzie poszczególne podjednostki oddziałują tymi samymi domenami: NBD1-NBD1 i NBD2-NBD2. Opisano również inną strukturę heksameru Hsp104, w której wszystkie podjednostki oddziałują z substratem. Obecnie wydaje się, że mechanizm translokacji łańcucha obejmuje przeciwne do ruchu wskazówek zegara cykliczne zmiany konformacyjne, obejmujące te dwie struktury (Yokom i wsp. 2016; Gates i wsp., 2017) (Ryc. 4).

Związanie nukleotydów w NBD1 i NBD2 jest różne w zależności od ułożenia podjednostek w heksamerze. W strukturze całkowicie zaangażowanej w związanie

substratu podjednostka w najwyższej pozycji wiąże ATP, natomiast hydroliza ATP zachodzi w podjednostkach na niższych pozycjach (Gates i wsp., 2017).

Z NBD1 oddziałuje domena M (MD). MD jest zbudowana z czterech α -helis, tworzących strukturę typu „colied coil” przypominającą śmigło. Cztery α -helisy zostały pogrupowane w dwa motywy: motyw 1 – zawierający helisę 1 i część helisy 2 – oddziałujący z kolejną podjednostką w heksamerze oraz motyw 2 - obejmujący helisę 3, 4 i drugą część helisy drugiej, oddziałujący z NBD1L tej samej podjednostki. Domena M oddziałuje z NBD1 kolejnej podjednostki tworząc mostki solne pomiędzy resztami R419, E427 i D434 w MD oraz E190, R353 i R366 w NBD1 (Ryc. 5A) (Wendler i wsp., 2007; Dulle i wsp., 2014; Oguchi i wsp., 2012). W heksamerze domeny M oplatają NBD1 oddziałując między sobą sposobem typu „głowa-ogon” (Ryc. 5B) (Lee i wsp., 2003; Carroni i wsp., 2014; Sweeny i wsp., 2015; Heuck i wsp., 2016; Yokom i wsp., 2016; Gates i wsp., 2017). Białko w takiej konformacji jest nieaktywne, dopiero interakcja MD z białkiem Hsp70 powoduje zerwanie oddziaływania z NBD1, a co za tym idzie, zmiany konformacyjne heksameru, hydrolizę ATP oraz translokację polipeptydu przez kanał Hsp104 (Mogk i wsp. 2015). Mutacje w MD powodują deregulację aktywności ATPazy, co wskazuje, że domena ta pełni funkcję allosterycznego regulatora w procesie dezagregacji (Gates i wsp., 2017; Haslberger i wsp., 2007). Analiza wariantów ClpB z mutacjami w tej domenie wykazała dwie klasy mutantów: represyjne i hiperaktywne (Oguchi i wsp., 2012; Seyffer i wsp., 2012). W przypadku mutantów represyjnych domeny M, ClpB jest nieaktywny dezagregacyjnie i wykazuje silne oddziaływanie między motywem 2 MD i NBD1. Warianty hiperaktywne zaburzają oddziaływanie pomiędzy MD a NBD1 charakteryzują się zwiększoną aktywnością dezagregacyjną oraz wykazują wysoką aktywność ATPazową w obecności substratu. (Haslberger i wsp., 2007; Oguchi i wsp., 2012; Seyffer i wsp., 2012; Lipinska i wsp., 2013).



Rycina 5 | Model oddziaływania pomiędzy NBD a MD oraz MD - MD w białku Hsp104. A | Oddziaływanie MD z NBD1. W strukturze białka Hsp104 związanego z AMP zidentyfikowano oddziaływanie pomiędzy helisą L1 MD (kolor niebieski) a NBD1 kolejnej podjednostki (kolor zielony). Mostki solne powstałe pomiędzy resztami E412-R194, E427-R353 i D434 - R366 stabilizują strukturę dezagregazy w formie nieaktywnej. **B | Oddziaływanie MD - MD.** W strukturze związanej z ADP zidentyfikowano oddziaływanie pomiędzy domenami M sąsiadujących podjednostek w heksamerze. Region helisy L1 pierwszej MD oddziałuje z helisą L3 sąsiedniej MD, tworząc stabilny pierścień oplatający NBD. Zmodyfikowano na podstawie: Gates i wsp., 2017.

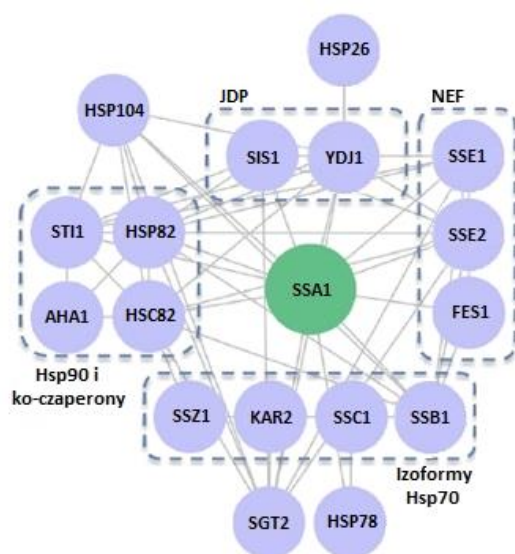
Na końcu NBD2 białka Hsp104 u drożdży *S. cerevisiae* znajduje się 38 aminokwasowy odcinek, będący C-kończącą domeną (CTD). Domena ta ma istotne znaczenie w stabilizacji heksameru – delecja tego fragmentu powoduje zahamowanie aktywności ATPazowej, ze względu na brak możliwości tworzenia heksameru. Na końcu CTD białka Hsp104 występuje sekwencja DDVD, służąca do oddziaływania z motywem TRP, która może służyć jako punkt dokowania dla innych białek biorących udział w przetwarzaniu łańcucha polipeptydowego opuszczającego kanał Hsp104 (Abbas-Terki i wsp., 2001; Cashikar i wsp., 2002; Mackay i wsp., 2008). Z motywem DDVD może wiązać się m.in. białko Sti1. Może to sugerować, że białko Sti1 jest łącznikiem pomiędzy Hsp104 a innymi białkami na końcowym etapie dezagregacji, uczestnicząc w przekazywaniu polipeptydu opuszczającego kanał Hsp104 (Lum i wsp., 2004; Abbas-Terki i wsp. 2001; Wegele i wsp., 2003).

3.3.2. Ssa1

Genom drożdży *S. cerevisiae* zawiera geny kodujące 4 cytozolowe formy Hsp70: białka Ssa1, Ssa2, Ssa3 i Ssa4. Ssa1 i -2 są ekspresjonowane konstytutywnie, podczas gdy ekspresja Ssa3 i -4 jest indukowana szokiem termicznym. Delecja wszystkich genów kodujących białka Ssa prowadzi do zaburzeń wzrostu i funkcjonowania komórki (Newcomb i wsp., 2003). Izoformy białka Ssa

są strukturalnie podobne i pełnią podobne funkcje komórkowe. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej do sekwencji Ssa1 wynosi: dla Ssa2~97%, dla Ssa3~79%, a dla Ssa4~81% (Sharma i wsp., 2009).

W procesie dezagregacji główną rolę odgrywa białko Ssa1. Białko to pełni również szereg rozmaitych funkcji w komórce, uczestniczy m.in.: w fałdowaniu nowo zsyntetyzowanych białek, translokacji polipeptydów do mitochondriów, chloroplastów czy retikulum endoplazmatycznego (ER), montażu i demontażu kompleksów białkowych, regulacji aktywności białek oraz w przekazywaniu substratów do innych białek opiekuńczych, takich jak np. Hsp90. Ponadto Hsp70 uczestniczy również w odpowiedzi komórkowej związanej ze stresem, m.in. zapobiega agregacji białek, rozwija zagregowane białka samodzielnie lub we współpracy z np. Hsp100, promuje ponowne fałdowanie nieprawidłowo sfałdowanych lub niezwiniętych białek i współpracuje z systemami degradacji komórkowej, takimi jak autofagia czy układ ubikwityna-proteasom (UPS) (Rosenzweig i wsp., 2019). Dzięki wielofunkcyjności Hsp70 wykazuje ono zdolność do oddziaływania z bogatą pulą innych białek opiekuńczych (Ryc. 6) (Truman i wsp., 2012).

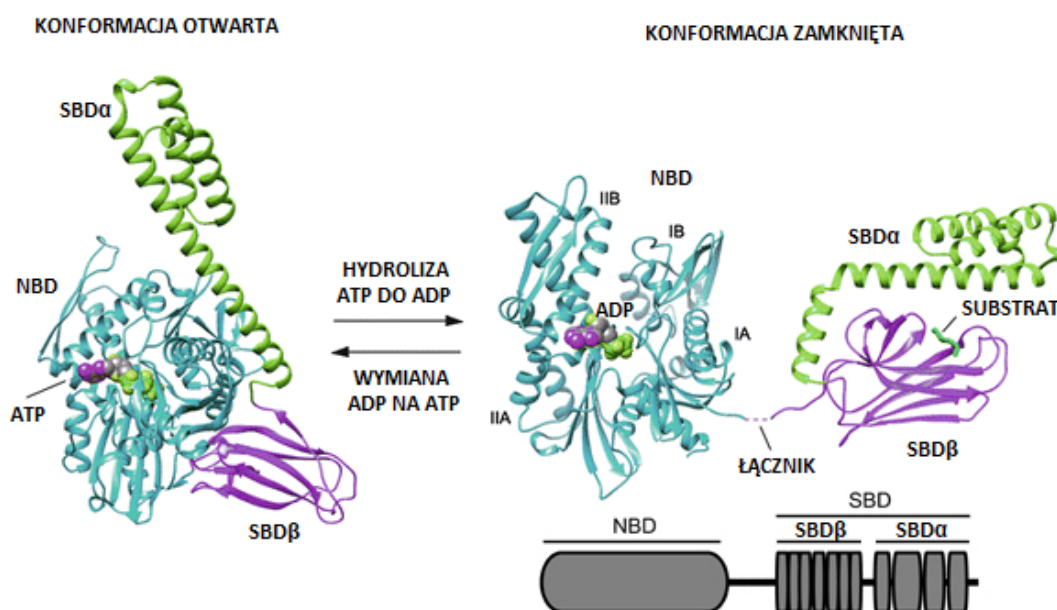


Rycina 6 | Sieć oddziaływań białka Ssa1 z białkami opiekuńczymi. Wśród 317 potencjalnych partnerów przedstawiono 17 białek opiekuńczych zaangażowanych w oddziaływanie z białkiem Ssa1. Dzięki zdolności oddziaływania z dużą liczbą białek, Ssa1 pełni szereg rozmaitych funkcji w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. Zmodyfikowano na podstawie Truman i wsp., 2012.

Ssa1 jest jednym z kluczowych elementów systemu dezagregacyjnego (Hartl i wsp., 2002; Louw i wsp., 2010). Składa się z dwóch funkcjonalnych domen: domeny wiążącej nukleotydy (NBD) znajdującej się na N-końcu białka, zbudowanej z czterech subdomen (IA, IIA oraz IB, IIB), które tworzą kieszeń, w obrębie której dochodzi do wiązania i hydrolizy nukleotydów adeninowych. Dodatkowo domena ta odpowiada za oddziaływanie z białkami JDP, NEF oraz Hsp104. Drugą domeną jest domena wiążąca substrat (SBD), która znajduje się na C-końcu białka i składa się także z dwóch

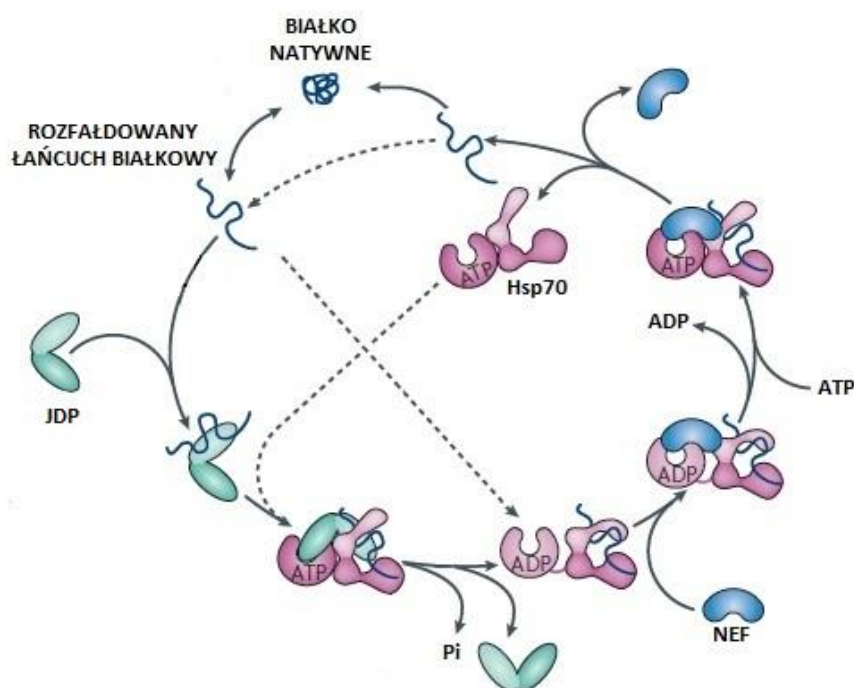
subdomen: SBD β i SBD α . SBD β o strukturze β -kanapki zawiera dwie przeciwnoległe β -kartki, które tworzą kieszeń mającą wysokie powinowactwo do hydrofobowych reszt aminokwasowych, dzięki czemu może wiązać łańcuch polipeptydowy. SBD α jest zbudowana z 5 α -helis o kształcie pokrywy, która ma zdolność uginania się i zasłonięcia kieszeni wiążącej substrat w domenie SBD β . Pomiędzy NBD i SBD występuje krótka sekwencja aminokwasowa, tzw. łącznik, która jest wysoce konserwowana i pozwala przesyłać sygnały między domenami (Ryc. 7) (Qi i wsp., 2013; Rosenzweig i wsp., 2013; Doyle i wsp., 2015).

Białka z rodziny Hsp70 mają zdolność wiązania się z odsłoniętymi łańcuchami polipeptydowymi złożonymi głównie z hydrofobowych reszt aminokwasowych, co zapobiega łączeniu się i grupowaniu takich struktur w agregaty. W białkach natywnych opisane powyżej regiony są ukryte we wnętrzu białka, jednakże w nieprawidłowo sfałdowanych strukturach są eksponowane na zewnątrz (Rudiger i wsp., 1997). Zdolność oddziaływania z takimi regionami jest ściśle regulowana przez oddziaływanie z ko-chaperonami: JDP: Ydj1 i Sis1 oraz NEF: Sse1 i Sse2, Fes1 i Snl1, które regulują cykl ATPazowy (Ryc. 8) (Weibezahn i wsp., 2005).



Rycina 7 | Struktura białka Hsp70 - wpływ nukleotydów na zmiany konformacyjne. Białka z rodziny Hsp70 zbudowane są z dwóch domen: domeny wiążącej nukleotyd (NBD) podzielonej na cztery subdomeny IA, IIA i IB, IIB (kolor niebieski) oraz z domeny wiążącej substrat (SBD) podzielonej na SBD α – mobilna część domeny zbudowana z 5 α helis (kolor zielony) oraz z SBD β – zbudowanej z β -kartki z miejscem do wiązania substratu (kolor fioletowy). Pomiędzy obiema domenami znajduje się sekwencja aminokwasowa, tzw. łącznik, odpowiedzialny za komunikację między domenami. Konformacja otwarta Hsp70 występuje, gdy w domenie NBD jest związane ATP. SBD α zostaje odgięta i oddziałuje z NBD, przez co miejsce wiązania substratu w SBD β zostaje odsłonięte. Hydroliza ATP do ADP powoduje zamknięcie się SBD α i zablokowanie substratu w SBD β (konformacja zamknięta). Model białka w konformacji otwartej został stworzony na podstawie struktury krystalicznej drożdżowego Sse1 (Hsp110; PDB 2QXL), model białka w konformacji zamkniętej został stworzony na podstawie DnaK z *E.coli* (HSP70; PDB 2KHO). Zmodyfikowano na podstawie Budina i wsp., 2015.

Prawidłowe funkcjonowanie białka Ssa1 jest związane z dwiema allosterycznie sprzężonymi właściwościami: zdolnością do wiązania substratów białkowych w SBD, a także z cyklami wiązania i hydrolizy ATP w NBD. Związanie ATP wywołuje zmianę konformacyjną w domenie wiążącej substrat: otwarcie się pokrywy (SBD α), co umożliwia swobodny dostęp do kieszeni wiążącej łańcuch polipeptydowy. W tej konformacji peptydy asocjują i dysocjują stosunkowo szybko oddziałując tylko przez wiązania jonowe z kieszenią wiążącą SBD β . Natomiast hydroliza ATP w NBD i powstanie ADP skutkuje zamknięciem się pokrywy w SBD α i zablokowaniem obecnego w kieszeni substratu. Opisany wyżej mechanizm, który angażuje obie domeny białka Ssa1, jest powtarzany cyklicznie. Hydroliza nukleotydów jest etapem, który ogranicza szybkość cyklu i odpowiada za zmiany konformacyjne w domenach oraz zmiany w powinowactwie do substratów (Kampinga i wsp., 2010; Golas i wsp., 2012).



Rycina 8 | Cykl nukleotydowy Hsp70. Prawidłowe funkcjonowanie białka Hsp70 jest zależne od hydrolizy ATP. W strukturze związanej z ATP, domena SBD α jest odgięta, przez co odsłonięte jest miejsce wiązania dla łańcucha polipeptydowego w SBD β . Białko JDP dostarcza polipeptyd do białka Hsp70, jednocześnie pobudzając hydrolizę ATP, a co za tym idzie powodując zatrzaśnięcie się SBD α na łańcuchu polipeptydowym. Oddziaływanie z NEF powoduje oddysocjowanie ADP z miejsca wiążącego nukleotyd, otwarcie SBD α i uwolnienie łańcucha polipeptydowego. Cykl może być wielokrotnie powtarzany przez wiązanie i hydrolizę kolejnych cząsteczek ATP. Zmodyfikowano na podstawie: Kampinga i Craig, 2010.

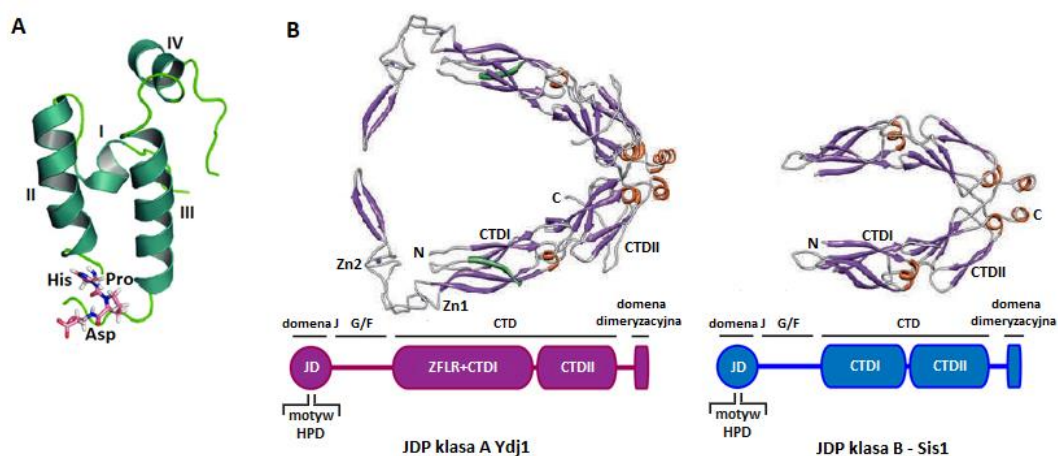
Oddziaływanie z białek JDP (Ydj1 i Sis1) z agregatem, stabilizuje uwięzione łańcuchy polipeptydowe, które są eksponowane białku Hsp70. Z drugiej strony oddziaływanie białek JDP z Ssa1 przyspiesza hydrolizę ATP do ADP w NBD białka Hsp70, dzięki czemu następuje zamknięcie SBD α i unieruchomienie eksponowanego łańcucha polipeptydowego w SBD β (Kampinga i wsp., 2010). Następnie uwolnienie ADP z NBD wspomaganie przez NEF, umożliwia otwarcie pokrywy (SBD α) i dysocjację łańcucha polipeptydowego z SBD β oraz powtórzenie całego cyklu. W ten sposób JDP i NEF regulują cykl ATPazowy białka Hsp70, tzn. odpowiadają za to, jak długi czas Hsp70 spędza w stanie związanym z ADP, o wysokim powinowactwie do substratu lub w stanie niskiego powinowactwa, gdy w NBD związane jest ATP (Mayer i Bukau, 2005; Alderson i wsp., 2016; Balchin i wsp., 2016).

3.3.3. JDP: Ydj1 i Sis1

W proteomie drożdży *S. cerevisiae* występują 22 białka należące do rodziny JDP (Hsp40), które pełnią szereg zróżnicowanych funkcji (Qiu wsp., 2006). W procesie dezagregacji ważną rolę odgrywają dwa cytozolowe białka: Ydj1 i Sis1. Oba białka należą do rodziny białek typu J i ze względu na budowę można je przydzielić do dwóch typów: Ydj1 – typ 1 (klasa A) a Sis1 – typ 2 (klasa B). W obu przypadkach na N-końcu znajduje się domena J, zbudowana z 4 α -helis, gdzie helisy II i III są ułożone przeciwrównoległe i połączone pętlą zawierającą wysoce konserwatywny motyw HPD (Ryc.9A) (Laufen i wsp., 1999; Walsh i wsp., 2004). Motyw HPD jest niezbędny do stymulacji aktywności domeny NBD białka Hsp70. Oddziaływanie pomiędzy motywem HPD białek JDP a NBD białka Hsp70 stymuluje około 1000-krotnie hydrolizę ATP (Jordan i McMacken, 1995), dzięki czemu następuje zmiana konformacji z otwartej na zamkniętą oraz stabilne związanie substratu w SBD białka Hsp70. Domena J jest oddzielona od reszty białka elastycznym łącznikiem o długości od 50 do 100 reszt aminokwasowych, bogatym w glicynę i fenyloalaninę (region G/F). Region ten jest odpowiedzialny za poprawne ułożenie domeny J podczas interakcji z Hsp70 (Kampinga i Craig, 2006; Rajan i D'Silva, 2009). Za regionem łącznikowym w białku Ydj1 występuje domena „palca cynkowego” (ZFLR). Domena ta odgrywa rolę w oddziaływaniu z Hsp70 oraz w wiązaniu łańcuchów polipeptydowych (Lu i Cyr, 1998; Walsh i wsp., 2004). Dodatkowo oba omawiane białka zawierają domenę

C-kończącą (CTD), podzieloną na dwa regiony (CTDI i CTDII). Na końcu tej domeny znajdują się krótka C-końcowa α -helisa z sekwencją niezbędną do dimeryzacji (Ryc.9B) (Craig, i wsp., 2006).

Pośród funkcji JDP można wymienić m.in.: fałdowanie powstających łańcuchów polipeptydowych, transport białek przez błony; składanie i dysocjacja kompleksów białkowych; degradacja niestabilnych, nieprawidłowo sfałdowanych lub zagregowanych białek oraz kontrolowanie stabilności i aktywności białek (Bukau i Horwich 1998; Kampinga i Craig 2010; Mayer i wsp., 2001; Mayer i Bukau 2005). JDP są najważniejszymi partnerami Hsp70, ponieważ ani Hsp70, ani JDP nie mogą funkcjonować bez siebie nawzajem (Kampinga i Craig 2010). Ydj1 i Sis1 występują w komórce w najwyższym stężeniu w porównaniu do innych JDP. Omawiane białka stymulują aktywność ATPazową drożdżowych Hsp70 w tym: cytozolowych - Ssa1, Ssa2, Ssa3 i Ssa4 a także Ssb1 i Ssb2, mitochondrialnych - Ssc1, Ssc3, Ssq1 oraz endoplazmatycznego Kar2 (Verghese J., i wsp., 2012b) i są niezbędne do remodelowania agregatów białkowych przez system Hsp70-Hsp104.



Rycina 9 | Charakterystyka strukturalna białek JDP. A | Struktura domeny J. Wszystkie białka JDP zawierają w swojej budowie charakterystyczny motyw strukturalny tzw. domenę J, która zbudowana jest z 4 α -helis. W pętli pomiędzy helisami II i III znajduje się silnie konserwowany motyw HPD (His-Pro-Asp), niezbędny do stymulacji aktywności ATPazowej partnerów białek JDP. Helisa II wraz z pętlą zawierającą motyw HPD jest miejscem oddziaływania z białkami Hsp70. Model domeny J stworzono na podstawie ludzkiego DNAJB1 (PDB: 1HDJ) zmodyfikowano na podstawie: Musskopf i wsp., 2018; **B | Struktura białek Ydj1 i Sis1.** Oba białka przedstawiono w formie dimeru. W strukturze na N-końcu zarówno białka Ydj1 jak i Sis1 występuje domena J, która połączona jest z resztą białka, elastycznym regionem G/F bogatym w reszty Gly i Phe (nie przedstawiono na rycinie). Następnie w obu białkach występuje domena CTD zbudowana z β -kardtek, podzielona na CTDI i CTDII. W białku Ydj1 w regionie CTDI występują dwa motywy palca cynkowego (Zn1 i Zn2). Za domeną CTD na C-końcu białek występuje domena dimeryzacyjna. Modele stworzone na podstawie: Ydj1 (PDB: 1NLT i 1XAO) i Sis1 (PDB: 1C3G). Zmodyfikowano na podstawie: Kampinga i Craig 2010; Nillegoda i Bukau 2015.

Pokazano, że Sis1 angażuje Hsp70-Hsp104 podczas propagacji prionów ([PSI⁺], [RNQ⁺] i [URE3]) (Higurashi i wsp., 2008) oraz uczestniczy przy odpowiedzi na stres oksydacyjny (Hill i wsp., 2017). Natomiast Ydj1 jest głównym białkiem uczestniczącym w dezagregacji agregatów powstałych podczas szoku termicznego (Reidy, i wsp., 2014; Hill i wsp., 2017). Jednocześnie, eksperymenty *in vitro* pokazały, że zarówno Sis1 jak i Ydj1 skutecznie uczestniczą przy reaktywacji termicznie wytworzonych agregatów GFP i lucyferazy (Yu i wsp., 2015).

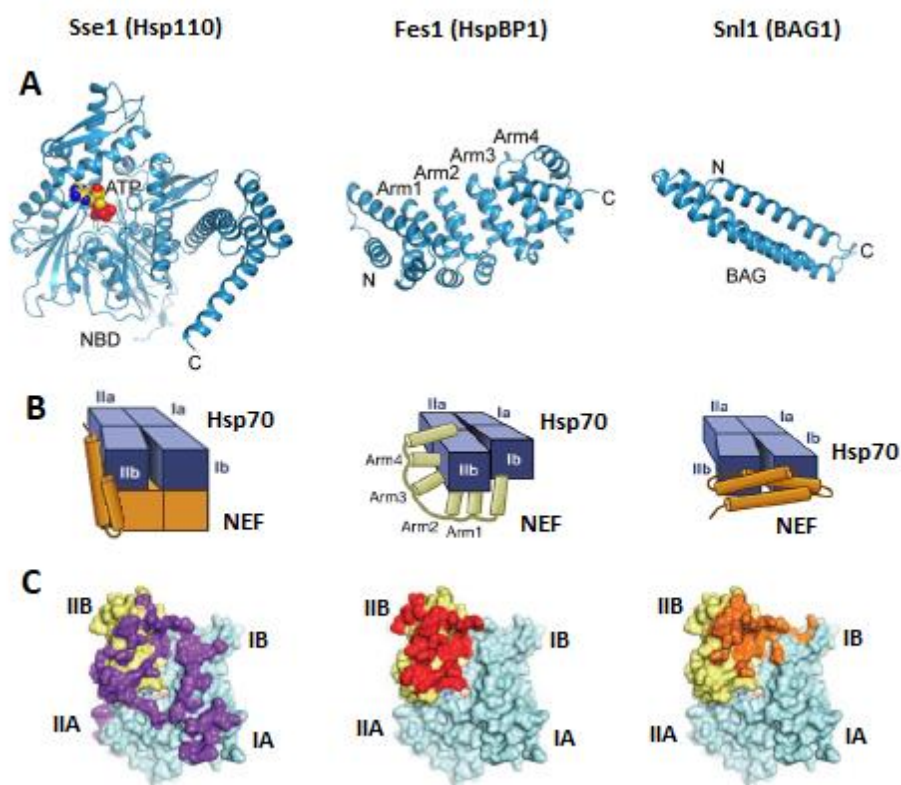
3.3.4. Czynniki wymiany nukleotydów – NEF: Sse1 i Sse2, Fes1 i Snl1

U drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano 3 grupy białek odgrywające rolę czynników wymiany nukleotydów: Sse1 and Sse2 (z rodziny białek Hsp110), Fes1 (HspBP1) and Snl1 (Bag-1) (Kabani M., 2009). Wszystkie te białka biorą udział w uwolnieniu ADP z NBD białka Hsp70.

Najbardziej efektywnymi czynnikami wymiany nukleotydów (NEF) u drożdży są białka należące do rodziny Hsp110 (Dragovic i wsp. 2006b). Białka Sse1 i Sse2, spośród wszystkich NEF, występują w komórce na najwyższym poziomie (Sse1 – ok. 70000 cząsteczek/na komórkę, Sse2 – 3500-4500 cząsteczek/na komórkę (Ghaemmaghami i wsp., 2003). Są strukturalnie spokrewnione z białkiem Ssa1, jednakże wyspecjalizowały się w innych funkcjach komórkowych. Sse1 i Sse2 posiadają podobnie jak Hsp70 dwie domeny: NBD i SBD, jednak w Hsp110 łącznik pomiędzy subdomenami SBD α i SBD β jest dłuższy i zbudowany z polarnych reszt aminokwasowych. Ponadto, białko Ssa1 do prawidłowego funkcjonowania wymaga ścisłej regulacji allosterycznej domen NBD i SBD (Mayer i Bukau., 2005). Pomimo podobnej struktury, w białku Sse1 nie zaobserwowano takiej regulacji, tzn. nie zaobserwowano otwierania się SBD po związaniu ATP (Andréasson i wsp., 2008). Białka Sse1 i Sse2 oddziałują z białkiem Ssa1 (zaobserwowano także oddziaływanie z białkiem Ssb1 i Ssb2 (Shaner i wsp., 2005; Abrams i wsp., 2014)) tworząc heterodimer, w konformacji związanej z ATP (Shaner i wsp., 2006). Głównym miejscem oddziaływania pomiędzy tymi cząsteczkami są domeny NBD, gdzie sub-domeny IA i IB Ssa1 oddziałują z sub-domenami IIA i IIB białka Sse1. SBD α białka Sse1 odgrywa kluczową rolę w procesie wymiany nukleotydu. Przez oddziaływanie z górnym regionem IIB białka Ssa1, następuje zmiana konformacji białka i uwolnienie ADP (Andréasson i wsp., 2008). Dodatkowo Hsp110 pełni funkcję

holdaz, czyli mogą wiązać zdenaturowane polipeptydy, hamując ich agregację (Oh i wsp., 1999), a także mogą transportować takie substraty do Hsp70 (Dragovic i wsp. 2006b), jednak nie są zdolne do ponownego fałdowania takiego łańcucha (Polier i wsp., 2010; Goeckeler i wsp., 2008; Xu i wsp., 2012) (Ryc.10).

Wykazano, że Sse1 jest wymagane do propagacji prionów [PSI⁺] (Fan i wsp., 2007), a także uczestniczy w zależnej od Hsp70 ubikwitynacji i degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek (Heck i wsp., 2010). Delecja genu kodującego Sse1 skutkuje powolnym wzrostem komórek i wrażliwością na szok termiczny, w przeciwieństwie do szczepu *sse2Δ* u którego nie zaobserwowano żadnych zmian. Jednoczesna delecja obu białek jest letalna (Mukai i wsp., 1993), ale może być częściowo rekompensowana przez nadekspresję białka Fes1 (Abrams i wsp., 2014).



Rycina 10 | Charakterystyka białek NEF: Sse1 (Hsp110), Fes (HspBP1) oraz Snl1 (BAG1). **A | Struktura białek NEF.** Białko Sse1 zawiera dwie funkcjonalne domeny: NBD i SBD i wykazuje znaczne podobieństwo strukturalne do białka Ssa1. Białko Fes1 zbudowane jest z czterech powtórzeń motywu Armadillo (ARM), natomiast białko Snl1 składa się z helikalnej domeny BAG. Modele białek stworzone na podstawie Sse1 – PDB: 3D2F, Fes (HspBP1) - PDB:1XQS i Snl1 (BAG1) PDB: 1HX1. Zmodyfikowano na podstawie: Bracher i Verghese 2015. **B | Schemat oddziaływań pomiędzy NBD białka Hsp70 a NEF.** Domena NBD białka Sse1 oddziałuje z domeną NBD białka Hsp70, dodatkowo SBD Sse1 oddziałuje z regionem IIB powodując otwarcie się kieszeni wiążącej nukleotydy. W białku Fes1 powtórzenia Armadillo oplatają region IIB białka Hsp70 powodując wymianę nukleotydu. Domena BAG w białku Snl1 oddziałuje z regionem IIB i IB otwierając kieszeń nukleotydomową. Kolorem niebieskim zaznaczono NBD białka Hsp70 z wyszczególnionymi subdomenami, kolorem pomarańczowym lub szarym zaznaczono poszczególne NEF. Zmodyfikowano na podstawie: Bukau i wsp., 2006. **C | Regiony NBD białka Hsp70 zaangażowane w oddziaływanie z NEF.** W oddziaływanie z białkiem Sse1 zaangażowana jest większa część domeny NBD białka Hsp70 (kolor fioletowy). Oddziaływanie pomiędzy Fes1 a Hsp70 skupia się w rejonie IIB NBD (kolor czerwony), natomiast pomiędzy Snl1 a Hsp70 oprócz rejonu IIB zaangażowana jest także część rejonu IA (kolor pomarańczowy). Zmodyfikowano na podstawie: Li i wsp., 2013.

Białko Fes1 jest drugim pod względem liczebności w komórce czynnikiem wymiany nukleotydów (14000 cząsteczek/na komórkę (Ghaemmaghami i wsp., 2003)). Zbudowane jest z 4 powtórzeń motywu ARM (Armadillo motif) (Shomura i wsp., 2005; Dragovic i wsp., 2006a). Głównym miejscem oddziaływania z Ssa1 jest subdomena IIB. Fes1 wywołuje destabilizację NBD Ssa1 wraz z utratą trzeciorzędowej struktury tej domeny, z wyłączeniem subdomeny IIB, co prowadzi do uwolnienia ADP (Andréasson i wsp., 2008). Badania *in vivo* wykazały, że komórki z delecją genu kodującego białko Fes1 są podatne na szok termiczny, co sugeruje, że białko to odgrywa istotną rolę w termotolerancji (Kabani i wsp., 2002). Dodatkowo białko Fes1 bierze udział w propagacji prionów [URE3] (Kryndushkin i Wickner, 2007) oraz uczestniczy w degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek (Gowda i wsp., 2013) (Ryc.10).

Ostatnim z białek biorących udział w wymianie nukleotydów u drożdży *S. cerevisiae* jest białko Snl1, które zawiera domenę BAG. Snl1 jest białkiem transmembranowym, zakotwiczonym w błonie retikulum endoplazmatycznego poprzez N-koniec (Sondermanni i wsp., 2002). Podczas wymiany ADP, Snl1 oddziałuje głównie z subdomeną IIB, ale także z subdomeną IB, powodując zmiany konformacyjne NBD białka Ssa1 (Ryc.10). Dodatkowo wykazano, że białko to oddziałuje z rybosomem (Gowda i wsp., 2013). Delecja genu kodującego białko Snl1 nie wpływa na przeżycie komórek drożdży (Abrams i wsp., 2014).

NEF są odpowiedzialne za uwolnienie ADP z NBD białka Hsp70, a co za tym idzie, zwiększają pulę Hsp70 w konformacji związanej z ATP zdolnej do oddziaływania z nieprawidłowo zwiniętymi białkami, co jest niezwykle ważne podczas szoku termicznego, gdyż umożliwia wiązanie Hsp70 do agregatów białkowych (Kaimal i wsp., 2017).

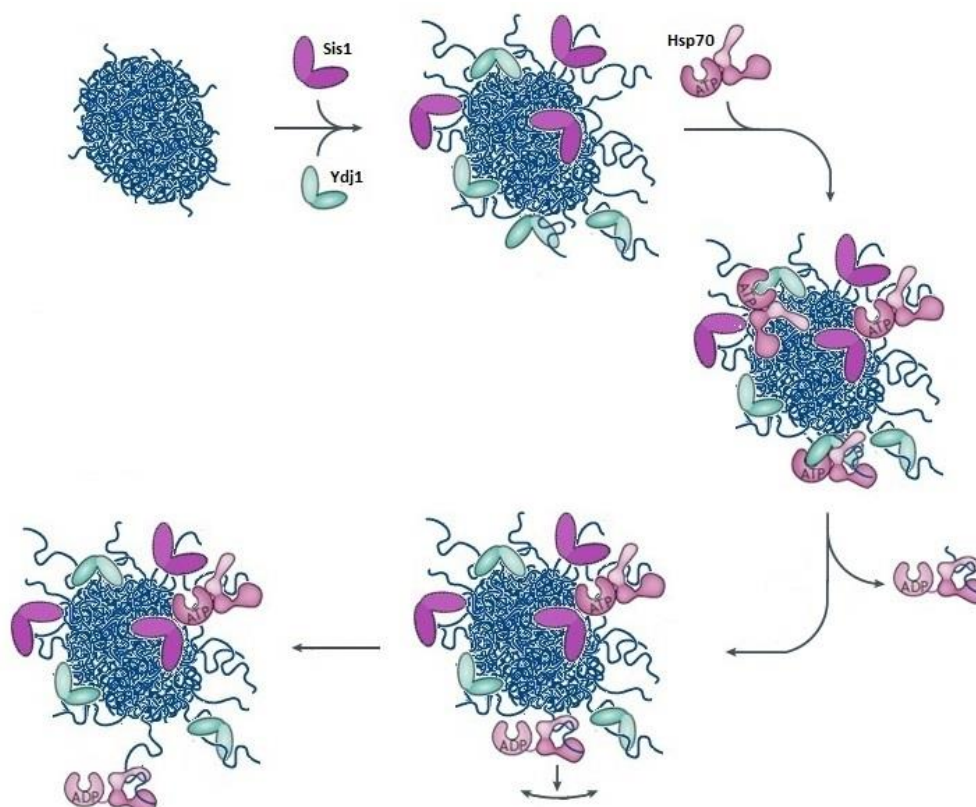
3.4. Funkcje białka Hsp70 podczas procesu dezagregacji

Białko Hsp70 odgrywa bardzo ważną rolę w procesie dezagregacji i uczestniczy na każdym etapie tego procesu, od momentu w którym JDP wiążą się do powierzchni agregatu i rekrutują Hsp70 w celu wstępnej rearanżacji jego powierzchni (przebudowy agregatu w celu wyswobodzenia łańcuchów polipeptydowych), poprzez rekrutację Hsp104 do kompleksu Hsp70/JDP/agregat, aktywację dezagregazy w celu translokacji łańcucha polipeptydowego, aż po ponowne zwijanie łańcucha opuszczającego kanał dezagregazy (Bukau i wsp., 2000; Hartl i Hayer- Hartl, 2002; Liu i wsp., 2003).

3.4.1. Rearanżacja agregatów białkowych przez system Hsp70/JDP

Hsp70 jest wymagane na początkowych etapach procesu dezagregacji. Uczestniczy w wyswobodzeniu łańcuchów polipeptydowych z agregatów współdziałając razem z JDP (Ryc.11) (Zietkiewicz i wsp., 2006). Oddziaływanie Hsp70 z agregatami jest etapem ograniczającym szybkość całego procesu dezagregacji (Zietkiewicz i wsp., 2004). Samodzielnie, Hsp70 nie jest zdolne wydajnie związać się z powierzchnią agregatu, tylko w obecności JDP proces ten jest efektywny. Wskazuje to, że wiązanie Hsp70 jest zależne i kontrolowane przez JDP, które bezpośrednio wiąże się do powierzchni agregatu, ułatwiając dostęp dla Hsp70. Na pierwszym etapie rearanżacji, JDP wiążą się do powierzchni agregatu, oddziałując z wolnymi, hydrofobowymi regionami łańcuchów polipeptydowych (Gamer i wsp., 1996; Langer i wsp., 1992; Schröder i wsp., 1993). Białka JDP zapobiegają dalszej agregacji oraz uczestniczą w eksponowaniu łańcucha polipeptydowego dla Hsp70. Wstępne wiązanie łańcuchów polipeptydowych przez JDP, ułatwia wiązanie Hsp70 (Lewandowska i wsp., 2007). Jak pokazano w eksperymentach *in vitro* z wykorzystaniem agregatów lucyferazy, oddziaływanie JDP-agregat jest pierwszym i bardzo ważnym etapem w procesie dezagregacji (Schroder i wsp., 1993; Lu i Cyr 1998, Zietkiewicz i wsp., 2004). Zaobserwowano specyficzność wiązania odpowiednich klas JDP do agregatów lucyferazy różnej wielkości: do dużych agregatów wiążą się białka klasy B (np. Sis1), do małych kierowane są białka klasy A (np. Ydj1). Co ciekawe, białka obu klas, tworząc mieszane kompleksy, mogą oddziaływać ze wszystkimi agregatami. Minimalny heterokompleks białek JDP na powierzchni agregatu składa się z jednego homodimeru białka klasy A wiążącego się z jednym homodimerem klasy B, co wskazuje, że w kompleksie występują cztery domeny J. Dwie domeny J są zaangażowane w interakcję między dimerami, która zachodzi poprzez oddziaływania elektrostatyczne między domeną J jednego z homodimerów a CTD drugiego homodimeru, Dwie domeny J w takim heterokompleksie pozostają wolne i są zdolne do interakcji z Hsp70, umożliwiając rekrutację dwóch cząsteczek Hsp70 na kompleks JDP bez zawady sterycznej (Nillegoda i Bukau, 2015). Do kompleksu JDP-agregat dołącza Hsp70 w konformacji związanej z ATP. Powstaje kompleks trójskładnikowy, w którym oddziaływanie pomiędzy JDP a Hsp70 powoduje hydrolizę ATP w domenie NBD białka Hsp70, a co za tym idzie, zmiany konformacyjne w domenie SBD i zatrzaśnięcie się poddomeny SBD α oraz unieruchomienie łańcucha polipeptydowego w SBD β (Han

i Christen, 2003, 2004). Dzięki temu Hsp70 może częściowo wyswobodzić łańcuch polipeptydowy ze struktury agregatu (ang. Entropic Pulling Mechanism) (De Los Rios i wsp., 2006; Sousa i Lafer, 2019). Wyswobodzony łańcuch polipeptydowy związany z kompleksem Hsp70-JDP, może zostać ponownie zwinięty przez samo białko Hsp70, lub przetransportowany do białka dezagregacyjnego Hsp104/ClpB (Acebrón i wsp., 2007).



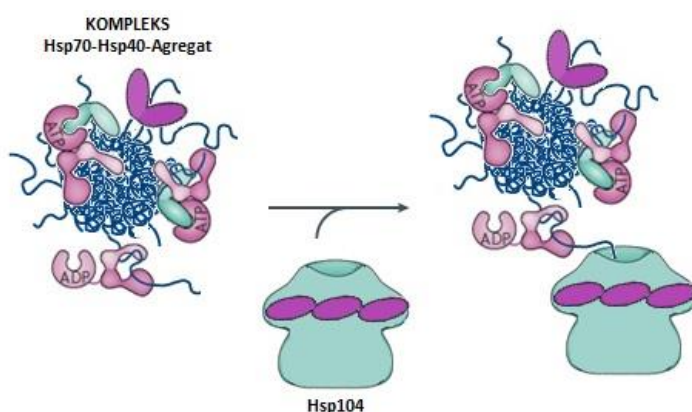
Rycina 11 | Schemat reorganizacji agregatu białkowego przez system Hsp70/JDP. W początkowym etapie dezagregacji, agregaty powstałe w wyniku czynników stresowych są rozpoznawane przez białka JDP - Ydj1 i/lub Sis1. JDP wiążą się do powierzchni agregatu, wyswabdzając pojedyncze łańcuchy. Do tak przygotowanej struktury, rekrutowane są białka Hsp70. Białko Hsp70 oddziałuje z wolnymi łańcuchami polipeptydowymi, dodatkowo interakcja z JDP powoduje hydrolizę ATP i unieruchomienie łańcucha w SBD. Krótsze łańcuchy polipeptydowe mogą zostać wyswobodzone z agregatu bezpośrednio przez Hsp70. Jednakże dłuższe łańcuchy, które są mocniej zaplątane w strukturze agregatu pozostają związane z Hsp70 zostają przeniesione do kolejnych etapów procesu dezagregacji.

3.4.2. Dokowanie dezagregazy do kompleksu Hsp70-JDP-agregat

Ważną rolą Hsp70 jest dokowanie dezagregazy do powierzchni agregatów w celu zapoczątkowania procesu dezagregacji (Ryc.12) (Saibil, 2013; Sauer i wsp., 2004). Oddziaływanie pomiędzy Hsp70 i JDP na powierzchni agregatu pozwala na przebudowę i wyswobodenie łańcuchów polipeptydowych oraz związanie ich

w SBD białka Hsp70. Badania przeprowadzone na ClpB i DnaK z *E.coli* przez Acebróna i wsp., (2009) pokazują, że związanie Hsp70 do powierzchni agregatu jest wymagane do rekrutacji dezagregazy, gdyż sama dezagregaza nie jest w stanie związać się z agregatem białkowym. Ilość cząsteczek ClpB, które są zdolne związać się z agregatem silnie zależy od zdolności DnaK/JDP do wiązania różnych agregatów białkowych (Acebrón i wsp., 2009).

Zrekrutowanie dezagregazy przez Hsp70 pozwala na przeniesienie łańcucha polipeptydowego na NTD dezagregazy. Związanie polipeptydu w hydrofobowym regionie NTD, powoduje jego stabilizację oraz odsłonięcie kanału białka, wcześniej zasłoniętego przez NTD (Rosenzweig i wsp., 2015). Zadokowanie łańcucha do powierzchni dezagregazy nie powoduje jego oddysocjowania z SBD białka Hsp70, spekuluje się, że dopiero oddziaływanie NBD białka Hsp70 z domeną M dezagregazy uwalnia substrat od Hsp70 pośrednio zastępując funkcję NEF, gdyż miejsce oddziaływania z MD i NEF pokrywają się w białku Hsp70 (Rosenzweig i wsp., 2013).



Rycina 12 | Schemat dokowania dezagregazy do kompleksu Hsp70-JDP-agregat. Wyswobodzony i związany z Hsp70 łańcuch polipeptydowy zostaje zadokowany do NTD białka Hsp104. Oddziaływanie z hydrofobowym rowkiem w NTD powoduje przesunięcie łańcucha polipeptydowego do kanału białka Hsp104.

3.4.3. Aktywacja dezagregazy Hsp100 przez oddziaływanie białka Hsp70 z domeną M.

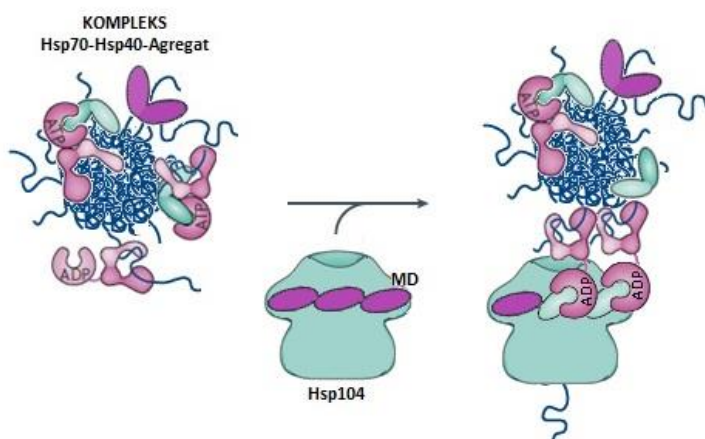
Białko Hsp70 odgrywa istotną rolę w aktywacji procesu dezagregacji (Ryc. 13). Poprzez oddziaływanie z domeną M białka Hsp100, białko Hsp70 aktywuje dezagregazę, co prowadzi do hydrolizy ATP w celu wytworzenia energii niezbędnej do translokacji łańcucha polipeptydowego (Lee i wsp., 2013; Seyffer i wsp., 2012; Rosenzweig i wsp., 2013; Oguchi i wsp., 2012; Haslberger i wsp., 2007; Miot i wsp., 2011; Sielaff i Tsai, 2010, Lum i wsp., 2004; Schlieker i wsp., 2004).

Konformacje MD stale zmieniają się między stanami stłumionymi, w których domeny M ułożone są równoległe do NBD1, a motywy 1 i 2 sąsiednich podjednostek

oddziałują ze sobą oraz stanami aktywowanymi, w których MD jest odgięta od NBD1 i odsłonięte zostaje miejsce wiązania dla Hsp70. Badania wskazują, że stany aktywne MD są krótkotrwałe i że taki stan może mieć na raz od 2 do 4 sąsiednich podjednostek w heksamerze, jednak przez większość czasu podjednostki dezagregazy występują w stanie stłumionym. Hsp70 jest zdolne do oddziaływania tylko z MD w stanie aktywnym czyli odchylonym od NBD1 (Seyffer i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013; Rosenzweig i wsp., 2013, Oguchi i wsp., 2012). Motyw 2 MD jest niezbędny dla aktywności dezagregazy oraz pośredniczy w tzw. specyficznej gatunkowo współpracy z Hsp70. Motyw 2 pełni zatem podwójną rolę regulacyjną, służąc jako powierzchnia do wiązania Hsp70, oraz jako przełącznik molekularny aktywności dezagregazy. Związanie pierwszej cząsteczki Hsp70 do MD prowadzi do przegrupowania motywu 2 i zakłócenia jego oddziaływania z NBD1 oraz uruchamia kaskadę zmian konformacyjnych w sąsiednich MD, powodując ich odgięcie i odsłonięcie miejsc oddziaływania dla kolejnych Hsp70 (Rosenzweig i wsp., 2013). Oddziaływanie pojedynczej cząsteczki Hsp70 nie jest wystarczające do aktywacji dezagregazy (Mogk i wsp., 2015). Przyjmuje się, że w białku ClpB minimum dwie cząsteczki Hsp70 związane z MD mogą działać jako najmniejsza jednostka wymagana do aktywacji (Seyffer i wsp., 2012, Mogk i wsp., 2015). Taka sytuacja ma miejsce, gdy cząsteczki Hsp70 są związane do powierzchni agregatu, dlatego wydaje się, że jest to kolejny punkt kontrolny w procesie dezagregacji, umożliwiając Hsp70 aktywację dezagregazy, a także zapobiegając dezagregacji łańcuchów przenoszonych przez pojedynczą cząsteczkę Hsp70 (Mogk i wsp., 2015; Doyle i wsp., 2007; Seyffer i wsp., 2012; Desantis i wsp., 2014). Opisany wyżej mechanizm aktywacji dezagregazy został przedstawiony tylko dla homologu bakteryjnego, co niekoniecznie może mieć przełożenie dla aktywacji dezagregazy w systemie drożdżowym. Dokładne miejsce oddziaływania pomiędzy Hsp70 a MD dezagregazy u bakterii zostało zidentyfikowane, jednakże nie wiadomo czy u drożdży za aktywację Hsp104 odpowiada ten sam region MD.

W badaniach nad bakteryjną dezagregazą wykazano, że silnie konserwowana tyrozyna w pętli pomiędzy helisami 3 i 4 MD jest odpowiedzialna za oddziaływanie z Hsp70. W białku ClpB pochodzącym z *T.thermophilus* (Rosenzweig i wsp., 2013) jak i w ClpB z *E.coli* (Haslberger i wsp., 2007) substytucja tyrozyny (odpowiednio w pozycji 494 i 503) na alaninę powoduje zerwanie oddziaływania z białkami DnaK a co za tym idzie zahamowanie procesu dezagregacji. Jednak w przeciwieństwie do

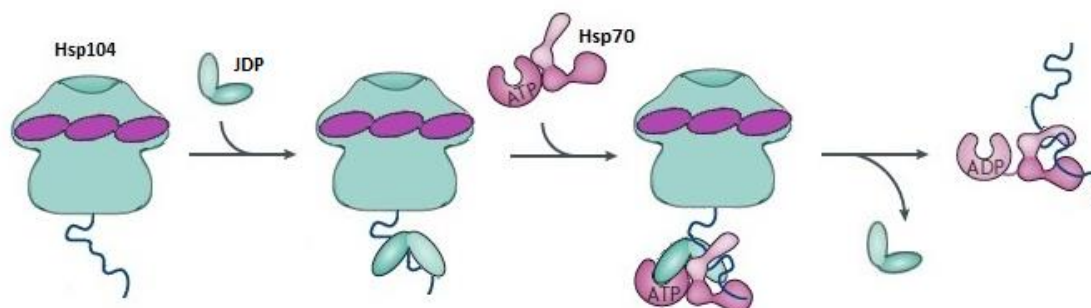
ClpB, podstawienie alaniny w miejsce konserwowanej tyrozyny w pozycji 507 w białku Hsp104 nie znosi w pełni współpracy z Hsp70 (Rozdział 6.1.) (Desantis i wsp., 2014). Pokazuje to, że drożdżowe Hsp104 i bakteryjne ClpB różnią się od siebie miejscem oddziaływania pomiędzy dezagregazą a Hsp70. Można więc przypuszczać, że za oddziaływanie między Hsp104 a Hsp70 u drożdży są odpowiedzialne inne reszty aminokwasowe, niż opisana wyżej, silnie konserwowana tyrozyna.



Rycina 13 | Schemat aktywacji dezagregazy Hsp104 przez białko Hsp70. Częsteczki białka Hsp70 związane z agregatem, oddziałują z MD białka Hsp104. Poprzez odchylenie MD od NBD1 następuje aktywacja białka Hsp104. Dzięki energii uzyskanej z hydrolizy ATP, możliwa jest translokacja łańcucha polipeptydowego przez kanał centralny białka Hsp104.

3.4.4. Reaktywacja łańcucha polipeptydowego opuszczającego kanał dezagregazy Hsp100

Hsp70 może być również zaangażowany w oddziaływanie z łańcuchem polipeptydowym opuszczającym kanał dezagregazy. Hsp70 wiążąc polipeptyd (razem z JDP) po procesie translokacji zapobiega jego ponownej agregacji. Dodatkowo wiele łańcuchów polipeptydowych nie jest w stanie samodzielnie zwinąć się do struktury natywnej np. lucyferaza. Związanie takiego łańcucha z Hsp70 może promować fałdowanie substratu (Ryc.14) (Zietkiewicz i wsp., 2004, Okuda i wsp., 2015).

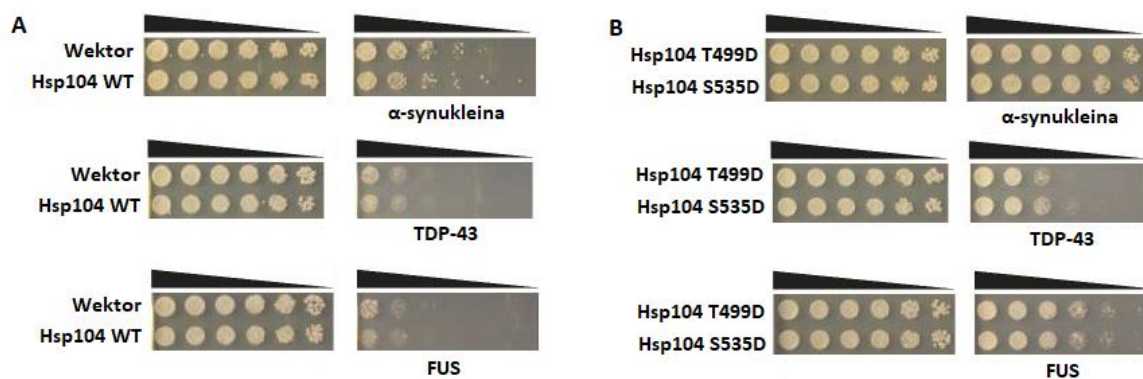


Rycina 14 | Hipotetyczny schemat ponownego zwinania łańcucha polipeptydowego przez Hsp70. Łańcuch polipeptydowy opuszczający kanał Hsp104, musi zostać ponownie zwiniony do struktury natywnej. Z łańcuchem w pierwszej kolejności oddziałują białka JDP, a następnie białko Hsp70. Białka JDP mogą stabilizować łańcuch opuszczający dezagregazę przekazując go do Hsp70 i dodatkowo stymulują aktywność ATPazową Hsp70, przez co łańcuch może zostać zablokowany w domenie SBD Hsp70.

3.5. Hsp104 jako potencjalne narzędzie w terapii chorób neurodegeneracyjnych

W świecie medycyny nie istnieją jeszcze środki terapeutyczne, którymi można wyleczyć choroby spowodowane nieprawidłowym fałdowaniem i agregacją białek, takie jak choroby neurodegeneracyjne. Do takich chorób zaliczyć można m.in. chorobę Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne (ALS). W obu chorobach, źle sfałdowane białka agregują, powodując zaburzenia w układzie nerwowym. W chorobie Parkinsona zagregowane białko α -synukleina tworzy cytoplazmatyczne ciała Lewy'ego, natomiast w większości przypadków ALS jądrowe białka TDP-43 i FUS zaczynają lokalizować w cytoplazmie i tam ulegają agregacji. W obu przypadkach wytworzone agregaty degenerują neurony ruchowe (Kakish i wsp., 2016, Di Gregorio i Duennwald, 2018)

Ze względu na to, że choroby neurodegeneracyjne są związane z akumulacją agregatów białkowych, dezagregaza Hsp104 stała się obiektem zainteresowań badaczy jako potencjalne narzędzie w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Wprowadzenie białek odpowiedzialnych za chorobę Parkinsona czy ALS do komórek drożdży powoduje znaczne zahamowanie wzrostu komórek (Ryc.15A). Sugeruje to, że pomimo iż Hsp104 WT może dezagregować amyloidy, priony, jak również agregaty białkowe, jego zdolność dezagregacyjna wobec ludzkich białek odpowiedzialnych za choroby neurodegeneracyjne jest niewystarczająca. Jednak dzięki zastosowaniu inżynierii genetycznej i wprowadzeniu pojedynczych zmian w strukturze dezagregazy udało się otrzymać warianty Hsp104 o zwiększonej aktywności dezagregacyjnej (warianty nadaktywne), które ratują komórki drożdży *S. cerevisiae* przed toksycznym efektem spowodowanym agregacją α -synukleiny, TDP-43 i FUS (Ryc. 15B) (Jackrel i wsp., 2014, Shorter, 2016, Tariq i wsp., 2018). Zwiększona aktywność dezagregazy może być niezwykle korzystna dla neuronów, w których akumulują się nieprawidłowo fałdowane białka. Jednak trzeba pamiętać o tym, że nadaktywne warianty mogą rozpoznawać i dezagregować także białka natywne, co może powodować zachwianie proteostazy komórek. Zatem ważne jest zaprojektowanie takich dezagregaz, które będą wysoce specyficzne dla odpowiednich substratów lub modyfikacje białek partnerskich, które kierowałyby dezagregazę na wybrane struktury.



Rycina 15 | Wpływ białek α -synukleiny, TDP-43 i FUS na wzrost komórek *S. cerevisiae*. A | Wpływ białek α -synukleiny, TDP-43 i FUS na wzrost komórek *S. cerevisiae* zawierających dziki wariant białka Hsp104. Synteza białek α -synukleiny, TDP-43 i FUS w komórkach drożdży zawierających Hsp104, hamuje wzrost komórek. B | Wpływ białek α -synukleiny, TDP-43 i FUS na wzrost komórek *S. cerevisiae* zawierających nadaktywne warianty białka Hsp104. Synteza białek α -synukleiny, TDP-43 i FUS w komórkach drożdży zawierających nadaktywne warianty białka Hsp104 T499D i S535D, nie powoduje zahamowania wzrostu komórek. Zmodyfikowano na podstawie Tariq i wsp., 2018

Potencjalnie zastosowanie Hsp104 w terapii chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona i ALS, może dać nowe możliwości leczenia, jednak aby do tego doszło potrzebne jest dokładnie zbadanie mechanizmu dezagregacji a w szczególności roli oddziaływania pomiędzy dezagregazą a Hsp70, przy dokowaniu i aktywacji Hsp104. Biorąc to pod uwagę podjąłem próbę mającą na celu identyfikację miejsca oddziaływania pomiędzy Hsp104 i Hsp70, które do tej pory nie zostało zidentyfikowane u drożdży *S. cerevisiae* oraz wpływu zerwania tego oddziaływania na efektywność dezagregacji.

4. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było poznanie znaczenia oddziaływania pomiędzy Hsp70 i Hsp104 dla efektywnego i wydajnego funkcjonowania dezagregazy, w szczególności określenie roli Hsp70 w selekcji substratów dezagregazy.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Materiały

5.1.1. Szczepy bakteryjne

E. coli **DH5α** *supE44 _lacU169 (φ80 lacZ_M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

E. coli **BL21(DE3)** *ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*

E. coli **BL21(DE3) Rosetta B** *F⁻ ompT gal dcm lon? hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysSRARE [T7p20 ileX argU thru tyrU glyT thrT argW metT leuW proL orip15A](CmR)*

E. coli **BL21(DE3)ΔCLPB Rosetta B** *F⁻ ompT gal dcm lon? hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysSRARE [T7p20 ileX argU thru tyrU glyT thrT argW metT leuW proL orip15A](CmR) Δclpb::kan*

E. coli **BL21(DE3) codon+** *F⁻ ompT hsdS(rB - mB -) dcm+ Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW] (CmR)*

E.coli **BL21(DE3) ΔDnaK,DnaJ** *ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) Δdnak::, Δdnaj::*

5.1.2. Szczepy drożdżowe

S. cerevisiae **W303-1B** *MATα {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}*

S. cerevisiae **W303Δhsp104** *MATα {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} hsp104::LEU2*

5.1.3. Plazmidy bakteryjne

pET5a-HSP104 – użyto do nadprodukcji Hsp104 i jego wariantów, AmpR, promotor T7, indukcja - IPTG

pET24a-HAP – użyto do nadprodukcji HAP i jego wariantów, KanR, promotor T7, indukcja - IPTG (od B. Bukau, Uniwersytet w Heidelbergu)

pCA533-SSA1 – użyto do nadprodukcji Ssa1, KanR, promotor lac, indukcja - IPTG

pET21a-Ydj – użyto do nadprodukcji Ydj1, AmpR, promotor T7, indukcja - IPTG

pGFPuv – użyto do nadprodukcji GFP, AmpR, promotor lac, indukcja - IPTG

pET28-CLPP – użyto do nadprodukcji ClpP, KanR, promotor T7, indukcja - IPTG

pET15b-CLPB – użyto do nadprodukcji ClpB i jego wariantów, AmpR, promotor T7, indukcja - IPTG

5.1.4. Plazmidy drożdżowe

pFA6a-GFP (S65T)-His3MX6

pFA6a-link-mCherry-SpHis5

pRS306-luc-mCitrine (od B. Bukau, Uniwersytet w Heidelbergu)

pRS313-HSP104

5.1.5. Startery do reakcji PCR

Startery do reakcji PCR zostały zaprojektowane przy użyciu programów: Snapgene i Generunner, i zostały zsyntezowane przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (oligo.pl).

Startery do wprowadzenia mutacji miejscowo specyficznej w genie *HSP104*:

Y507A

FWD 5'-CTACCGCCGCTGATTTAAGGGCCTTCGCCATCCCAGATATC -3'

REV 5'-GATATCTGGGATGGCGAAGGCCCTTAAATCAGCGGCGGTAG -3'

A507Y/A508F

FWD 5'-GATATCTGGGATGGCCGCCGCCCTTAAATCAGC-3'

REV 5'-CGCTGATTTAAGGGCGGCGGCCATCCCAGATATC -3'

F508A

FWD 5'-GCTGATTTAAGGTACGGGCCATCCCAGATATC-3'

REV 5'-GATATCTGGGATGGCCGCGTACCTTAAATCAGC -3'

D484K

FWD 5'-GGGCCTTGTTTTCCAGTTCCTTCAATTTCTTTTTAGCTTG -3'

REV 5'-CAAGCTAAAAAGAAATTGAAGGAACTGGAAAACAAGGCC -3'

F508G/A509K

FWD 5'-ATTTAAGGTACGGCAAAATCCCAGATATCAA-3'

REV 5'-TTGATATCTGGGATTTTGCCGTACCTTAAAT-3'

Startery do wprowadzenia mutacji miejscowo specyficznej w genie *clpb*:

G504F/K505A

FWD 5'-TGTCTGAACTGCAATATTCGCCATCCCGGAACTG-3'

REV 5'-CAGTTCGGGATGGCGAATATTGCAGTTCAGACA-3'

Startery wykorzystane do wprowadzenia genu *HSP104* do wektorów: pFA6a-GFP (S65T)-His3MX6 i pFA6a-link-mCherry-SpHis5

Startery do amplifikacji genu *HSP104* z fragmentami komplementarnymi do plazmidu pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6:

FWD 5'-CGCCAGGCTGAAGCTTATGAACGACCAAACGCAATTTAC-3'
REV 5'-TACTGTTAATTAACCCGGGATCCGATCTAGGTCATCATCAATTTCCATAC-3'

Startery do amplifikacji plazmidu pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6 z sekwencjami komplementarnymi do genu *HSP104*:

FWD 5'-GATGACCTAGATCGGATCCCCGGGTTAATTAACAG-3'
REV 5'-GGTCGTCATAAGCTTCAGCTGGCGG -3'

Startery do amplifikacji genu *HSP104* z fragmentami komplementarnymi do plazmidu pFA6a-link-mCherry-SpHis5:

FWD 5'-GGGGCAGCAGCTGTAATGAACGACCAAACGCAATTTACAGAAAGG-3'
REV 5'-ATGTGCAGCAGCGGGGATCTAGGTCATCATCAATTTCCATACTGTCCTCATTATCGT-3'

Startery do amplifikacji plazmidu pFA6a-link-mCherry-SpHis5 z sekwencjami komplementarnymi do genu *HSP104*:

FWD 5'-CCCCGTCGTCGACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAA-3'
REV 5'-TACAGCTGCTGCCCCGTCGACCTGCAGCGTACGAAGCTTCA-3'

Startery do amplifikacji odcinka *HSP104* – GFP(S65T)-His3MX6 z fragmentami do rekombinacji homologicznej

FWD 5'-GCTGATTTAAGTACTTCGCCATCCCAGATATCAAAAAGCAAATCG-3'
REV 5'-CTGATTCTTGTTGAAAGTTTTTAAAAATCACACTATATTAACAGTATAGCGACCAGCATTC-3'

Startery do amplifikacji odcinka *HSP104* – link-mCherry-SpHis5 z fragmentami do rekombinacji homologicznej

FWD 5'- GCTGATTTAAGTACTTCGCCATCCCAGATATCAAAAAGCAAATCG-3'
REV 5'-
CTGATTCTTGTTGAAAGTTTTTAAAAATCACACTATATTAACAGTATAGCGACCAGCATTC
ACATACG-3'

Startery użyte do sekwencjonowania genu *HSP104*

104 nr 1 5'-AACATTTTCGGTTTGTATTACTTC-3'
104 nr 2 5'-CCGTGAAGAAGAAATAAGAAGC-3'
104 nr 3 5'-CCACCACCAATAACGAATATAGATC -3'
104 nr 4 5'-CTTCCAATCTAGGTGCTGAATTTATC-3'
104 nr 5 5'-CCAATCTAGGTGCTGAATTTATCAATTC-3'
104 nr 6 5'-CTTCCAATCTAGGTGCTGAATTTATC-3'

5.1.6. Antybiotyki

Ampicylina (100 µg/ml)

Chloramfenikol (35 µg/ml)

Kanamycyna (25 µg/ml)

5.1.7. Białka

5.1.7.1. Białka opiekuńcze z *E.coli*

DnaJ, GrpE, DnaK, ClpB WT (kolekcja KBMiK)

ClpB G504F/K505A (oczyszczony w ramach tej pracy)

5.1.7.2. Białka opiekuńcze z *S. cerevisiae*

Hsp104 WT, Hsp104 Y507A, Hsp104 Y507A/F508A, Hsp104 F508A, Hsp104 D484K/F508A, Hsp104 F508G/A509K (oczyszczone w ramach tej pracy) (Hsp104 WT, Hsp104 F508A oczyszczone przez dr Annę Janta)

Hsp104 D484K (kolekcja KBMiK, oczyszczone przez dr Agnieszkę Kłosowską)

Hsp104 HAP D484K/F508A, Hsp104 HAP D484K (oczyszczone w ramach tej pracy)

Ssa1, Ydj1 (oczyszczone w ramach tej pracy)

5.1.7.3. Białka użyte jako substraty reakcyjne

Lucyferaza (ze świetlika *Photinus pyralis*) (Promega)

Lucyferaza-HisTag (kolekcja KBMiK, oczyszczone przez Igora Obuchowskiego)

GFP (oczyszczone w ramach tej pracy)

α-kazeina (Sigma-Aldrich)

FITC-α-kazeina (Sigma-Aldrich)

RCMLa (kolekcja KBMiK, przygotowane przez dr Agnieszkę Kłosowską)

5.1.7.4. Białka enzymatyczne

LDH, PK, CK (Sigma-Aldrich)

Pfu Turbo, Pfu ULTRA, Dpn1 (Stratagene)

Ulp1 (kolekcja KBMiK)

ClpP (kolekcja KBMiK, oczyszczone przez dr Agnieszkę Kłosowską)

5.1.8. Przeciwciała

α -Hsp104 (królicze przeciwciała poliklonalne, Abcam nr kat. ab69549)

α -GFP (mysie przeciwciała monoklonalne, Roche nr kat. 11814460001)

α - β -aktyna (mysie przeciwciała monoklonalne, Abcam nr kat. ab184220)

α -mCherry (mysie przeciwciała monoklonalne, Abcam nr kat. ab125096)

α -lucyferaza (królicze przeciwciała poliklonalne, Abcam nr kat. ab99944)

α -królicze IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową (kozie przeciwciała poliklonalne, BIO-RAD, nr kat. 1721019)

α -mysie IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową (kozie przeciwciała poliklonalne, BIO-RAD, nr kat. 1721011)

5.1.9. Pożywki do hodowli bakterii

LB: 0.5% ekstrakt drożdżowy, 1% trypton, 1% NaCl

LA: LB + 2% agar

SOB: 0.5% ekstrakt drożdżowy, 2% trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM MgSO₄·7H₂O; pH 6.7-7.0

Pożywka bogata: 2% ekstrakt drożdżowy, 1.8% pepton, 16 mM KH₂PO₄, 54 mM K₂HPO₄, po autoklawowaniu: 0.5% glicerol, 0.1% glukoza

5.1.10. Pożywki do hodowli drożdży

YPD (ang. Yeast extract – Pepton + Dextrose): 1% ekstrakt drożdżowy, 2% pepton; po autoklawowaniu: 2% glukoza

YPD – podłoże stałe: YPD + 2% agar

Podłoże syntetyczne, selekcyjne S.C. (ang. Synthetic Complete): 0.17% YNB (ang. Yeast Nitrogen Base), 0,5% siarczan amonu, po autoklawowaniu: 2% glukoza oraz 2% 50-krotnie stężony roztwór aminokwasów i zasad azotowych z pominięciem związku który stanowił czynnik selekcyjny

Podłoże syntetyczne, selekcyjne S.C. – podłoże stałe: S.C. + 2% agar

50-krotnie stężony roztwór aminokwasów i zasad azotowych

Adenina 0,1%, arginina 0,1%, fenyloalanina 0,25%, inozytol 0,1%, izoleucyna 0,4%, leucyna 0,4%, kwas asparaginowy 0,5%, kwas glutaminowy 0,5%, lizyna 0,3%, metionina 0,1%, seryna 1,9%, treonina 1%, walina 0,75%

50-krotnie stężony roztwór tyrozyny (0,15%)

50-krotnie stężony roztwór uracylu (0,29%)

50-krotnie stężony roztwór tryptofanu (0,4%)

50-krotnie stężony roztwór histydyny (0,1%)

5.1.11. Złoża chromatograficzne

Sephadex G25 (GE Healthcare, USA),
Phenyl-Sepharose HR5/5, (Sigma, Germany),
Superdex TM200 (GE Healthcare, USA),
Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA),
SP-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA),
5'ATP-Agarose (Sigma-Aldrich),
Heparin-Sepharose HiTrap (GE Healthcare; USA),
DAEA-Sepharose (Pharmacia; USA),
Ni-NTA-Agarose (Novagen),
Hydroxyapatite Bio-Gel HTP (Bio-Rad, USA)

5.1.12. Zestawy komercyjne

Plasmid Mini Kit for isolation of plasmid DNA (A&A Biotechnology)
Genomic Mini AX Yeast Spin (A&A Biotechnology)
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
WESTAR ETA C 2.0, WESTAR ETA C ULTRA 2.0 – Chemiluminescent Substrate for Western Blotting (Cyanagen)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

5.1.13. Bufory

5.1.13.1. Bufory do oczyszczania białek

Bufor lizujący do Hsp104: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA,
Hsp104 QA: 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol

Hsp104 QB: 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 600 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

Hsp104 HA: 100 mM imidazole-HCl pH 7.0, 5 mM 2-merkaptioetanol, 50 mM NaCl, 10% glicerol

Hsp104 HB: 100 mM imidazole-HCl pH 7.0, 5 mM 2-merkaptioetanol, 350 mM NaCl, 10% glicerol

Hsp104 GF: 40 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanol 10% glicerol

Bufor lizujący do Ssa1: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 5 mM imidazol, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

Ssa1 NA: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 5 mM imidazol, 10% glicerol

Ssa1 NB: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 50 mM imidazol, 10% glicerol

Ssa1 NC: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 500 mM imidazol, 10% glicerol

Bufor do trawienia Ulp1 dla Ssa1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM KCl, 5 mM 2-merkaptioetanol

Ssa1 AA: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM MgAc₂, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

Ssa1 AB: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM MgAc₂, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol, 10 mM ATP

Ssa1 K: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgAc₂, 10% glicerol

Bufor lizujący do Ydj1: 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM 2-merkaptioetanol, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂ 10% glicerol

Ydj1 DEAE A: 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM 2-merkaptioetanol, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂ 10% glicerol

Ydj1 DEAE B: 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM 2-merkaptioetanol, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 10% glicerol

Ydj1 HydroA: 5 mM KPi pH 7.0

Ydj1 HydroB: 300 mM KPi pH 7.0

Ydj1 QA: 40 mM HEPES-KOH pH 7.5, 80 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

Ydj1 QB: 40 mM HEPES-KOH pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

Ydj1 K: 25 mM HEPES-KOH pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

Bufor lizujący do GFP: 40 mM Tris-HCl pH 7.8-8.0, 50 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanol, 10% glicerol

GFP QA: 40 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM NaCl, 10% glicerol,

GFP QB: 40 mM Tris-HCl pH 7.8, 300 mM NaCl, 10% glicerol,

GFP HydroA: 5 mM KPi pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glicerol

GFP HydroB: 150 mM KPi pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glicerol

GFP PheA: 150 mM KPi pH 7.5, 50 mM NaCl, 20% (NH₄)₂SO₄

GFP PheB: 150 mM KPi pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glicerol

GFP GF: 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol

5.1.13.2. Bufory reakcyjne

Bufor HKM: 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM ATP

Bufor renaturacyjny GFP (4x stężony): 60 mM MgAc, 240 mM glutaminian potasu, 112 mM Tris-HCl pH 7.8, 28% glicerol, 28 mM DTT, 40 mM ATP

Bufor renaturacyjny LUC: 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 15 mM MgOAc

Bufor reakcyjny AS: 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 20 mM MgOAc, 10 mM DTT

Bufor ATPazowy: 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 25 mM NaCl, 100 mM KCl, 15 mM MgOAc, 1 mM DTT, 10% glicerol

Bufor enzymatyczny EZ: 0,265 mM NADH, 100 U/ml dehydrogenaza mleczanowa, 70 U/ml kinazy pirogronianowej (LDH/PK) i 2,8 mM PEP, w buforze reakcyjnym AS

5.1.13.3. Inne

Akrylamid/Bis-akrylamid (Sigma-Aldrich): 30% akrylamid/bisakrylamid 29:1,

Coomassie Brilliant Blue: 0,14% Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% metanol, 30% kwas octowy,

Odbarwiacz do żeli: 18.2% metanol, 9.1% kwas octowy,

Bufor elektrodowy: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM glicyny, 0.1% SDS

Bufor Laemmli (4x): 300 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol, 0.05% błękit bromofenolowy, 25% 2-merkaptotoetanol

Bufor do żelu rozdzielającego: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 0.4% SDS

Bufor do żelu zagęszczającego: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS

Bufor TB 10 mM PIPES, 55 mM MnCl₂·4H₂O, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl; pH 6.7

Bufor TEL 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1mM EDTA, 0,1 M LiAc

Bufor PLATE 40% PEG 4000, 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1mM EDTA, 0,1 M LiAc

Bufor TE 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA

Bufor lizujący L 5,4 N NaOH, 1,05mM 2-merkaptotoetanol, 10 mM PMSF

Bufor TBE (10x stężony): 108g Trizma base; 55g kwas borowy; 9,3g EDTA

Bufor TBST 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20

5.2. Metody

5.2.1. Izolacja plazmidowego DNA

Plazmidowe DNA wyizolowano z nocnej hodowli *E. coli* przy użyciu zestawu komercyjnego: Plasmid Mini Kit (A&A Biotechnology), zgodnie z załączonym przez producenta protokołem.

5.2.2. Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA wyizolowano z nocnej hodowli *S. cerevisiae* przy użyciu zestawu komercyjnego: Genomic Mini AX Yeast Spin (A&A Biotechnology) zgodnie z załączonym przez producenta protokołem.

5.2.3. Wprowadzenie genu *HSP104* do wektora pFA6a-GFP (S65T)-His3MX6 oraz pFA6a-link-mCherry-SpHis5 - FastCloning

Do wprowadzenia genu *HSP104* wykorzystano metodę zawartą w publikacji Chaokun i wsp., 2011. Metoda polega na amplifikacji insertu i wektora z homologicznymi odcinkami. Startery do reakcji PCR opisano w rozdziale 5.1.5. Mieszanina reakcyjna na 50 μ l zawierała: 2,5 U polimerazy PfuUltra HF DNA, 5 μ l buforu reakcyjnego PfuUltra (10x), 100 ng matrycowego DNA, po 125 ng każdego ze starterów oraz 1 mM mieszaniny dNTP (po 250 μ M każdego). Reakcje prowadzono w urządzeniu Mastercycler Gradient Thermal Cycler 950000015 (Eppendorf) w następujących warunkach: denaturacja początkowa (95°C, 2 min), 18 cykli: denaturacja (95°C, 15 s), przyłączanie starterów (51-65°C, 30 s), elongacja (72°C, 1 min/kpz) i elongacja kończąca reakcje (72°C, 10 min). Produkty reakcji PCR analizowano przy wykorzystaniu elektroforezy agarozowej (Rozdział 5.2.9.). Następnie do otrzymanych produktów dodano enzymu *Dpn I* (10 U na 45 μ l produktu) i mieszano w stosunku 1 : 2 (wektor : insert) oraz inkubowano przez 1 h w 37°C. Taka przygotowaną mieszaniną (4 - 8 μ l) transformowano komórki *E. coli* (Rozdział 5.2.13.) i wysiano na płytki LA z odpowiednim antybiotykiem a następnie inkubowano przez noc w 37°C. W celu weryfikacji sekwencji otrzymanych plazmidów, zaszczepiono po 5 - 8 kolonii w pożywce LB z antybiotykiem i hodowano przez noc w 3°C, następnie izolowano plazmidy zgodnie z procedurą zawartą w rozdziale 5.2.1., po czym wysłano

do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę Genomed. Analiza otrzymanych sekwencji została przeprowadzona przy użyciu programu SnapGene.

5.2.4. Wprowadzenie sekwencji: *HSP104*- GFP (S65T)-His3MX6 i *HSP104*-link-mCherry-SpHis5 do komórek *S. cerevisiae* - rekombinacja homologiczna

Plazmidy pFA6a-*HSP104*-GFP(S65T)-His3MX6 oraz pFA6a-*HSP104*-link-mCherry-SpHis5 (Rozdział 5.2.3.) posłużyły jako matryce do amplifikacji sekwencji genów w celu wprowadzenia ich do komórek *S. cerevisiae*. Metoda polega na amplifikacji odpowiedniej sekwencji genów z odcinkami homologicznymi do sekwencji genomowej, gdzie ma nastąpić rekombinacja homologiczna. Startery do reakcji PCR opisano w rozdziale 5.1.5. Mieszanina reakcyjna na 50 µl zawierała: 2,5 U polimerazy PfuUltra HF DNA, 5 µl buforu reakcyjnego PfuUltra (10x), 100 ng matrycowego DNA, po 125 ng każdego ze starterów i 1 mM mieszaniny dNTP (po 250 µM każdego). Reakcje prowadzono w urządzeniu Mastercycler Gradient Thermal Cycler 950000015 (Eppendorf), w następujących warunkach: denaturacja początkowa (95°C, 2 min), 22 cykle: denaturacja (95°C, 15 s), przyłączanie starterów (57-64°C, 30 s), elongacja (72°C, 1 min/kpz) i elongacja kończąca reakcje (72°C, 10 min). Produkty reakcji PCR analizowano przy wykorzystaniu elektroforezy agarozowej (Rozdział 5.2.9.). Po rozdziale otrzymane produkty reakcji PCR zostały wycięte z żelu a następnie oczyszczone przy użyciu zestawu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Tak przygotowanymi fragmentami transformowano komórki *S. cerevisiae* (szczep W303-1B) (Rozdział 5.2.14.) i wysiano na płytki SC nie zawierające histydyny jako markera selekcyjnego, a następnie inkubowano 3-4 dni w 30°C. W celu weryfikacji sekwencji genomowych w otrzymanych transformantach, 8 kolonii przeniesiono do płynnej pożywki SC i hodowano przez noc w 30°C, następnie izolowano genomowe DNA zgodnie z procedurą zawartą w rozdziale 5.2.2., po czym wysłano do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę Genomed. Analiza otrzymanych sekwencji została przeprowadzona przy użyciu programu SnapGene.

5.2.5. Analiza Western Blot poziomu białek w komórkach *S. cerevisiae*

Żel poliakrylamidowy (Rozdział 5.2.10) na którym zostało rozdzielone po 20 μ l lizatów komórek drożdży, uzyskanych według metody opisanej w rozdziale 5.2.23., następnie inkubowano przez 30 minut w buforze CAPS. Osobno także w buforze CAPS inkubowano błonę nitrocelulozowa (0,2 μ m) oraz bibułę. Po upływie tego czasu przygotowano „kanapkę” układając dwa kawałki bibuły, błonę nitrocelulozowa, żel i kolejne dwa kawałki bibuły. Całość umieszczono w aparacie do transferu mokrego Mini- Trans- Blot Cell, wypełnionego zimnym i odgazowanym buforem CAPS i prowadzono transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową przy stałym napięciu 100V przez 1 h, przy zastosowaniu systemu chłodzącego. Po transferze membranę barwiono 0,2 % Ponceau S w 1% kwasie octowym, w celu sprawdzenia jakości transferu, a następnie odpłukiwano barwnik przemywając najpierw w wodzie a następnie w buforze TBST. Po odpłukaniu barwnika membranę blokowano przy użyciu 5% roztworu odtłuszczonego mleka w TBST. Po tym etapie membranę płukano 3-krotnie po 10 minut w buforze TBST i inkubowano przez noc z przeciwciałami I-rzędowymi. Po inkubacji membranę płukano 3-krotnie po 10 minut w buforze TBST i inkubowano przez 1,5 h z przeciwciałami II-rzędowymi skierowanymi przeciwko przeciwciałom I-rzędowych. Po tym czasie membranę płukano 3-krotnie przez 10 minut w buforze TBST. Następnie do wywołania membrany użyto zestawu komercyjnego WESTAR ETA C 2.0 lub WESTAR ETA C ULTRA 2.0 – Chemiluminescent Substrate for Western Blotting (Cyanagen), do odczytania sygnału użyto urządzenia ChemiDoc MP system. Analizę otrzymanych sygnałów przeprowadzono za pomocą oprogramowania Image Lab.

5.2.6. Mikroskopia fluorescencyjna

Komórki drożdży po nocnej hodowli w 30°C odmłodzono do $OD_{600}=0,2-0,25$ i inkubowano w 30°C przez 4 h, następnie przeniesiono po 1 ml do probówek typu „Eppendorf” i inkubowano w termomikserze w temperaturach: 30°C i 42°C, po czym wykonano preparaty mikroskopowe. Szczep drożdży z fuzją *HSP104-GFP* obserwowano pod fluorescencyjnym mikroskopem konfokalnym Nikon System PCM 2000 (laser o długości fali 488nm), natomiast komórki drożdży z wprowadzonymi fuzjami genów *HSP104-mCherry* oraz *lucyferaza-mCitrine* obserwowano przy użyciu

fluorescencyjnego, laserowego mikroskopu konfokalnego Leica SP8X. W celu zminimalizowania przesłuchu fluorescencyjnego zastosowano skanowanie sekwencyjne pomiędzy kanałami (wzbudzenie mCherry 587 nm, detekcja 610 nm - 779 nm i dla znacznika mCitrine: wzbudzenie 515 nm, z detekcją 529 nm - 587 nm).

5.2.7. Ocena kolokalizacji białek fuzyjnych

Ocenę kolokalizacji białek fuzyjnych podczas szoku termicznego przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w pracy Winkler J. i wsp., (2012b) przy użyciu oprogramowania ImageJ. Analizę przeprowadzono dla minimum 100 komórek z każdego szczepu.

5.2.8. Mutageneza miejscowo specyficzna

Mutageneza miejscowo specyficzna przeprowadzona została zgodnie z protokołem dołączonym do QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Jako matrycę do reakcji PCR posłużyło plazmidowe DNA zawierające gen, do którego za pomocą odpowiednio zaprojektowanych starterów (Rozdział 5.1.5.), wprowadzono mutację. Mieszanina reakcyjna na 50 μ l zawierała: 2,5 U polimerazy PfuUltra HF DNA, 5 μ l buforu reakcyjnego PfuUltra (10x), 25 ng matrycowego DNA, po 125 ng każdego ze starterów i 1 mM mieszaniny dNTP (po 250 μ M każdego). Reakcje prowadzono w urządzeniu Mastercycler Gradient Thermal Cycler 950000015 (Eppendorf), w następujących warunkach: denaturacja początkowa (95°C, 2 min), reakcja właściwa – 18-25 cykli: denaturacja (95°C, 15 s), hybrydyzacja starterów (52-58°C, 30 s), elongacja nici DNA (72°C, 1 min/kpz) i elongacja kończąca reakcję (72°C, 10 min). Produkty reakcji PCR analizowano przy wykorzystaniu elektroforezy agarozowej (Rozdział 5.2.9.). Otrzymany produkt PCR trawiono enzymem *DpnI* w celu strawienia metylowanego DNA – matrycy (10U, 37°C, 1 h). Tak przygotowane DNA transformowano do bakterii metodą szoku termicznego (Rozdział 5.2.13.) i wysiewano na płytki z pożywką LA zawierającą odpowiedni antybiotyk. Tak przygotowane płytki inkubowano przez noc w 37°C. Z otrzymanych transformantów pobrano po 3-5 kolonii i przeniesiono do pożywki płynnej LB z antybiotykiem i hodowano przez noc w 37°C, a następnie wyizolowano plazmidowe DNA (Rozdział 5.1.1.) i w celu sprawdzenia

poprawności wprowadzenia mutacji poddano je reakcji sekwencjonowania z użyciem starterów (Rozdział 5.1.5.) Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę Genomed. Wyniki sekwencjonowania porównano z sekwencją genu dzikiego przy użyciu oprogramowania SnapGene.

5.2.9. Przygotowanie komórek kompetentnych

5.2.9.1. Komórki kompetentne *E. coli* BL21 (DE3)

Komórki *E. coli* BL21 (DE3) hodowano w pożywce LB w 37°C do $OD_{600}=0,6$. Następnie przeniesiono do lodu, inkubowano 30 minut i wirowano (3000 obr/min, 5 min, 4°C). Osadzony osad zawieszono w 100 mM $CaCl_2$ w połowie objętości początkowej i inkubowano na lodzie przez kolejne 30 minut. Po tym czasie komórki wirowano (3000 obr/min, 5 min, 4°C), zawieszono w 100 mM $CaCl_2$ w 1/15 objętości początkowej i inkubowano 1-24 h na lodzie. Do tak przygotowanych komórek dodano 10% glicerolu (v/v), a następnie komórki zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.2.9.2. Komórki super kompetentne *E. coli* DH5 α

Komórki *E. coli* BL21 DH5 α hodowano w pożywce SOB w temperaturze 18°C do osiągnięcia $OD_{600}=0,6$; następnie inkubowano na lodzie przez 30 minut i odwirowano (3000 obr/min, 5 min, 4°C). Osad zawieszono w lodowatym buforze TB w 1/3 początkowej objętości i ponownie inkubowano na lodzie przez 10 minut. Komórki odwirowano (3000 obr/min, 5 min, 4°C) i zawieszono w buforze TB w 1/15 początkowej objętości oraz dodano lodowaty DMSO do końcowego stężenia 7% i inkubowano na lodzie 10 minut. Następnie zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.2.10. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Próbka DNA została wymieszana w stosunku 5:1 z Novel Juice (GeneDirex), który służy jako bufor obciążający oraz odczynnik do wizualizacji DNA. Żel z próbkami rozdzielano w 1% żelu agarozowym z użyciem buforu TBE w aparacie Mini-Sub Cell GT Cell (BIO-RAD) przy stałym napięciu 90V przez 1 h. Żele analizowano w świetle UV przy użyciu systemu ChemiDoc MP system

5.2.11. Elektroforeza białek z żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

5.2.11.1. Przygotowanie żeli

Do przygotowania żeli poliakrylamidowych został wykorzystany system mini-Protean (BIO-RAD). Do przygotowania żelu rozdzielającego (mieszanina na 4 żele) wykorzystano: 6,2 ml buforu do żelu rozdzielającego, 10,2 ml wody, 8,2 ml roztworu akrylamidu/bis-akrylamidu 30%. W celu polimeryzacji dodano 90 µl 10% roztworu APS i 60 µl TEMEDu. Tak przygotowany roztwór wlewo pomiędzy uprzednio przygotowane szybki i zalano etanolem w celu odcięcia dopływu powietrza. Po zestaleniu żelu etanol usunięto i na wierzch żelu rozdzielającego wlewo mieszaninę żelu zagęszczającego: 2,5 ml buforu do żelu zagęszczającego, 6,2 ml H₂O, 1,5 ml roztworu akrylamidu/bis-akrylamidu 30% oraz 60 µl 10% roztworu APS i 40 µl TEMED. Tak przygotowane żele pozostawiono do całkowitej polimeryzacji przez 1,5 h.

5.2.11.2. Elektroforeza i barwienie żeli

Próbki białka zmieszano z buforem Laemmli (4x stężonym) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 90°C. Po inkubacji próbki wirowano i nanoszono na wcześniej przygotowany żel poliakrylamidowy. Elektroforezę prowadzono w dwóch fazach: 15 minut przy 120 V i 45 minut przy 180 V, w buforze elektrodowym. Po elektroforezie żel zagęszczający usunięto, a żel rozdzielający inkubowano w roztworze Coomassie Brilliant Blue od 0,5-24 h, a następnie gotowano w wodzie lub inkubowano w buforze odbarwiający przez 1-24 h w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Wizualizację żeli przeprowadzono przy użyciu ChemiDoc XRS + (Bio-Rad), a analizę za pomocą oprogramowania Image Lab.

5.2.12. Oznaczenie stężenia białek i DNA

W celu oznaczenia stężenia preparatu białka, próbki rozdzielono metodą SDS-PAGE (Rozdział 5.2.10.) razem ze wzorcem BSA standard (0,2-2 mg/ml) (Sigma-Aldrich), użytym do wyznaczenia krzywej wzorcowej. Następnie wybarwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue i wykonano analizę densytometryczną, używając oprogramowania Image Lab.

Do określenia stężenia DNA wykorzystano metodę spektrofotometryczną przy użyciu urządzenia NanoDrop.

5.2.13. Izolacja białek:

5.2.13.1. *Hsp104*

Do nadprodukcji białka Hsp104 i jego wariantów wykorzystano dwa plazmidy: pET5a-*HSP104* (niosący dziką formę genu), którym transformowane były komórki *E. coli* BL21(DE3) Δ CLPB Rosetta oraz pET24a-*HAP* (niosący wariant genu z wprowadzonym motywem HAP) w komórkach *E. coli* BL21(DE3) Codon+ (Rozdział 5.2.13.). Izolacji białka Hsp104 jest oparta o procedurę zawartą w publikacji Lipińska i wsp., 2013. Hodowane przez noc w 25°C bakterie odmłodzono (1:20) w 12 l pożywki bogatej z dodatkiem ampicyliny (plazmid pET5a) lub kanamycyny (pET24a) i hodowano w 30°C w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia OD₆₀₀=0,6. Nadprodukcja białka była indukowana przez dodanie 1mM IPTG (do końcowego stężenia), następnie hodowano komórki 3-4 h. Po tym czasie komórki wirowano przy użyciu wirówki BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JLA 10.500 (4000 obr/min, 10 min, 4°C) i zawieszono w buforze do lizy. Komórki lizowano przy wykorzystaniu prasy Frencha (Thermo Scientific, USA, 1000 psi). Otrzymany lizat wirowano w wirówce BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JA 30.50 (25000 obr/min, 30 minut, 4°C) i dodano siarczanu amonu (0,35 g/ml) w celu wysolenia białka (1 h, 4°C). Roztwór wirowano (25000 obr/min, 30 minut, 4°C), a otrzymany osad przedializowano do buforu Hsp104 QA, i naniesiono na Q-Sepharose FF. Elucję ze złoża prowadzono gradientem z buforu QA do buforu QB przy użyciu systemu ÄKTA prime plus (GE Healthcare). Wybrane frakcje przedializowano do buforu HA a następnie nałożono na złożę Heparin-Sepharose. Elucję prowadzono gradientem z buforu HA do buforu HB przy użyciu systemu ÄKTA prime plus. Frakcje zawierające białko Hsp104 zagęszczono do objętości około 5 ml przy wykorzystaniu Amicon Ultra-15 centrifuge tubes (Merck Millipore) i nałożono na kolumnę do filtracji żelowej Superdex 200 zrównoważoną buforem Hsp104 GF. Po elucji frakcje zawierające oczyszczony preparat zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Warianty białka Hsp104: WT oraz F508A zostały wyizolowane przez: dr Annę Janta, natomiast wariant: D484K przez dr Agnieszkę Kłosowską.

5.2.13.2. *Ssa1*

Izolacja białka została oparta na metodzie zawartej w Andreasson i wsp., 2008. Hodowane przez noc w 25°C bakterie *E. coli* BL21(DE3) Codon+ transformowane plazmidem pCA533-*SSA1* (Rozdział 5.2.13.) odmłodzono (1:20) w 12 l pożywki LB z kanamycyną i hodowano w 30°C w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia $OD_{600}=0,6$. Nadprodukcja białka była indukowana przez dodanie 1 mM IPTG (do końcowego stężenia), następnie hodowano komórki 3 h. Komórki osadzono przez wirowanie w wirówce BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JLA 10.500 (4000 obr/min, 10 min, 4°C). Osad zawieszono w buforze lizującym (1 g bakterii – 3 ml buforu) i lizowano przy wykorzystaniu Prasy Frencha (Thermo Scientific, USA, 1000 psi). Lizat wirowano w wirówce BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JA 30.50 (25000 obr/min, 30 min, 4°C), supernatant przeniesiono na wcześniej przygotowane złoże Ni-NTA (nanoszenie 2,5 h), następnie płukano złoże przy użyciu buforu Ssa NA i NB, elucję prowadzono buforem Ssa NC. Otrzymany supernatant dializowano do buforu do trawienia Ulp1 dla Ssa1. Dodano proteazy Ulp1 (1 μ M proteazy Ulp1 na 1 mg Ssa1) i inkubowano 3 h w temp. 8°C. po inkubacji supernatant nałożono na złoże Ni-NTA w celu pozbycia się znacznika histydynowego z roztworu, po czym próbkę wirowano w celu pozbycia się złoża Ni-NTA i dializowano do buforu AA. Tak przygotowany roztwór nakładano na złoże 5'ATP-agarose. Po przemyciu kolumny buforem AA, elucję prowadzono używając buforu AB. Tak otrzymany preparat dializowano do buforu Ssa K. a następnie zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.2.13.3. *Ydj1*

Izolacja białka została oparta na metodzie zawartej w Lipińska i wsp. (2013). Hodowane przez noc w 23°C bakterie *E. coli* Δ DnaK, Δ DnaJ transformowane plazmidem pET21a-*Ydj1* (Rozdział 5.2.13.) odmłodzono (1:20) w 8 l pożywki LB z ampicyliną i hodowano w 23°C w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia $OD_{600}=0,6$. Nadprodukcja białka była indukowana przez dodanie 1 mM IPTG (do końcowego stężenia), następnie hodowano komórki całą noc. Komórki osadzono przez wirowanie w wirówce BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JLA 10.500 (4000 obr/min, 10 min, 4°C) zawieszono w buforze lizującym (1 g bakterii – 3 ml buforu) i lizowano przy

wykorzystaniu Prasy Frencha (Thermo Scientific, USA, 1000 psi). Lizat odwirowano w wirówce BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JA 30.50 (25000 obr/min, 30 min, 4°C), a supernatant przeniesiono na wcześniej przygotowane złożo DEAE SE, następnie złożo płukano przy użyciu buforu Ydj1 DEAE A, elucję prowadzono buforem Ydj1 DEAE B przy użyciu systemu ÄKTA prime plus. Otrzymany supernatant dializowano do buforu Ydj1 HydroA i naniesiono na wcześniej przygotowane złożo Hydroxyapatyt. Elucję prowadzono przy wykorzystaniu buforu Ydj1 HydroB. Otrzymane frakcje dializowano do buforu Ydj1 QA i nałożono na kolumnę zawierającą złożo Q-Sepharose FF. Elucję prowadzono gradientem liniowym z buforu QA do buforu QB przy użyciu systemu ÄKTA prime plus. Tak otrzymany preparat dializowano do buforu Ydj K. a następnie zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.2.13.4. GFP

Izolacja białka GFP została oparta na metodzie zawartej w Ziętkiewicz i wsp. 2004. Hodowane przez noc w 30°C bakterie *E. coli* BL21(DE3) transformowane plazmidem pGFPuv (Rozdział 5.2.13.) odmłodzono (1:20) w 12 l pożywki LB z ampicyliną i hodowano w 25°C w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia $OD_{600}=0,6$. Nadprodukcja białka była indukowana przez dodanie IPTG (do końcowego stężenia 1mM), i dalej prowadzona przez noc w temperaturze 23°C. Komórki osadzono przez wirowanie w wirówce BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JLA 10.500 (4000 obr/min, 10 min, 4°C). Osad zawieszono w buforze lizującym (1 g bakterii – 3 ml buforu) i lizowano przy wykorzystaniu Prasy Frencha (Thermo Scientific, USA, 1000 psi). Lizat wirowano przy użyciu wirówki BeckmanCoulter Avanti J-30I, rotor JA 30.50 (25000 obr/min, 30 min, 4°C) i następnie zmieszano otrzymany supernatant w stosunku 1:1 z 96% etanolem, inkubując na lodzie przez 10 minut. Otrzymany osad wirowano (25 000 obr/min, 45 min, 4°C) i dializowano do buforu GFP QA. Po dializie preparat zagęszczono przy wykorzystaniu alkoholu poliwinylowego i naniesiono na kolumnę ze złożem Q-Sepharose FF. Elucję ze złoża prowadzono gradientem liniowym z buforu GFP QA do buforu GFP QB przy użyciu systemu ÄKTA prime plus. Frakcje zawierające GFP przedializowano do buforu GFP HydroA i naniesiono na kolumnę ze złożem Hydroxyapatite w celu zagęszczenia preparatu. Elucję ze złoża prowadzono przy wykorzystaniu buforu GFP HydroB. Otrzymane frakcje zostały połączone i preparat poddano wysalaniu siarczanem amonu do 20% nasycenia, a następnie

nałożono na złożę Phenyl-Sepharose HR5/5, zrównoważone buforem GFP PheA. Elucję prowadzono z wykorzystaniem buforu GFP PheB przy użyciu systemu ÄKTA prime plus. Frakcje zawierające białko GFP przedializowano do buforu GFP GF i zagęszczono do objętości około 5 ml przy wykorzystaniu Amicon Ultra-15 centrifuge tubes (Merck Millipore), nałożono na kolumnę do filtracji żelowej Superdex 200 zrównoważoną buforem GFP GF. Po elucji frakcje zawierające oczyszczony preparat GFP zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C .

5.2.13.5. ClpB

Do izolacji białka ClpB z bakterii *E. coli* BL21(DE3) Δ CLPB Rosetta transformowanych plazmidem pET15b-CLPB wykorzystano metodę opisaną w rozdziale 5.2.12.1..

5.2.14. Transformacja komórek *E.coli* metodą szoku cieplnego

100 μl komórek kompetentnych *E.coli* (Rozdział 5.2.8.) inkubowano na lodzie do momentu ich całkowitego rozmrożenia, następnie dodano 30-500 ng oczyszczonego plazmidowego DNA i pozostawiono 30 minut na lodzie. Po tym czasie próbki przeniesiono do 42°C i inkubowano 2 minuty. Po tym czasie przeniesiono do lodu na 2 minuty a następnie dodano 900 μl pożywki LB i inkubowano w termomikserze (600 obr/min, 1 h, 37°C). Po inkubacji komórki wirowano (4000 obr/min, 5 min, 4°C) i wysiano na podłoże LA z odpowiednim antybiotykiem a następnie inkubowano przez noc w temperaturze 37°C . Kontrolą negatywną były nietransformowane komórki wysiewane na to samo podłoże.

5.2.15. Transformacja komórek *S. cerevisiae*

Hodowane przez noc w pożywce YPD w 30°C komórki drożdży *S. cerevisiae* zostały odmłodzone do $\text{OD}_{600}=0,2-0,25$ i inkubowano w 30°C do osiągnięcia $\text{OD}_{600}=0,68-1,0$. Następnie komórki wirowano (3500 obr/min, 3 min, 23°C) a osad rozpuszczono w 10 ml jałowej wody, po czym znowu wirowano i zawieszono w 3 ml buforu TEL, wirowano i zawieszono w 1 ml buforu TEL. Do transformacji użyto 100 μl tak przygotowanej zawiesiny komórek, do których dodano 5 μl ssDNA (10 mg/ml) (inkubowanego przez 5 minut w 95°C , następnie ochłodzonego na lodzie) oraz

100-1000 ng plazmidowego DNA. Taką mieszaninę inkubowano w 30°C przez 0,5 h. Po tym czasie dodano 700 µl buforu PEG i inkubowano od 0,5-1 h w 42°C. Komórki wirowano (3500 obr/min, 5 min, 23°C) dodano świeżej pożywki YPD i inkubowano z wytrząsaniem przez 1,5 h w 30°C. Wirowano (3500 obr/min, 3 min, 23°C) i zwieszono w wodzie. Wysiano na odpowiednie podłoże i inkubowano 3-4 dni w temperaturze 30°C.

5.2.16. Ocena termotolerancji komórek *S. cerevisiae*

Szczep drożdży *W303Δhsp104* transformowany plazmidami pRS313-*HSP104* (lub wariantami tego białka) (Rozdział 5.2.14.) lub szczepy z genomowymi fuzjami z GFP (Rozdział 5.2.4.), hodowano przez noc w pożywce SC – His, rozcieńczono do OD₆₀₀=0,2, a następnie hodowano przez 3 h w 30°C. Po inkubacji, pobrano 100 µl i rozcieńczono do 1 ml następnie pobrano 10 µl i przeliczono ilości komórek przy użyciu komory Neubauera. Odpowiednie objętości hodowli (zawierające po 100 tys. komórek) zostały przeniesione do 37°C i inkubowane przez 30 minut a następnie zostały przeniesione do wytrząsarki wodnej ustawionej na 50°C i poddane szokowi cieplnemu przez 30 minut (180 obr./min). W trakcie szoku co 5 minut pobierano po 50 µl hodowli, wykonano seryjne rozcieńczenia (5x) i nanoszono po 3 µl na wcześniej przygotowane płytki (SC-His) w taki sposób, że wszystkie punkty czasowe znajdują się w pierwszej kolumnie a seryjne rozcieńczenia z danego punktu czasowego znajdują się w jednym rzędzie. Każdy z punktów z pierwszej kolumny odpowiadał liczbie 6000 komórek. Płytki inkubowano 3-4 dni w cieplarni ustawionej na 30°C.

5.2.17. Ocena toksyczności wariantów białka Hsp104 w komórkach *S. cerevisiae*

W eksperymencie wykorzystano szczep drożdży *S. cerevisiae W303Δhsp104* transformowany plazmidami pRS313-*HSP104* (lub wariantami tego genu) (Rozdział 5.2.14.), następnie tak otrzymane transformanty hodowano przez noc w pożywce płynnej (SC-His) rozcieńczono do OD₆₀₀=0,2 a następnie hodowano przez 3 h w 30°C. Po inkubacji pobrano 100 µl i rozcieńczono do 1 ml następnie pobrano 10 µl i przeliczono ilości komórek przy użyciu komory Neubauera. Pobrano odpowiednie objętości hodowli (zawierające po 100 tys. komórek), wykonywano seryjne rozcieńczenia (5x) i nanoszono po 3 µl (punkty z pierwszej kolumny odpowiadały

liczbie 6000 komórek) na wcześniej przygotowane płytki (SC-His). Płytki z drożdżami inkubowano 3-4 dni w cieplarni ustawionej na 30°C.

5.2.18. Pomiar aktywności ATPazowej wariantów białka Hsp104

Metoda pomiaru aktywności ATP-azowej białek została oparta na systemie enzymów sprzężonych opisanych w Norby, 1988. Mieszanina reakcyjna na 0,5 ml zawierała 0,5 μM badanego białka Hsp104 w buforze reakcyjnym AS, bufor enzymatyczny EZ oraz ATP w stężeniu końcowym 1 mM. Próbkę inkubowano przez 5 min w temperaturze 25°C, osobno białko + bufor reakcyjny AS oraz bufor enzymatyczny EZ. Następnie mieszano ze sobą obie zawartości. 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⁺. W analizie mierzono spadek absorbancji NADH w czasie, przy długości 340 nm przy wykorzystaniu spektrofotometru JASCO V-750. Dodatkowo w celu sprawdzenia wpływu substratu na szybkość hydrolizy ATP użyto roztworu kazeiny w końcowym stężeniu 7,5 μM . Wykorzystując prawo Lamberta- Beer'a i znając współczynnik absorbancji NADH $\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ oraz długość drogi optycznej $l = 1 \text{ cm}$ obliczono spadek stężenia NADH w czasie ($\Delta c/\text{min}$). Uzyskane wartości dzielono przez stężenie użytego do analizy białka. Każdy pomiar wykonano w co najmniej 3 powtórzeniach, wykresy przedstawiają średnią wartość na podstawie powtórzeń wraz z odchyleniami standardowymi.

5.2.19. Pomiar zdolności tworzenia struktur oligomerycznych wariantów białka Hsp104 (w obecności ATP) przy wykorzystaniu metody dynamicznego rozpraszania światła - DLS

Pomiar posłużył do analizy tworzenia struktur oligomerycznych (heksamerów) wariantów białka Hsp104. Analizę prowadzono w kuwecie kwarcowej ZEN 2112 o długości drogi optycznej 3 mm. Reakcję kontrolną prowadzono w buforze HKM, natomiast reakcję właściwą w tym samym buforze, ale z dodatkiem 5 mM ATP. Mieszanina reakcyjna (40 μl) zawierała: 1 μM badanego wariantu białka Hsp104, 10 μl

buforu HKM (4x), +/- 5 mM ATP, i była prowadzona w temp. 25°C, przy długości fali 633 nm oraz kącie rozproszenia 173°. Dla każdego pomiaru uśredniono minimum pięć 10-sekundowych przebiegów. Pomiar został przeprowadzony przy użyciu Malvern Instruments ZetaSizer Nano S DLS.

5.2.20. Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP

Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP jest oparta na metodzie opisanej przez Zietkiewicz i wsp., 2004. Eksperyment polega na pomiarze fluorescencji zreaktywowanego przez białka opiekuńcze białka GFP. Substratem reakcji jest białko GFP (4 mg/ml) zdenaturowane termicznie (15 min/85°C). Reakcja była prowadzona w objętości 50 µl przy wykorzystaniu buforu denaturacyjnego GFP. Reakcję inicjowano przez dodanie białek opiekuńczych: białka Hsp104 lub jego wariantów (1 µM), białka Ssa1 (1 µM) i Ydj1 (0,5 µM). Mieszaniny reakcyjne zostały naniesione na płytkę 384-dołkową, zablokowaną wcześniej BSA (0,2 mg/ml). Wzrost fluorescencji a tym samym denaturację GFP, analizowano przy użyciu czytnika mikroplatek Beckman Coulter DTX880. W eksperymentach kompetencyjnych (Rozdział 6.8.) użyto stężeń białek: warianty Hsp104 (0,2 µM), Ssa1 (1 µM) i Ydj1 (0,5 µM), oraz dodatkowo z system regeneracji ATP (0,1 mg/ml CK i 20 mM CP).

5.2.21. Reaktywacja termicznie zagregowanej lucyferazy

Lucyferazę (1,7 mg/ml) denaturowano przez 15 minut w 48°C w buforze renaturacyjnym LUC z dodatkiem 6 M mocznika, następnie rozcieńczono 40-krotnie w samym buforze renaturacyjnym bez mocznika. Wszystkie reakcje reaktywacji lucyferazy prowadzono w 25°C w buforze renaturacyjnym LUC z dodatkiem 10 mM ATP. Dodatkowo w eksperymencie opisanym w rozdziale 6.8. wykorzystano system regeneracji ATP (0,1 mg/ml CK i 20 mM CP). Reakcje renaturacji inicjowano przez dodatek białek Hsp104 (0,5 µM), Ssa1(2 µM), Ydj1 (1 µM). Końcowe stężenie lucyferazy podczas reakcji wynosiło 65 nM. Aktywność lucyferazy mierzono w luminometrze Sirius wykorzystując system Luciferase Assay (Promega). Aktywność renaturowanej lucyferazy porównano z natywnym białkiem (aktywność natywnej lucyferazy traktowano jako 100%). Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym z minimum trzech pomiarów.

5.2.22. Interferometria bio-powierzchniowa – BLI

Interferometria bio-powierzchniowa (*ang.* Bio-Layer Interferometry) jest metodą do badania kinetyki reakcji biochemicznych, w której wykorzystuje się biosensory, do których zimmobilizowane są odpowiednie złoża.

5.2.22.1. Przygotowanie biosensora

Biosensor Dip and Read™ Ni-NTA (NTA) Biosensors (ForteBio) przed właściwą reakcją jest płukany w buforze HKM (10 min, 700 obr/min) w celu hydratacji i zrównoważenia złoża na sensorze. Następnie immobilizowano pierwszą warstwę substratu – lucyferazę ze znacznikiem histydynowym (0,6 mg/ml) w buforze HKM z 6M mocznikiem. Po 15 min inkubacji biosensor został wypłukany w buforze HKM nie zawierającym mocznika. Tak przygotowany przenoszony został do próbówki zawierającej roztwór lucyferazy ze znacznikiem histydynowym (0,1 mg/ml) w buforze HKM i umieszczany w termocyklerze w celu denaturacji termicznej (10 min, 44°C), co spowodowało powstanie warstwy agregatu na biosensorze. Tak opłaszczony biosensor został przeniesiony do próbówki z buforem HKM (10 min) w celu odpłukania niezwiązanych cząsteczek, a następnie wykorzystany do analizy.

5.2.22.2. Analiza oddziaływań *in vitro*

Analizę oddziaływań przeprowadzono w buforze HKM z 5 mM ATP w dwóch układach: pierwszy w którym do biosensora opłaszczonego agregatem lucyferazy wiązano warianty Hsp104 (1 μM) oraz drugi w którym do biosensora wiązano najpierw białka Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (0,8 μM) ewentualnie DnaK (1 μM), DnaJ (0,4 μM) i GrpE (0,3 μM), a następnie dodano białko Hsp104 lub ClpB (1 μM).

5.2.23. Proteoliza FITC-kazeiny

Proteolizę kazeiny FITC (1,8 nM) w obecności agregatów GFP (0-2,7 μM) analizowano za pomocą anizotropii fluorescencji w 30°C w buforze HKM z dodatkiem systemu regeneracji ATP (0,1 mg/ml CK i 20 mM CP) razem z Ssa1 (0,5 μM), Ydj1 (0,5 μM) oraz ClpP (0,4 μM). Reakcję inicjowano przez dodanie wariantów HAP białka

Hsp104 (0,2 μ M). Pomiary przeprowadzono w spektrometrze fluorescencyjnym JASCO FP-8000.

5.2.24. Alkaliczna liza drożdży

Z hodowli drożdży pobrano 100 μ l i rozcieńczono do 1 ml, następnie pobrano 10 μ l i tę ilość nałożono na komorę Neubauera w celu przeliczenia ilości komórek. Następnie objętość odpowiadającą 1,5 mln komórek wirowano. Supernatant usunięto a komórki zawieszono w 0,5 ml buforu TE, następnie ponownie wirowano, usunięto supernatant a komórki zawieszono w 0,5 ml jałowej, lodowatej wody oraz dodano 75 μ l buforu lizującego L. Całość intensywnie wymieszano używając wytrząsarki typu „Vortex” a następnie przeniesiono do lodu i inkubowano 10 minut. Następnie do próbki dodano 575 μ l 50% TCA. Intensywnie wymieszano i pozostawiono na lodzie przez kolejne 10 minut. Po inkubacji próbkę wirowano (14000 obr/min, 10 min, 4°C) i ostrożnie usunięto supernatant a precipitat przemyto dwukrotnie 1 ml lodowatego acetonu. Po pozbyciu się acetonu próbki dodatkowo suszono przez 30 minut pod komorą laminarną, a następnie osad zawieszono w 100 μ l dwukrotnie stężonego buforu Laemmli i inkubowano z wytrząsaniem przez 15 minut w 99°C, aż do całkowitego rozpuszczenia.

6. WYNIKI

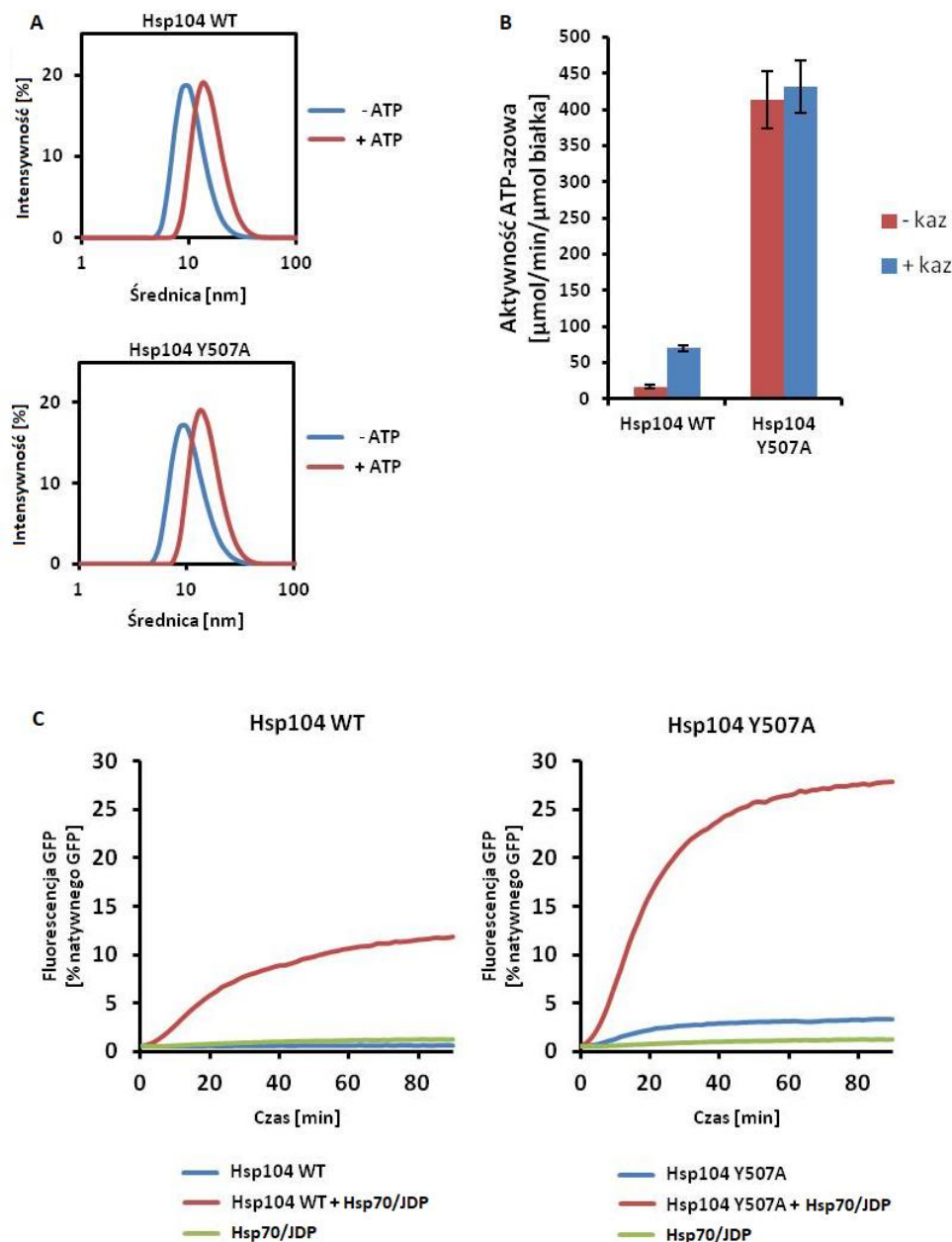
6.1. Substytucja Y507A w białku Hsp104 nie wpływa na oddziaływanie z Hsp70, w porównaniu do homologicznej zmiany w białku ClpB

W literaturze można znaleźć informacje dotyczące miejsca oddziaływania pomiędzy białkami z rodziny Hsp100 a Hsp70. Istotną resztą dla tego typu oddziaływań w białku ClpB z *T. thermophilus* jest tyrozyna w pozycji 494. Wprowadzenie w to miejsce alaniny powoduje zerwanie oddziaływania z białkiem DnaK (Rosenzweig i wsp., 2013). Analogiczna sytuacja jest w przypadku białka ClpB z *E.coli*. Zamiana tyrozyny na alaninę w homologicznej pozycji 503 również skutkuje brakiem współpracy pomiędzy białkiem ClpB a DnaK (Haslberger i wsp., 2007). Tyrozyna w tej pozycji jest bardzo silnie konserwowana w rodzinie białek Hsp100 i występuje również w dezagregazie Hsp104 pochodzącej z *S. cerevisiae*. Jednakże zmiana homologicznej tyrozyny w pozycji 507 na alaninę nie znosi oddziaływania pomiędzy dezagregazą a Hsp70 w systemie drożdżowym, co świadczy o różnicach pomiędzy systemami bakteryjnym i drożdżowym oraz prawdopodobnie jest przyczyną braku kompatybilności między nimi. Wariant Hsp104 Y507A współpracuje z drożdżowym białkiem Hsp70 – Ssa1 (Desantis i wsp., 2014), co wskazuje, że za oddziaływanie pomiędzy tymi białkami u drożdży *S. cerevisiae* odpowiadają reszty aminokwasowe w innych pozycjach. W celu powtórzenia i weryfikacji wyników opisanych w publikacji Desantis i wsp., oczyściłem wariant Hsp104 Y507A oraz przeprowadziłem podstawowe eksperymenty biochemiczne w celu jego charakterystyki.

Wyniki uzyskane przy pomocy DLS pokazują, że białko Hsp104 Y507A tak jak i Hsp104 WT, tworzy heksamer. Przy braku ATP występowały struktury o średniej średnicy poniżej 10 nm, natomiast gdy do mieszaniny reakcyjnej dodałem ATP, zaobserwowałem tworzenie się struktury o średnicy około 13-15 nm, co odpowiada opisanej w literaturze średnicy heksameru Hsp104 (Ryc.16A) (Wendler i wsp. 2007, Yokom i wsp., 2016).

Wykonana przeze mnie analiza aktywności ATPazowej wariantu Y507A wykazała, że hydrolizuje on ATP znacznie szybciej (413 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$ białka) niż białko typu dzikiego (16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$ białka), oraz że jego aktywność ATPazowa jest tylko w niewielkim stopniu stymulowana przez dodanie do reakcji

α -kazeiny (Ryc.16B). α -kazeina jako rozwinięty substrat modelowy może być efektywnie translokowana przez Hsp104 bez systemu Hsp70, dzięki czemu można zmierzyć aktywność ATP-azową dezagregazy podczas translokacji substratu.



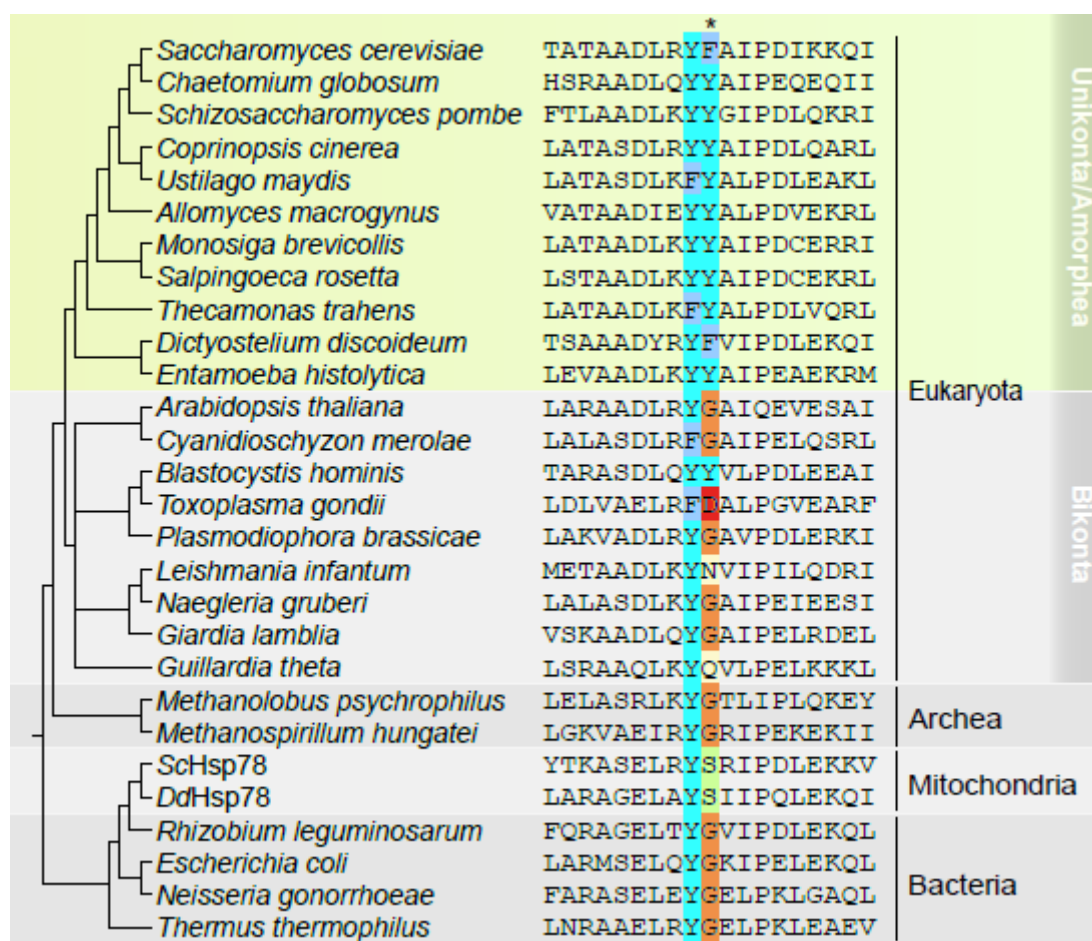
Rycina 16 | Charakterystyka białka Hsp104 Y507A. A | Zdolność tworzenia struktur oligomerycznych pod wpływem ATP. ATP (5 mM) powoduje tworzenie się heksamerów zarówno białka Hsp104 Y507A (1 μM), jak i białka WT (1 μM). **B | Aktywność ATPazowa.** Aktywność ATPazowa wariantów Hsp104 WT (0,5 μM) oraz Hsp104 Y507A (0,5 μM), bez i z dodatkiem α -kazeiny (7,5 μM). **C | Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP.** (lewy panel) Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP przez białko Hsp104 WT (1 μM) bez i z dodatkiem białek Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (1 μM). (prawy panel) Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP przez białko Hsp104 Y507A (1 μM), bez i z dodatkiem białek Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (1 μM).

W reakcji refaldowania termicznie zagregowanego GFP, przy braku systemu Hsp70-JDP, wariant Hsp104 Y507A wykazywał zdolność do reaktywacji tego substratu, co oznacza, że jest wariantem nadaktywnym i jest zdolny do reaktywacji GFP bez systemu Hsp70-JDP. Dodanie do reakcji białek Ssa1 i Ydj1 spowodowało jego stymulację. Wariant Y507A razem z systemem Hsp70-JDP jest zdolny reaktywować około 28% zagregowanego GFP, w porównaniu do białka Hsp104 WT, które jest zdolne do reaktywacji na poziomie około 13% (Ryc.16C). Podobne rezultaty otrzymano przy reaktywacji zagregowanej lucyferazy (Załącznik 2A).

Porównując białka opisane przez Desantis i wsp., (2014) i oczyszczony przeze mnie preparat można stwierdzić, że oba wykazują nadaktywność rozumianą jako zdolność do reaktywacji zagregowanych substratów białkowych pod nieobecność systemu Hsp70-JDP. Oczyszczony przeze mnie wariant Hsp104 Y507A jest silnie stymulowany przez system Hsp70-JDP podczas procesu dezagregacji. Sugeruje to, że u drożdży *S. cerevisiae* za interakcją pomiędzy Hsp104 a Hsp70 może odpowiadać inna reszta aminokwasowa (bądź reszty) niż silnie konserwowana we wszystkich dezagregatach tyrozyna, co skłoniło nas do dokładniejszego zbadania sekwencji aminokwasowych białek z rodziny ClpB/Hsp104.

6.2. Fenyloalanina w pozycji 508 białka Hsp104 odpowiada za współdziałanie z białkiem Hsp70

W pętli pomiędzy 3 a 4 helisą domeny środkowej (MD) białka Hsp104 z *S. cerevisiae*, w pozycji 507 występuje tyrozyna, która jest silnie konserwowana w białkach ClpB/Hsp104 w różnych grupach taksonomicznych. Obok tej silnie konserwowanej reszty, tylko u Uniconta występuje drugi aromatyczny aminokwas. U *S. cerevisiae* jest to fenyloalanina (Ryc.17). Biorąc pod uwagę analizę sekwencji oraz to, że białka Hsp70 z Prokariota nie współpracują z białkami Hsp100 z Eukariota i odwrotnie, można spekulować, że zdolność oddziaływania pomiędzy białkami Hsp100-Hsp70 u drożdży *S. cerevisiae*, może zależeć od obu aromatycznych reszt aminokwasowych w tym regionie (Agnieszka Kłosowska, Rozprawa doktorska, 2017). W celu weryfikacji takiej hipotezy stworzyłem wariant białka Hsp104 Y507A/F508A, pozbawiony obu aromatycznych reszt aminokwasowych.

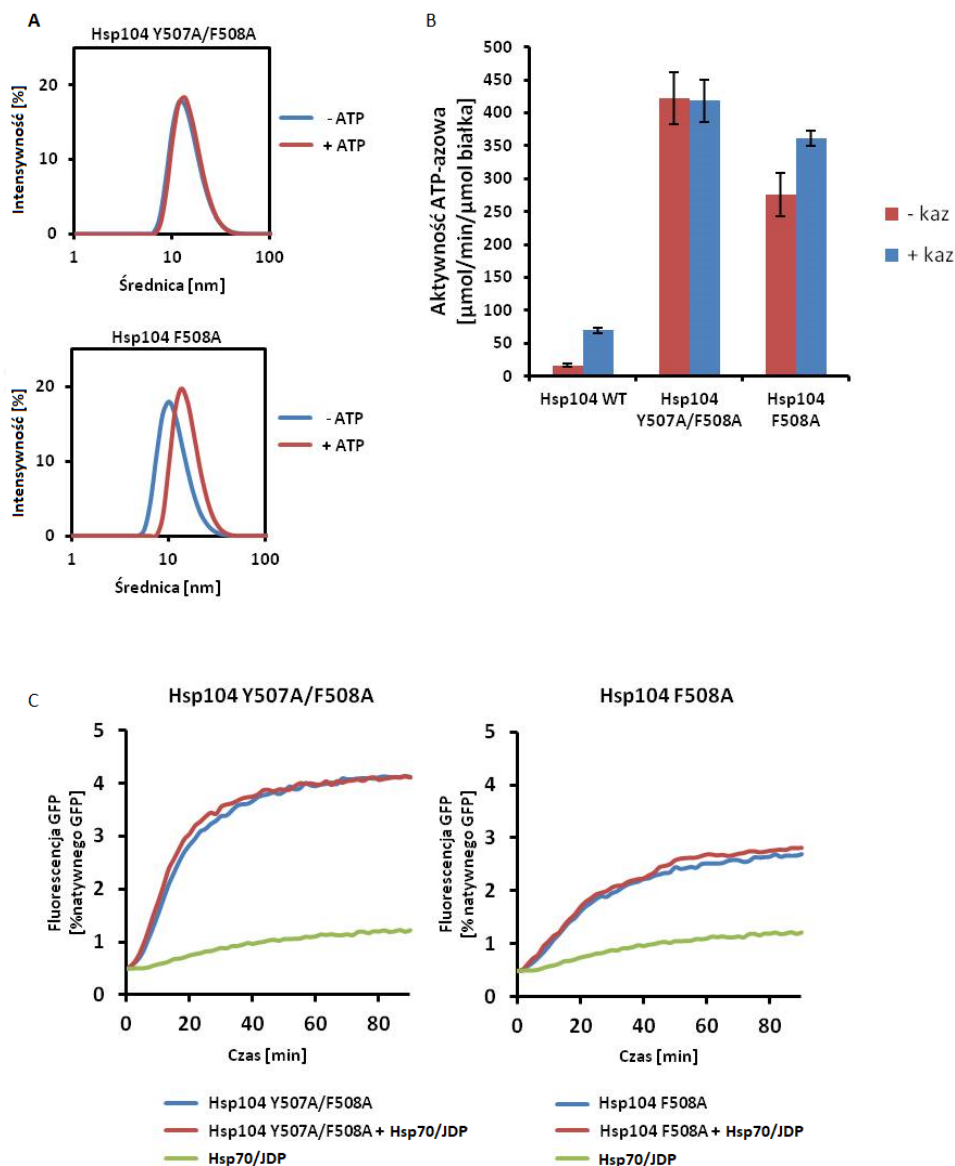


Rycina 17 | Zestawienie sekwencji regionu domeny M w dezagregazach z rodziny Hsp100. Dopasowanie homologicznych sekwencji do fragmentu T499-I517 białka Hsp104 z *Saccharomyces cerevisiae*. Reszty homologiczne do Y507 i F508 (kolumna oznaczona gwiazdką) wyróżniono zgodnie z chemicznym charakterem reszt aminokwasowych: Y – cyjan, F – niebieski, G – pomarańczowy, D – czerwony, N i Q – jasnożółty, S – jasnozielony. Sekwencje zostały ułożone zgodnie z relacjami między organizmami, zaznaczonymi kladogramem po lewej stronie, skonstruowanym zgodnie z Burki, (2014) i Hug i wsp., (2016). Ze względu na endosymbiotyczne pochodzenie mitochondriów, mitochondrialne białko Hsp78 zostało zgrupowane razem z ClpB pochodzącym z α -proteobakteria.

Przeprowadzona przeze mnie analiza właściwości białka Hsp104 Y507A/F508A wykazała, że badany wariant jest heksametrem, co może świadczyć, że wprowadzone zmiany stabilizują strukturę heksameru, przez co nie występuje on w postaci monomerycznej (Ryc.18A). Jego aktywność ATPazowa jest zbliżona do omówionego wcześniej wariantu Hsp104 Y507A, a dodanie do mieszaniny reakcyjnej α -kazeiny nie powoduje wzrostu szybkości hydrolizy ATP, co może świadczyć o tym, że translokowany łańcuch w tym wariantcie Hsp104 nie wpływa na aktywność ATP-azową (Ryc.18B). Hsp104 Y507A/F508A jest także wariantem nadaktywnym, podobnie jak Hsp104 Y507A i reaktywuje zagregowane GFP bez systemu Hsp70/JDP (Ryc.18C). Co ciekawe, wprowadzenie do reakcji białek Ssa1/Ydj1 nie powoduje zwiększenia wydajności reaktywacji zagregowanego GFP, co oznacza, że reszty

Y507/F508 w MD białka Hsp104 są odpowiedzialne za funkcjonalne współdziałanie z Ssa1. Podobne rezultaty otrzymano wykorzystując agregaty lucyferazy (Załącznik 2A). Aby sprawdzić, czy do zerwania oddziaływania między analizowanymi białkami potrzebne są obie aromatyczne reszty aminokwasowe czy może istotna dla oddziaływania jest fenyloalanina 508, znajdującą się obok konserwowanej tyrozyny, stworzyłem wariant wprowadzając tylko substytucje fenyloalaniny w pozycji 508 na alaninę.

W przeprowadzonych analizach biochemicznych, oczyszczony preparat białka Hsp104 F508A bez ATP był monomerem, dopiero dodatek ATP inicjował heksameryzację. Zdolność hydrolizy ATP białka Hsp104 F508A wynosiła 275 $\mu\text{mol}/\text{min}$, a wprowadzenie do reakcji α -kazeiny powodowało wzrost szybkości hydrolizy. Wariant Hsp104 F508A reaktywował zagregowane termicznie GFP odzyskując około 3% fluorescencji GFP. Wyniki uzyskane podczas reaktywacji wskazują, że wariant F508A jest nadaktywny oraz że nie jest on stymulowany przez system Hsp70/JDP (Ryc. 18A-C). W celu potwierdzenia uzyskanych wyników sprawdziliśmy zdolność renaturacyjną wariantu F508A wykorzystując dodatkowy substrat – zagregowaną lucyferazę. Także i w tym eksperymencie okazało się, że system Hsp70/JDP nie jest w znaczącym stanie poprawić wydajności dezagregacji, w porównaniu do białka typu dzikiego (Załącznik 2A). Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że fenyloalanina w pozycji 508 ma kluczowy wpływ na współpracę pomiędzy białkami Hsp104 i Ssa1.



Rycina 18 | Charakterystyka białek Hsp104 Y507A/F508A oraz Hsp104 F508A. A | Zdolność tworzenia struktur oligomerycznych pod wpływem ATP. Białko Hsp104 Y507A/F508A (1 μM) występuje w formie heksamerycznej niezależnie od obecności ATP, natomiast wariant hsp104 F508A (1 μM) tworzy struktury heksameryczne po dodaniu do reakcji ATP (5 mM). **B | Aktywność ATPazowa.** Aktywność ATPazowa wariantów Hsp104 WT (0,5 μM), Hsp104 Y507A/F508A (0,5 μM) oraz Hsp104 F508A (0,5 μM), bez i z dodatkiem α-kazeiny (7,5 μM). **C | Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP.** (lewy panel) Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP przez białko Hsp104 Y507A/F508A (1 μM) bez i z dodatkiem białek Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (1 μM). (prawy panel) Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP przez białko Hsp104 F508A (1 μM), bez i z dodatkiem białek Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (1 μM).

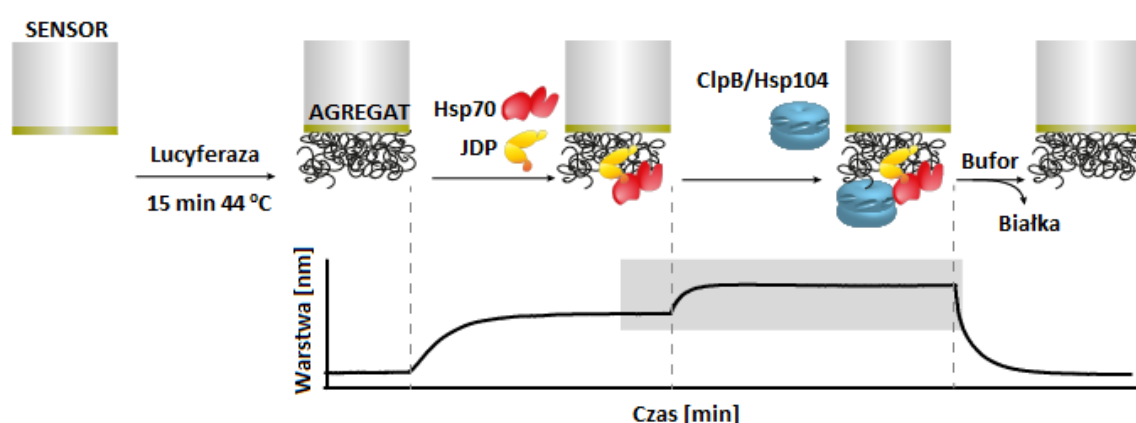
6.3. Wariant białka Hsp104 F508A nie wykazuje zdolności do fizycznego oddziaływania z system Hsp70/JDP

Aktywacja dezagregazy poprzez fizyczne oddziaływanie z Hsp70 jest kluczowym elementem rozpoczęcia translokacji polipeptydu przez kanał Hsp104. Badania nad ClpB i DnaK, w których wykorzystano metodę sieciowania pokazały, że regionem zaangażowanym w oddziaływanie pomiędzy dezagregazą a Hsp70 jest motyw 2 należący do domeny M, oraz że oddziaływanie to jest znacznie silniejsze, gdy w reakcji znajduje się substrat (Seyffer i wsp., 2012).

Próba wykorzystania metody sieciowania, do analizy oddziaływania fizycznego pomiędzy Hsp104 a Ssa1, przeprowadzona przez mnie nie przyniosła spodziewanych rezultatów, nie udało się zaobserwować oddziaływania pomiędzy tymi białkami. Zastosowanie aldehydu glutarowego lub DMS (sieciowanie niespecyficzne), pozwoliło zaobserwować struktury oligomeryczne białka Hsp104, jednak nie pozwoliło na identyfikację kompleksu Hsp104-Ssa1. Przy sieciowaniu specyficznym z wykorzystaniem BPIA i wariantu Hsp104 D492C (cysteina wprowadzona jako miejsce sieciowania), także nie udało się zaobserwować kompleksu pomiędzy dezagregazą a białkiem Ssa1. Nieudane próby sieciowania przy użyciu wyżej wymienionych odczynników mogą świadczyć o tym, że kompleks Hsp104-Ssa1 jest nietrwały przez co jest trudny do zaobserwowania przy użyciu takiej metody. Ze względu na to podjąłem próbę znalezienia metody, która pozwoli zaobserwować funkcjonalne oddziaływanie w tym systemie. W analizie tworzenia się kompleksu pomiędzy Hsp104 a Ssa1 wykorzystałem metodę interferometrii bio-warstwowej (ang. BLI - Bio-Layer Interferometry), dzięki której można monitorować oddziaływania pomiędzy białkami w czasie rzeczywistym. Poprzez BLI chciałem sprawdzić, czy wariant Hsp104 F508A, który stracił możliwość funkcjonalnej współpracy z Ssa1, jest zdolny do oddziaływania fizycznego z tym białkiem na powierzchni agregatu. W eksperymencie wykorzystano wszystkie białka systemu dezagregacyjnego tj.: JDP, Hsp70 i Hsp100, immobilizując je po kolei na wytworzonym agregacie, dzięki czemu udało się zbadać zdolność wiązania Hsp100 do powierzchni agregatu poprzez Hsp70/JDP.

Przygotowanie systemu do analizy zostało opisane w rozdziale 5.2.21.1. Na rycinie 19 przedstawiono schematycznie przebieg reakcji. Sensor z zimmobilizowaną, zagregowaną lucyferazą umieszczono w aparacie,

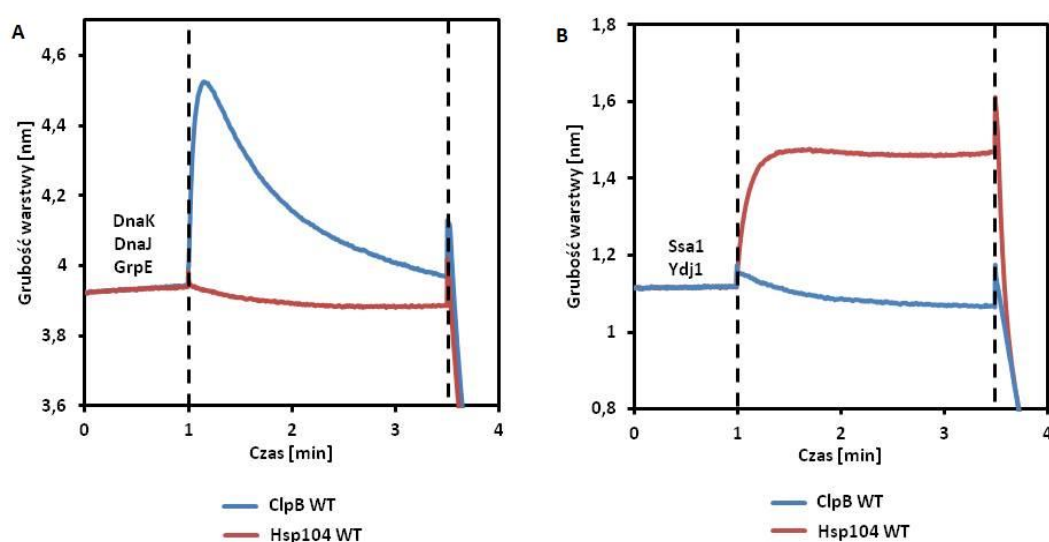
w próbówce zawierającej bufor HKM w celu wyznaczenia linii bazowej, następnie wprowadzono próbkę zawierającą białka Hsp70 i JDP. Wzrost grubości warstwy wskazuje, że wprowadzone białka oddziałują z zimmobilizowaną na sensorze zagregowaną lucyferazą. Kolejnym krokiem było wprowadzenie do reakcji białka Hsp100. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej dezagregazy powoduje jej wiązanie i wzrost grubości warstwy na sensorze. Po zakończonej reakcji sensor umieszczono w buforze HKM, aby odpłukać związane białka.



Rycina 19 | Schemat przebiegu eksperymentu z wykorzystaniem metody BLI. Do sensora NI-NTA, związano lucyferazę znakowaną ogonem histydynowym, a następnie inkubowano z lucyferazą (bez znacznika histydynowego) przez 15 min w 44°C. Na sensorze powstała warstwa zagregowanych białek. Do tak przygotowanego sensora w pierwszej kolejności związano białka Hsp70/JDP, a następnie dodawano ClpB/Hsp104. Po stworzeniu kompleksu sensor przeniesiono do próbówki z buforem reakcyjnym w celu odpłukania białek.

W celu sprawdzenia skuteczności działania metody BLI i możliwości zaobserwowania fizycznego oddziaływania pomiędzy Hsp100 a Hsp70, wykorzystałem do analizy białka należące do systemu drożdżowego (Hsp104, Ssa1 i Ydj1 z *S. cerevisiae*) i bakteryjnego (ClpB, DnaK, DnaJ i GrpE z *E. coli*). Białka opiekuńcze wykazują tzw. specyficzność gatunkowa, czyli bakteryjne białka Hsp100 i Hsp70 nie współpracują z eukariotycznymi i na odwrót. Ta cecha posłużyła jako kontrola do weryfikacji poprawności działania BLI, sprawdzając zdolność oddziaływania pomiędzy białkami z obu systemów. Do warstwy zagregowanej lucyferazy dodałem bakteryjne białka systemu Hsp70-JDP-NEF (DnaK, DnaJ i GrpE), a następnie bakteryjne białko ClpB albo drożdżowe białko Hsp104 (Ryc.20A). Otrzymane wyniki pokazują, że bakteryjne białka fizycznie oddziałują ze sobą, co obserwujemy przez wzrost grubości warstwy na sensorze. W przypadku białka Hsp104 nie zauważono związania do sensora, co potwierdza brak oddziaływania z bakteryjnym systemem Hsp70. Po związaniu do sensora białka ClpB zaobserwowano zmniejszanie się grubości warstwy. Można to wytłumaczyć tym, że bakteryjne białka opiekuńcze aktywnie

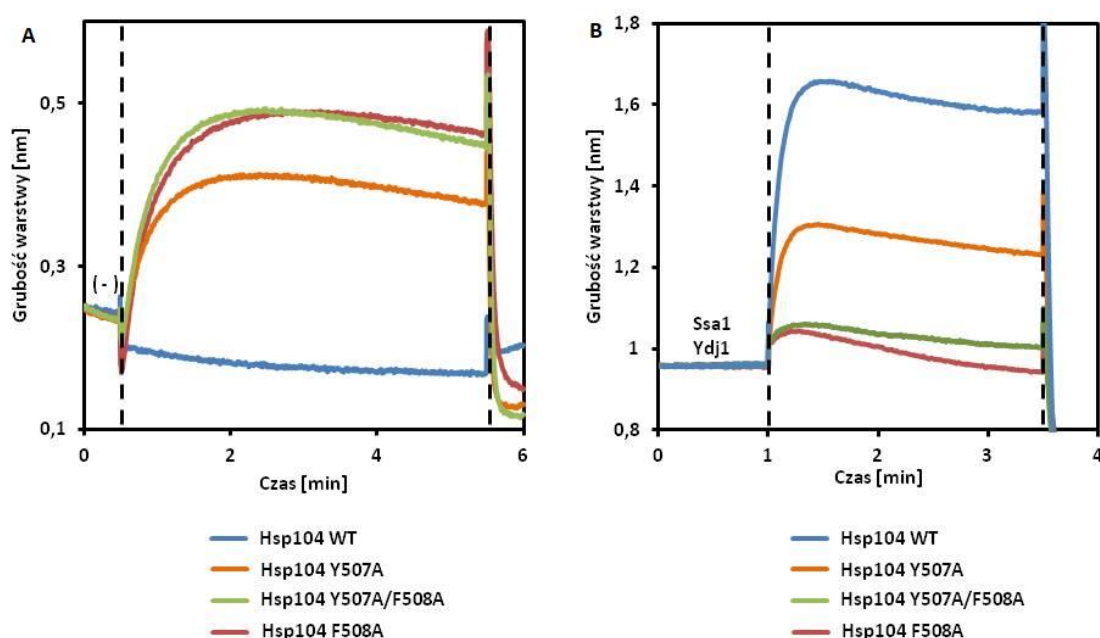
reaktywują zimmobilizowaną na sensorze zagregowaną lucyferazę. Na rycinie 20B do sensora opłaszczonego zagregowaną lucyferazą wprowadzono drożdżowy system Hsp70-JDP (Ssa1, Ydj1), a następnie białko ClpB albo Hsp104. Także w tym wypadku zauważono brak oddziaływania pomiędzy białkami pochodzącymi z różnych gatunków (Ssa1/Ydj1 – ClpB) oraz interakcje pomiędzy białkami z tego samego gatunku (Ssa1/Ydj1 – Hsp104). Oba przedstawione eksperymenty pokazały, że metoda BLI jest skuteczna przy analizie oddziaływań pomiędzy białkami biorącymi udział w procesie dezagregacyjnym zarówno w systemie bakteryjnym jak i drożdżowym, dlatego wykorzystałem ją do analizy oddziaływania pomiędzy Ssa1 a wariantami Hsp104 opisanymi wcześniej.



Rycina 20 | Analiza fizycznych oddziaływań pomiędzy białkami opiekuńczymi z *E. coli* i *S. cerevisiae*. A | Analiza oddziaływań pomiędzy bakteryjnym systemem Hsp70/JDP a dezagregazami ClpB oraz Hsp104. Sensor BLI pokryty agregatami lucyferazy inkubowano w pierwszej kolejności z białkami DnaK (1 μ M), DnaJ (0,4 μ M), GrpE (0,3 μ M), następnie do reakcji dodano ClpB (1 μ M) lub Hsp104 (1 μ M). **B | Analiza oddziaływań pomiędzy drożdżowym systemem Hsp70/JDP a dezagregazami ClpB oraz Hsp104.** Sensor BLI pokryty agregatami lucyferazy inkubowano w pierwszej kolejności z białkami Ssa1 (1 μ M), Ydj1 (0,8 μ M), następnie do reakcji dodano ClpB (1 μ M) lub Hsp104 (1 μ M). W celu łatwiejszej analizy wykresy przedstawiają tylko etap dodania i odpłukania białek Hsp100.

Rycina 21A przedstawia wyniki eksperymentu, w którym sprawdziłem oddziaływanie białek Hsp104: WT, Y507A, Y507A/F508A, oraz F508A z wytworzoną na sensorze warstwą zagregowanej lucyferazy. Białko Hsp104 WT bez Ssa1 i Ydj1 nie jest zdolne do fizycznego oddziaływania z agregatem białkowym, natomiast pozostałe analizowane warianty Hsp104 wykazują oddziaływanie z warstwą agregatu. Uzyskane wyniki korelują ze zdolnością nadaktywnych wariantów Hsp104 do

samodzielnej reaktywacji zagregowanego substratu. Na rycinie 21B przedstawiono wyniki eksperymentu, w którym do zagregowanej na sensorze lucyferazy dodano białka Ssa1 i Ydj1, które związały się do agregatu, a następnie wprowadzono do układu warianty białka Hsp104. Wariant Y507A oddziałuje z agregatem przez białka Ssa1 i Ydj1, podobnie jak białko Hsp104 WT. Jednakże, zarówno wariant Y507A/F508A jak i F508A, w porównaniu do białka WT i wariantu Y507A, wykazują znacznie mniejszą zdolność do oddziaływania z agregatem poprzez białka Ssa1 i Ydj1. Podsumowując, warianty Hsp104, w których wprowadzono zmiany w motywie 2 MD, są zdolne do oddziaływania z agregatami bez systemu Hsp70-JDP. Dodatkowo warianty, w których wprowadzono substytucje w pozycji 508 straciły możliwość oddziaływania z agregatem poprzez białko Ssa1.



Rycina 21 | Analiza oddziaływań wariantów białka Hsp104. A | Oddziaływanie pomiędzy agregatami lucyferazy a wariantami białka Hsp104. Sensor BLI pokryty agregatami lucyferazy inkubowano z wariantami Hsp104 (1 μ M): Y507A, Y507A/F508A, oraz F508A, a następnie odpłukano białka. **B | Oddziaływanie pomiędzy agregatami lucyferazy a wariantami białka Hsp104 w obecności Hsp70/JDP (Ssa1 i Ydj1).** Sensor BLI pokryty agregatami lucyferazy inkubowano w pierwszej kolejności z białkami Ssa1 (1 μ M), Ydj1 (0,8 μ M), następnie do reakcji dodano poszczególne warianty białka Hsp104 (1 μ M): Y507A, Y507A/F508A, oraz F508A, a następnie odpłukano białka. W celu łatwiejszej analizy wykresy przedstawiają tylko etap dodania i odpłukania białek Hsp100.

6.4. Analiza heteroheksamerów Hsp104 złożonych z podjednostek WT oraz wariantu F508A

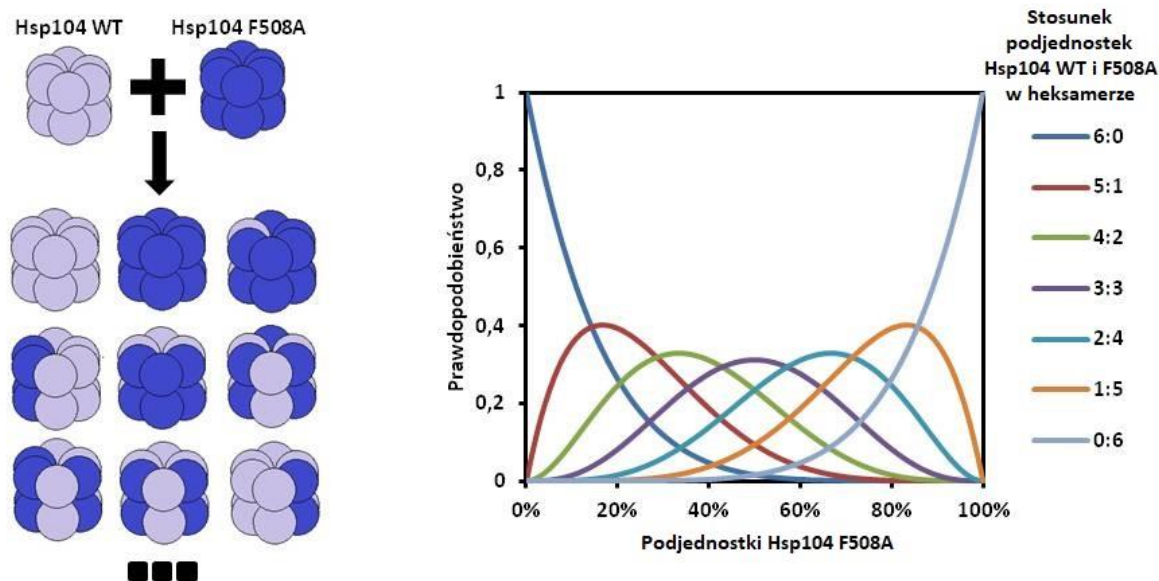
6.4.1. Teoretyczna analiza tworzenia heksamerów

Aktywną formą białka Hsp104 zdolną do reaktywacji zagregowanych substratów jest heksamer, którego wytworzenie można obserwować przez dodatek ATP do reakcji. Dzięki tej zdolności, po zmieszaniu monomerów różnych wariantów, dodając ATP, można wytworzyć heksamery zbudowane z dwóch różnych wariantów białka Hsp104 (Ryc.22A). Mieszając ze sobą monomery funkcjonalne i upośledzone w oddziaływaniu z Hsp70, możemy spróbować odpowiedzieć na pytanie, ile podjednostek nieoddziałujących z Hsp70 może występować w heksamerze, aby w dalszym ciągu możliwa była efektywna dezagregacja.

Pierwszym krokiem w celu odpowiedzi na to pytanie było stworzenie modelu przedstawiającego prawdopodobieństwo rozmieszczenia podjednostek obu wariantów białka w heksamerze. Stworzenie takiego modelu wymagało wprowadzenia kilku założeń obrazujących właściwości heksamerów:

1. Jednostką funkcjonalną białka jest heksamer;
2. Wszystkie monomery mają takie same predyspozycje do tworzenia struktur oligomerycznych;
3. Wprowadzenie do heksameru jednej niefunkcjonalnej podjednostki zmniejsza aktywność białka o $1/6$ biorąc pod uwagę aktywność heksameru zbudowanego tylko z funkcjonalnych podjednostek;
4. Aktywność systemu jest proporcjonalna do liczby aktywnych heksamerów, czyli im większa ilość aktywnych heksamerów tym obserwowana aktywność jest większa;
5. Jeżeli w wytworzonym heteroheksamerze występują interakcję między podjednostkami, pewna liczba zmutowanych podjednostek może spowodować całkowitą utratę aktywności.

Bazując na tych założeniach otrzymaliśmy model obrazujący prawdopodobieństwo wystąpienia monomerów białka w heksamerach (Ryc. 22B) (Werbeck i wsp., 2008, DeSantis i wsp., 2014).



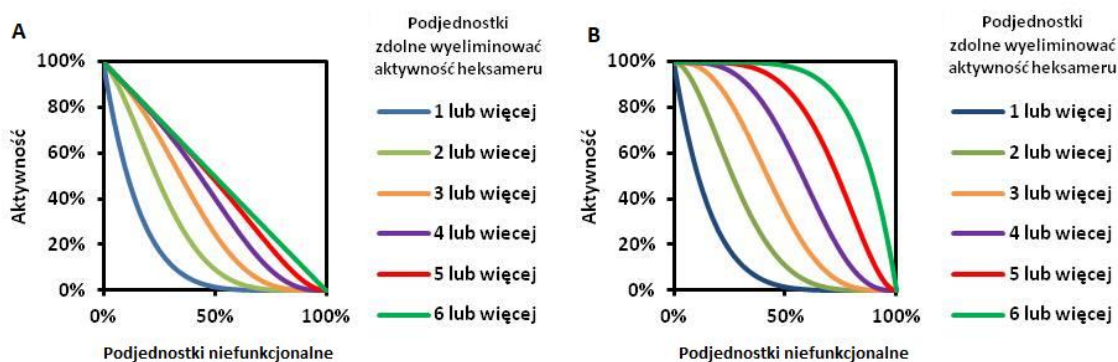
Rycina 22 | Teoretyczna analiza tworzenia się heksamerów. A | Tworzenie heteroheksamerów złożonych z podjednostek Hsp104 WT i F508A. Schemat przedstawia możliwe rozmieszczenie podjednostek w heksamerze po zmieszaniu białek Hsp104 WT i Hsp104 F508A. **B| Prawdopodobieństwo występowania podjednostek w heteroheksamerach.** Zmieszanie Hsp104 WT i Hsp104 F508A, prowadzi do powstania heteroheksamerów. Wykres przedstawia prawdopodobieństwo tworzenia się heteroheksamerów zawierających różną liczbę podjednostek Hsp104 F508A.

Założenia opisane powyżej a także prawdopodobieństwo tworzenia się heksamerów z daną ilością podjednostek zmutowanych pozwoliło na obliczenie teoretycznych krzywych aktywności mieszanin heteroheksamerów. Zarówno w pracy Werbeck i wsp. (2008) jak i DeSantis i wsp. (2014) zastosowano model, w którym aktywność zmienia się w zależności od procentu zmutowanych podjednostek przy założeniu, że aktywność heksameru jest proporcjonalna do liczby aktywnych podjednostek, a wszystkie podjednostki w heksamerze są nieaktywne, gdy zostanie przekroczona określona liczba zmutowanych podjednostek na heksamer. Ze względu na to, że zastosowane przez autorów warianty dezagregaz były nieaktywne, do wyliczenia aktywności heteroheksamerów wykorzystali oni model przedstawiony na rycinie 23A. W niniejszej pracy, do tego samego typu eksperymentu, wykorzystałem wariant Hsp104 F508A, który nie oddziałuje z systemem Hsp70/JDP, ale wykazuje aktywność dezagregacyjną i jest nadaktywny. W związku z tym, niektóre założenia modelu zostały zmodyfikowane tak, aby mógł on lepiej przewidywać aktywność mieszanin heteroheksamerów WT-F508A. Zastosowany przeze mnie model obejmuje następujące założenia:

1. Jednostką funkcjonalną białka jest heksamer;
2. Wszystkie monomery mają takie same predyspozycje do tworzenia struktur oligomerycznych;

3. Rozmieszczenie podjednostek w heksamerze nie wpływa na jego aktywność przy takiej samej proporcji WT:F508A (np. heksamer posiadający dwie podjednostki danego wariantu sąsiadujące ze sobą jest równoważny heksamerowi, który posiada te jednostki po przeciwnych stronach);
4. Tylko podjednostki białka typu dzikiego mogą oddziaływać z systemem Hsp70 i być przez niego aktywowane;
5. Pewna liczba podjednostek z zaburzonym oddziaływaniem z Hsp70 może spowodować całkowitą utratę zdolności heksameru do oddziaływania z Hsp70 i spadek aktywności heksameru do poziomu aktywności homoheksameru zbudowanego tylko z podjednostek niefunkcyjnych;
6. Wszystkie heteroheksamery posiadają zdolność do translokacji przez kanał centralny łańcuchów polipeptydowych i dopóki oddziaływanie heksameru z Hsp70 jest zachowane, aktywność heteroheksameru jest zbliżona Hsp104 WT z Ssa1/Ydj1.

Bazując na tych założeniach, wyliczono teoretyczne krzywe aktywności heteroheksamerów, pokazujące jak zamienia się aktywność wytworzonych heksamerów przy danej liczbie podjednostek niefunkcyjnych tzn. nie oddziałujących z Hsp70 (Ryc. 23B). Zmodyfikowany model aktywności posłuży w następnych rozdziałach do analizy i weryfikacji otrzymanych wyników doświadczalnych.



Rycina 23 | Modele teoretyczne przedstawiające teoretyczne aktywności mieszanin heteroheksamerów Hsp104. A | Wykres zależności aktywności mieszaniny heteroheksamerów od udziału procentowego wariantu Hsp104 w mieszaninie z WT dla modeli uwzględniających, że warianty Hsp104 są nieaktywne dezagregacyjnie. Kolorami zaznaczono krzywe teoretyczne, przy założeniu, że odpowiednia ilość nieaktywnych podjednostek eliminuje aktywność heteroheksameru. B | Wykres zależności aktywności mieszaniny heteroheksamerów od udziału procentowego wariantu Hsp104 w mieszaninie z WT dla modeli uwzględniających, że warianty Hsp104 są aktywne dezagregacyjnie. Kolorami zaznaczono krzywe teoretyczne, przy założeniu, że odpowiednia ilość podjednostek nieoddziałujących z Hsp70 eliminuje aktywność heteroheksameru. A i B zmodyfikowano na podstawie: Werbeck i wsp., 2008, DeSantis i wsp., 2012

6.4.2. Eksperymentalna analiza heteroheksamerów złożonych z podjednostek Hsp104 WT i Hsp104 F508A

Po ustaleniu założeń teoretycznych przedstawionych powyżej zaprojektowałem i wykonałem dwa typy eksperymentów. Zbadałem zdolność do reaktywacji agregatów lucyferazy przez heteroheksamery zbudowane z podjednostek WT i F508A oraz możliwość oddziaływania heteroheksamerów z agregatami poprzez białka Ssa1/Ydj1 przy użyciu metody BLI.

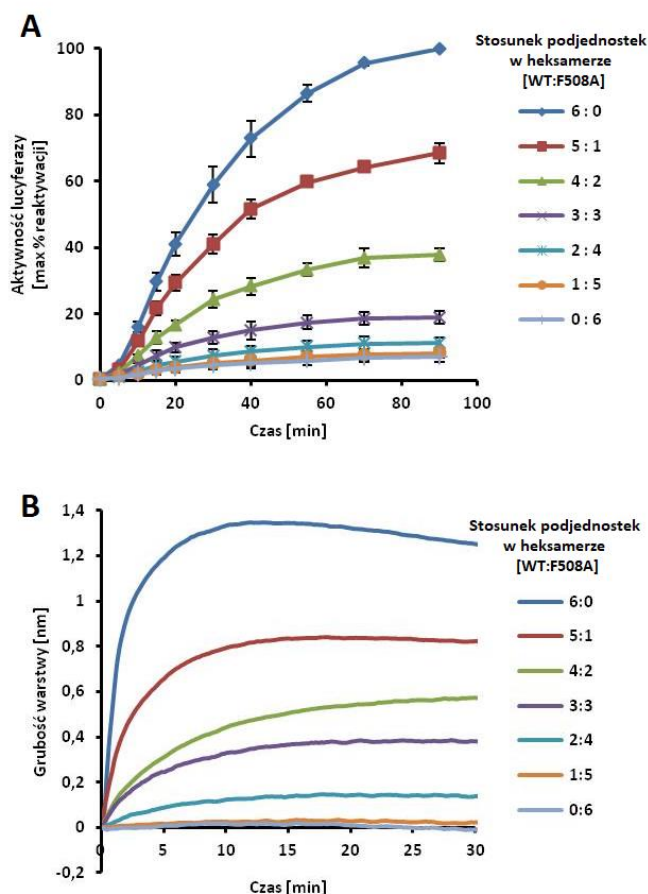
W celu przeprowadzenia eksperymentu, który spróbuje odpowiedzieć na pytanie ile podjednostek nieoddziałujących z Hsp70 może występować w heksamerze, aby mógł on przeprowadzać efektywną dezagregację, zmieszałem Hsp104 WT oraz wariant F508A w stosunkach przedstawionych w tabeli 1 tak, aby końcowe stężenie białka wynosiło 1 μ M. Następnie sprawdziłem zdolność tak wytworzonych heteroheksamerów do reaktywacji zagregowanej lucyferazy w obecności Hsp70. Otrzymane wyniki przedstawiłem na rycinie 24A. Wraz ze wzrostem ilości podjednostek wariantu F508A, zdolność do reaktywacji zagregowanej lucyferazy przez wytworzone heteroheksamery spada wraz z rosnącym udziałem F508A. Dodatkowo jako kontrolę w tym eksperymencie, chciałem sprawdzić jaki wpływ na aktywność reaktywacyjną Hsp104 WT będzie miało rozcieńczenie tego białka samym buforem w tych samych stosunkach jak w przypadku mieszania z Hsp104 F508A (Załącznik 3).

	Stosunek podjednostek						
Podjednostki Hsp104 WT	6 (100%)	5 (83,3%)	4 (66,6%)	3 (50%)	2 (33,3%)	1 (16,6%)	0 (0%)
Podjednostki Hsp104 F508A	0 (0%)	1 (16,6%)	2 (33,3%)	3 (50%)	4 (66,6%)	5 (83,3%)	6 (100%)

Tabela 1 | Stosunek podjednostek białek WT i F508A używanych w eksperymentach.

W przypadku zdolności do oddziaływania fizycznego mierzonego przy użyciu metody BLI wyniki wyglądały podobnie. Białka w tym eksperymencie były mieszane tak jak to przedstawiono w tabeli 1, jednakże końcowe stężenie otrzymanych heteroheksamerów wynosiło 4 μ M. Rycina 24B przedstawia zdolności wiązania z sensorem opłaszczonym przez zagregowaną lucyferazę oraz białka Hsp70-JDP, przez

wytworzone heteroheksamery. Tak jak w przypadku reaktywacji zagregowanej lucyferazy, wraz ze wzrostem ilości podjednostek wariantu F508A zdolność do oddziaływania z Hsp70 ns powierzchni agregatu spada.

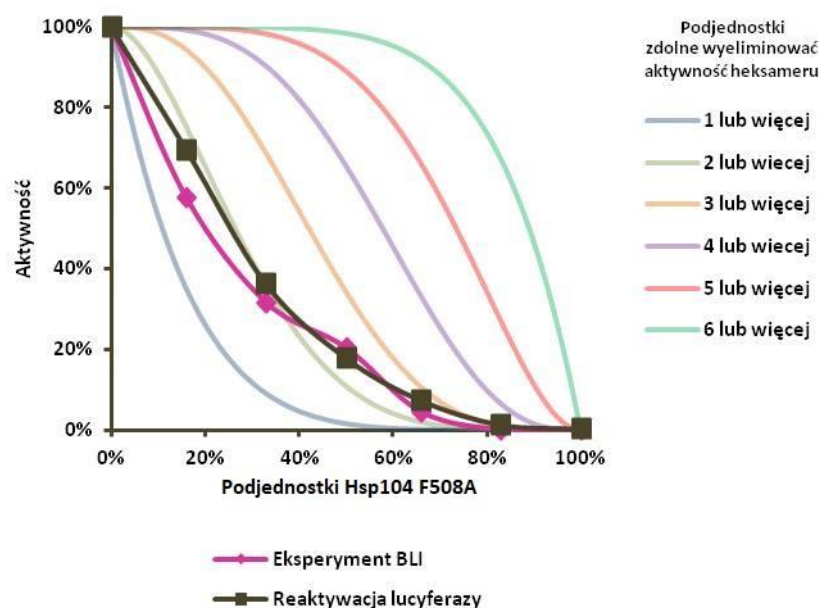


Rycina 24 | Analiza eksperymentalna heteroheksamerów stworzonych z monomerów białka Hsp104 WT i wariantu F508A. A | Zdolność do reaktywacji zagregowanej lucyferazy przez heteroheksamery. Zdenaturowaną termicznie lucyferazę reaktywowano przez dodatek wytworzonych heteroheksamerów Hsp104 (1 μ M) w obecności Ssa1 (1 μ M) oraz Ydj1 (1 μ M). Stosunki w jakich mieszano warianty Hsp104 przedstawiono w Tabeli 1. Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym z minimum trzech pomiarów. **B | Zdolność do fizycznego oddziaływania heteroheksamerów z systemem Hsp70/JDP.** Do sensora z zagregowaną lucyferazą zostały dodane białka Ssa1 (1 μ M) oraz Ydj1 (0,8 μ M), następnie dodano heteroheksamery białka Hsp104 (4 μ M), przygotowane według Tabeli 1. W celu łatwiejszej analizy wykresy przedstawiają tylko etap dodania i odpłukania heteroheksamerów Hsp104.

6.4.3. Model teoretyczny a eksperymentalna analiza heteroheksamerów

W celu analizy otrzymanych wyników eksperymentalnych i ich porównania z modelem teoretycznym, z eksperymentu reaktywacji lucyferazy obliczyłem prędkość początkową reakcji dla poszczególnych mieszanin heteroheksamerów, przyjmując jako 100% aktywności prędkość początkową (maksymalna aktywność reaktywacyjna w przeciągu pierwszych 15 minut reakcji) reaktywacji heksameru złożonego tylko z podjednostek typu dzikiego. Natomiast dla eksperymentów typu BLI, przyjąłem maksymalną wartość wiązania do sensora dla heteroheksamerów, porównaną z sygnałem pochodzącym od homoheksameru złożonego z podjednostek WT (maksymalna wartość wiązania - 100%). Oba wyniki zostały porównane z omówionymi wcześniej krzywymi teoretycznymi (Ryc. 25).

Analiza krzywych eksperymentalnych zarówno z reaktywacji agregatów lucyferazy oraz zdolności oddziaływania fizycznego wskazuje, że obecność dwóch podjednostek wariantu F508A w heteroheksamerze eliminuje jego aktywność. Wyniki sugerują, że aby heksamer białka Hsp104 wykazywał pełną aktywność dezagregacyjną potrzeba co najmniej 5 podjednostek WT, które są zdolne do oddziaływania z systemem Hsp70.



Rycina 25 | Porównanie krzywych teoretycznych oraz wyników eksperymentalnych dla aktywności heteroheksamerów. Nałożenie wyników eksperymentalnych otrzymanych metodą BLI oraz z reaktywacji zagregowanej lucyferazy, na krzywe teoretyczne.

6.5. Analiza *in vivo* funkcjonalności wariantu Hsp104 F508A.

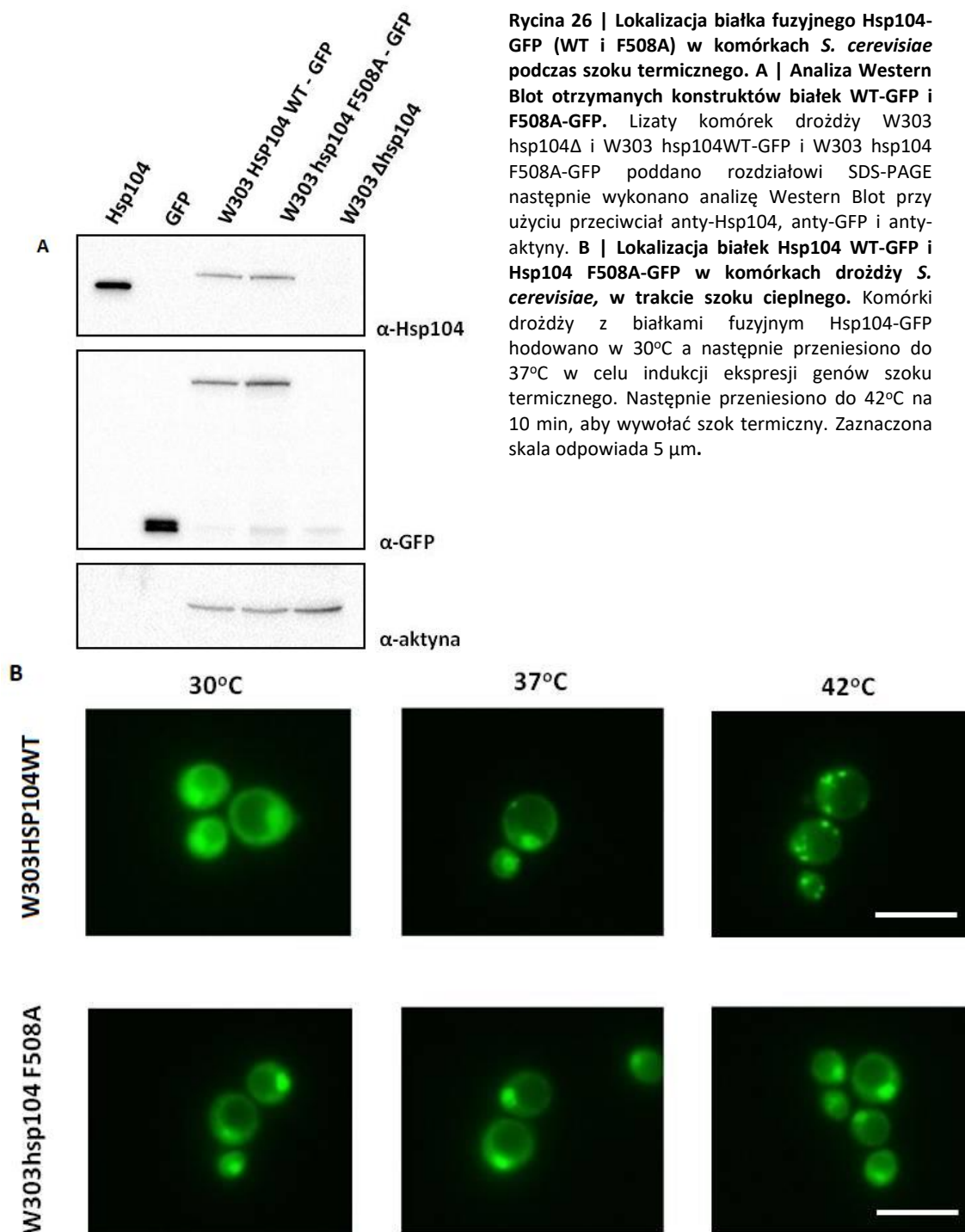
6.5.1. Lokalizacja białka fuzyjnego Hsp104-GFP (WT i F508A) w komórkach *S. cerevisiae* podczas szoku termicznego

Eksperymenty *in vitro* pokazały, że białko Hsp104 F508A nie wykazuje współdziałania zarówno pod kątem funkcjonalnym jak i fizycznym z systemem Hsp70/JDP, a co za tym idzie nie jest zdolny rozpoznawać zagregowane białka. Zadałem sobie pytanie czy wprowadzając ten wariant białka do komórek *S. cerevisiae* będzie on zdolny skupiać się przy wytworzonych podczas szoku termicznego agregatach. Jak opisano w literaturze, w komórkach drożdży narażonych na stres temperaturowy białko fuzyjne Hsp104-GFP lokalizuje się w agregatach tworząc

skupiska fluorescencyjne (ang. foci) (Oromendia i wsp., 2012). Aby ocenić lokalizację wariantów Hsp104 podczas szoku temperaturowego, połączyłem geny *HSP104* i *hsp104 F508A* z genem kodującym GFP, dodatkowo wprowadziłem sekwencje homologiczne (do miejsca wprowadzenia na genomie) na końcach konstruktów. Tak przygotowane geny fuzyjne wprowadziłem do genomu drożdży wykorzystując rekombinację homologiczną (Rozdział 5.2.3. i 5.2.4).

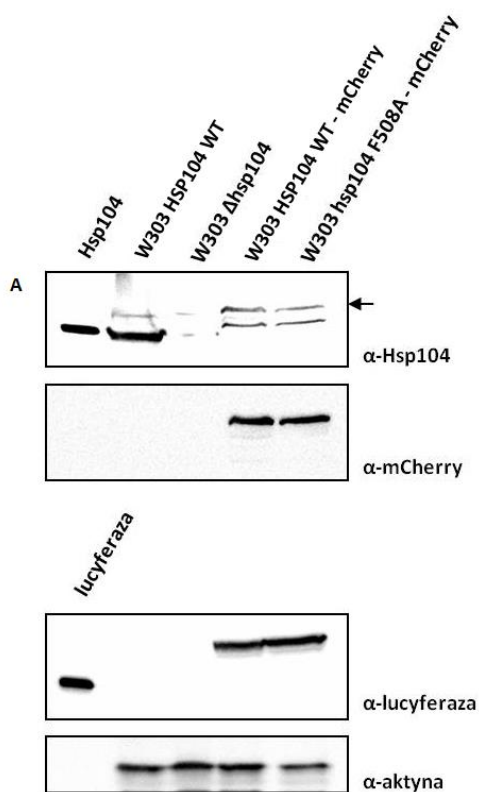
W celu sprawdzenia prawidłowości wytworzonych konstruktów oraz poziomu ekspresjonowanych białek wykonałem analizę Western Blot, stosując przeciwciała specyficzne dla białek: Hsp104, GFP oraz aktyny. Jak widać na rycinie 26A, detekcja białka Hsp104 w ścieżkach zawierających lizaty ze szczepów *W303hsp104WT-GFP* oraz *W303hsp104F508A-GFP* wykazała, że prążki odpowiadające białkom fuzyjnym, znajdują się wyżej (ok. 130 kDa) w porównaniu do wzorca Hsp104 (ok. 100 kDa), co potwierdza, że konstrukt został wykonany prawidłowo i w komórkach występuje genomowa fuzja *HSP104-GFP*. Detekcja GFP także pokazała występowanie prążków reprezentujących białka fuzyjne na wysokości ok. 130 kDa w porównaniu do wzorca GFP. Dodatkowo jako kontrolę przeprowadziłem detekcję β -aktyny. Uzyskane wyniki potwierdzają, że konstrukt został wykonany prawidłowo i w komórkach występuje genomowa fuzja HSP104-GFP.

Następnie wykonałem eksperyment w celu zbadania lokalizacji obu białek fuzyjnych w komórkach *S. cerevisiae* podczas szoku termicznego. Rycina 26B prezentuje obrazy mikroskopowe komórek drożdży z wprowadzonymi fuzjami *HSP104-GFP*. W temperaturze optymalnej dla drożdży (30°C) zarówno Hsp104 WT jak i wariant F508A są rozproszone w cytoplazmie. Przeniesienie hodowli do 42°C, powoduje skupienie się Hsp104 WT, natomiast wariant F508A w dalszym ciągu pozostaje rozproszony w cytoplazmie. Przedstawiony eksperyment pokazuje, że wariant F508A nie jest w stanie lokalizować się podczas szoku termicznego, w przeciwieństwie do Hsp104 WT. W wyniku obserwacji ponad stu komórek obu szczepów stwierdziłem, że 99% komórek ekspresyjujących białko Hsp104 WT, wykazywało tworzenie się skupisk w 42°C, natomiast w komórkach z wariantem F508A tylko w 16% komórek można było zaobserwować tworzenie się takich ognisk fluorescencyjnych podczas szoku cieplnego. Wyniki te wskazują na to, że oddziaływanie z białkiem Ssa1 ma kluczowe znaczenie dla rozpoznawania agregatów przez Hsp104 i lokalizowaniu do ich powierzchni podczas szoku termicznego w komórkach drożdży *S. cerevisiae*.

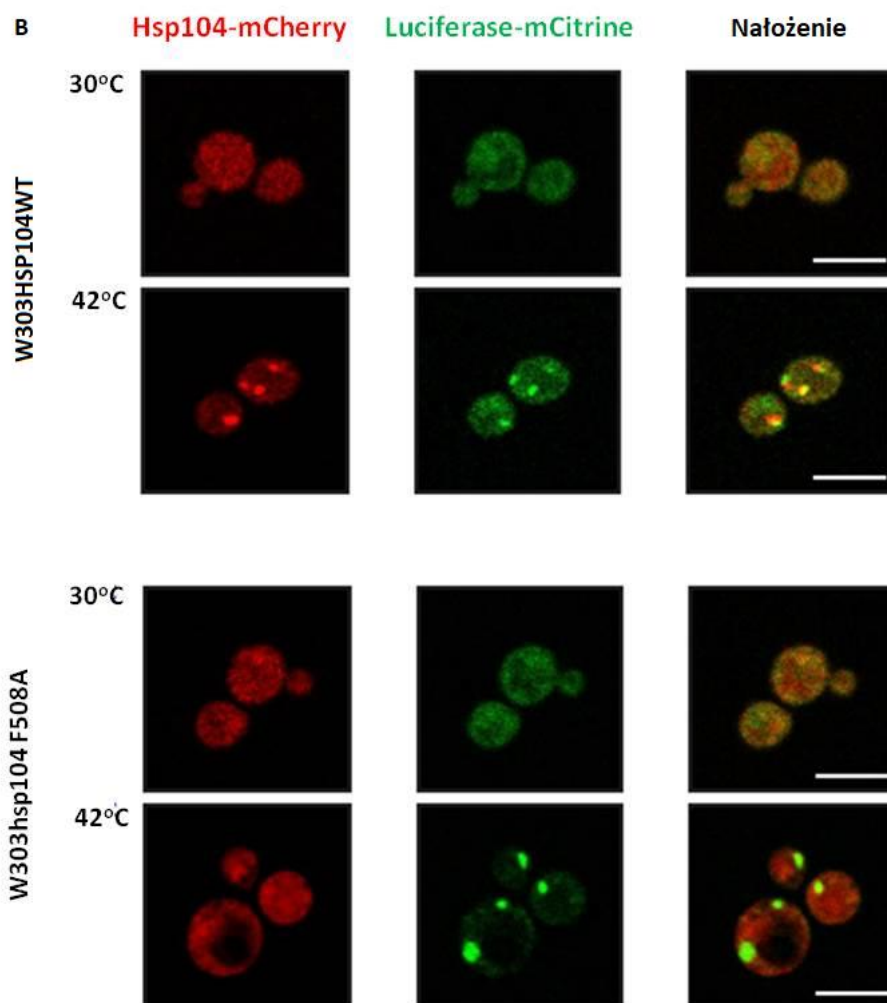


6.5.2. Kolokalizacja fuzyjnych białek: Hsp104-mCherry (wariant WT i F508A) i lucyferaza-mCitrine podczas szoku termicznego

Eksperyment przedstawiony we wcześniejszym rozdziale pokazał, że wariant Hsp104 F508A w przeciwieństwie do Hsp104 WT nie tworzy skupisk podczas szoku termicznego. Wprowadzone przeze mnie fuzje genomowe pozwoliły na obserwowanie tylko białek Hsp104, a wnioskowanie o tworzących się agregatach było tylko pośrednie. Dlatego aby lepiej przyjrzeć się oddziaływaniu białek Hsp104 z agregatami, zaprojektowałem eksperyment, w którym do komórek drożdży, oprócz fuzji genomowych białka Hsp104 wprowadziłem dodatkowo termolabilną lucyferazę w fuzji z mCitrine, która pełni rolę markera, pozwalającego na lokalizację agregatów podczas szoku termicznego (Winkler i wsp., 2012). W tym celu wytworzyłem nowe konstrukty: *HSP104* oraz *hsp104F508A* w fuzji z mCherry oraz gen kodujący lucyferazę w fuzji z mCitrine. Wprowadziłem je na chromosom komórek drożdży wykorzystując rekombinację homologiczną (Rozdział 5.2.3. i 5.2.4.). Na rycinie 27A przedstawiono wyniki analizy Western Blot przeprowadzonej w celu weryfikacji poprawności wariantów genomowych drożdży *S. cerevisiae*. Analiza z wykorzystaniem przeciwciał anti-Hsp104 na tych ścieżkach zawierających lizaty ze szczepów *W303hsp104WT-mCherry* oraz *W303hsp104F508A-mCherry*, przedstawia po dwa prążki, co może świadczyć o produkcie degradacji, jednak analiza z wykorzystaniem przeciwciał anti-mCherry pokazuje, że wyższy prążek odpowiada właściwemu produktowi. Dodatkowo, sprawdziłem ekspresję lucyferazy. Odpowiadający jej prążek znajduje się na wysokości około 90 kDa ze względu na znacznik mCitrine, w odróżnieniu od użytego wzorca lucyferazy nieznakowanej na wysokości około 60 kDa. Także, i w tym przypadku przeprowadziłem detekcję β -aktyny, aby upewnić się, że na ścieżki naniosłem takie same ilości lizatów komórkowych.



Rycina 26 | Kolokalizacja białka fuzyjnego Hsp104-mCherry (WT i F508A) z agregatami lucyferazy-mCitrine w komórkach *S. cerevisiae* podczas szoku termicznego. A | Analiza Western Blot otrzymanych konstruktów białek WT-mCherry i F508A-mCherry. Lizaty komórek drożdży *W303hsp104WT*, *W303hsp104Δ*, *W303HSP104WT-mCherry* oraz *W303hsp104F508A-mCherry* poddano rozdzielni SDS-PAGE następnie wykonano analizę Western Blot przy użyciu przeciwciał anti-Hsp104, anti-mCherry, anti-lucyferazy i anti-aktyny. Strzałką zaznaczono właściwe białko fuzyjne Hsp104-mCherry. B | Kolokalizacja białek fuzyjnych Hsp104 WT-mCherry i Hsp104 F508A-mCherry do agregatów wytworzonych przez lucyferazę-mCitrine w komórkach drożdży *S. cerevisiae*, w trakcie szoku ciepłego. Kolokalizacja Hsp104 WT lub Hsp104 F508A do indukowanych ciepłem agregatów Komórki zawierające białka fuzyjne Hsp104 – mCherry lub Hsp104 F508A – mCherry oraz cytryn – lucyferazę-mCitrine hodowano w 30°C i przeniesiono do 42°C na 10 min, aby zaindukować agregację lucyferazy. Zaznaczona skala odpowiada 5 μm.



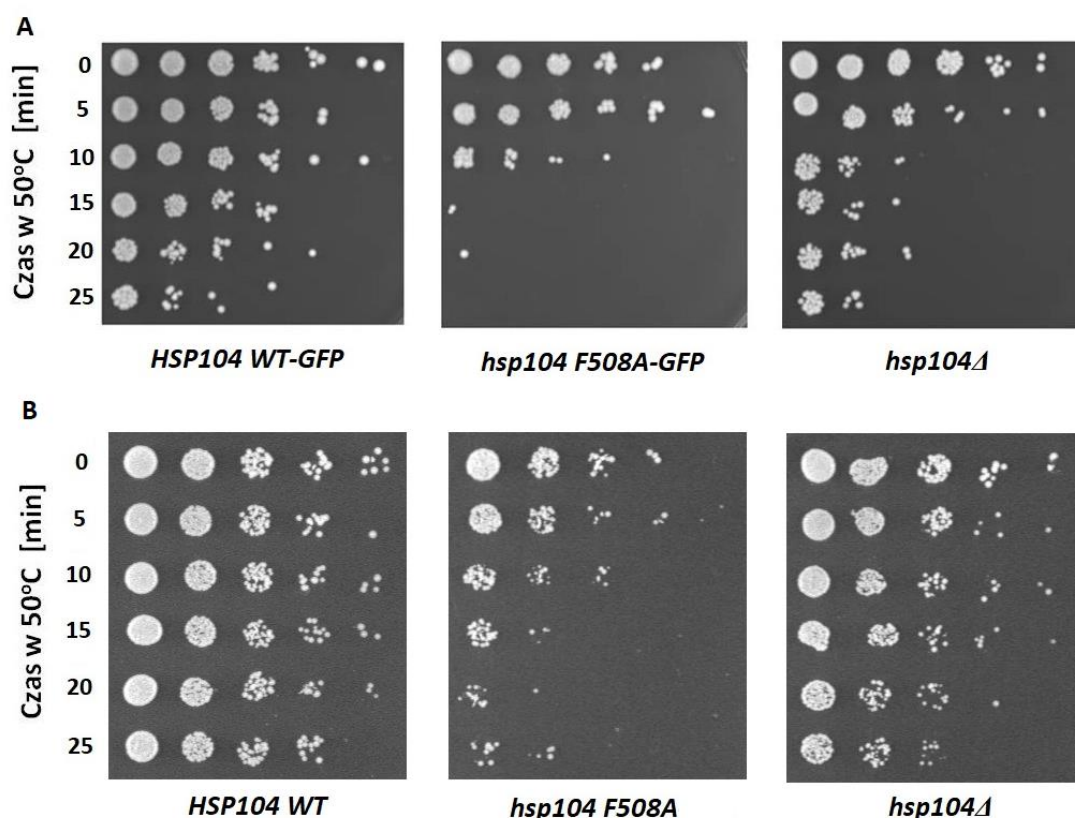
Na rycinie 27B, przedstawiono zdjęcia mikroskopowe komórek drożdży syntetyzujące białka fuzyjne: Hsp104WT-mCherry oraz Hsp104 F508A-mCherry. W temperaturze 30°C białka fuzyjne Hsp104-mCherry, zarówno WT jak i wariant F508A, są rozproszone w cytoplazmie całej komórki (99% komórek syntetyzuje Hsp104 WT-mCherry, 98% komórek syntetyzuje Hsp104 F508A-mCherry). Również lokalizacja lucyferazy obejmuje cały obszar komórki. Jednak, kiedy przeniesiemy komórki do 42°C, lucyferaza tworzy skupiska, co świadczy o powstaniu agregatów. Na 100 komórek syntetyzujących fuzje Hsp104-mCherry, w przypadku białka WT, 93% kolokalizację z powstałymi agregatami lucyferazy, natomiast w przypadku wariantu F508A nie zauważono znaczącej zmiany wywołanej szokiem termicznym w porównaniu do komórek w 30°C (na 100 komórek, 15% kolokalizuje z agregatami lucyferazy). Otrzymane wyniki potwierdzają, że efektywne oddziaływanie dezagregazy Hsp104 z białkiem Ssa1, ma kluczowe znaczenie przy rozpoznawaniu i skupianiu się dezagregazy w obrębie powstających podczas szoku cieplnego agregatów.

6.5.3. Gen *hsp104 F508A* nie zapewnia termotolerancji komórkom drożdży

U drożdży *S. cerevisiae* gen *HSP104* jest odpowiedzialny za termotolerancję, rozumianą jako zdolność do przeżycia w warunkach stresu temperaturowego. Delecja genu *HSP104* powoduje drastyczny spadek przeżywalności komórek drożdży ekspozowanych na wysokie temperatury (Sanchez i Lindquist, 1990). W eksperymentach dotyczących lokalizacji białka Hsp104 w obrębie agregatów podczas szoku termicznego, zaobserwowałem brak kolokalizacji wariantu Hsp104 F508A z wytworzonymi agregatami, dlatego zadałem sobie pytanie, czy gen kodujący ten wariant białka jest w stanie zapewnić termotolerancję komórkom drożdży. W tym celu wykorzystałem szczepy drożdży z wprowadzoną fuzją genów *HSP104-GFP*. Rycina 28A przedstawia wyniki eksperymentu opisanego dokładnie w rozdziale 5.2.15., w którym inkubowałem szczepy *W303hsp104WT-GFP*, *W303hsp104F508A-GFP* oraz *W303Δhsp104* w 50°C przez 25 minut. Co 5 minut pobierałem próbki, wykonywałem seryjne rozcieńczenia i wysiewałem na płytki SC (-His). Jak można zauważyć, gen niosący mutację F508A nie jest w stanie zapewnić przeżycia komórkom drożdży inkubowanych w warunkach szoku termicznego. Po 10 minutach w temperaturze 50°C komórki wykazują znaczny spadek przeżywalności w porównaniu

do komórek niosących dziką formę genu. Co ciekawe, wyniki pokazały, że komórki niosące ten gen są bardziej wrażliwe na podwyższoną temperaturę niż komórki całkowicie pozbawione genu *HSP104*. Aby mieć pewność, że wprowadzony znacznik (GFP) nie wpływa na przeżywalność komórek w warunkach podwyższonej temperatury, przeprowadziłem ten sam typ eksperymentu, wykorzystując tym razem szczep *W303Δhsp104* z wprowadzonymi plazmidami pRS313 zawierającymi odpowiednio geny *HSP104*, *hsp104F508A* oraz pusty wektor pRS313, znajdujące się pod natywnym promotorem. Sam eksperyment został przeprowadzony podobnie do poprzedniego. Hodowle inkubowano przez 25 minut w 50°C, pobierano próbki co 5 minut, rozcieńczano i wysiewano na płytki z podłożem SC (-His). Jak można zauważyć na rycinie 28B, drożdże z wprowadzonym genem *hsp104F508A*, już po 10 minutach w 50°C rosną znacznie słabiej, a wydłużona ekspozycja na szok termiczny powoduje zahamowanie wzrostu komórek, nawet w porównaniu do szczepu pozbawionego genu *HSP104*. Wskazuje to, że szczep zawierający wariant F508A nie wykazuje termotolerancji.

Wyniki z obu eksperymentów sugerują, że zarówno chromosomalny gen fuzyjny *hsp104F508A-GFP*, jak i gen *hsp104F508A* wprowadzony na plazmidzie nie są w stanie zapewnić termotolerancji komórkom drożdży podczas stresu temperaturowego.



Rycina 28 | Termotolerancja komórek drożdży z wprowadzonymi wariantami genu *HSP104*. A | Analiza termotolerancji szczepów drożdży z wprowadzonymi fuzjami genomowymi *HSP104-GFP*. Równą liczbę komórek szczepu W303*HSP104WT-GFP*, W303*hsp104 F508A-GFP* oraz szczepu delecyjnego W303*hsp104Δ* przeniesiono do 37 °C w celu wywołania odpowiedzi szoku cieplnego. Następnie komórki przeniesiono do 50 °C. i co 5 minut pobierano komórki, rozcieńczano seryjnie (5x), i nakładano na płytkę SC (-His). Płytki hodowano przez trzy dni w 30°C. B | Termotolerancja szczepów drożdży z wprowadzonymi plazmidami niosącymi geny *HSP104*. Równą liczbę komórek szczepu W303 *hsp104Δ S. cerevisiae* transformowanego plazmidami: pRS313*HSP104*, pRS313*hsp104F508A* oraz pRS313Δ*hsp104* przeniesiono do 37 °C w celu wywołania odpowiedzi szoku cieplnego. Następnie komórki przeniesiono do 50 °C. i co 5 minut pobierano komórki, rozcieńczano seryjnie (5x), i nakładano na płytkę SC (-His).

6.6. Wariant białka Hsp104 F508G/A509K oraz białka ClpB G504F/K505A nie wykazuje aktywności dezagregacyjnej

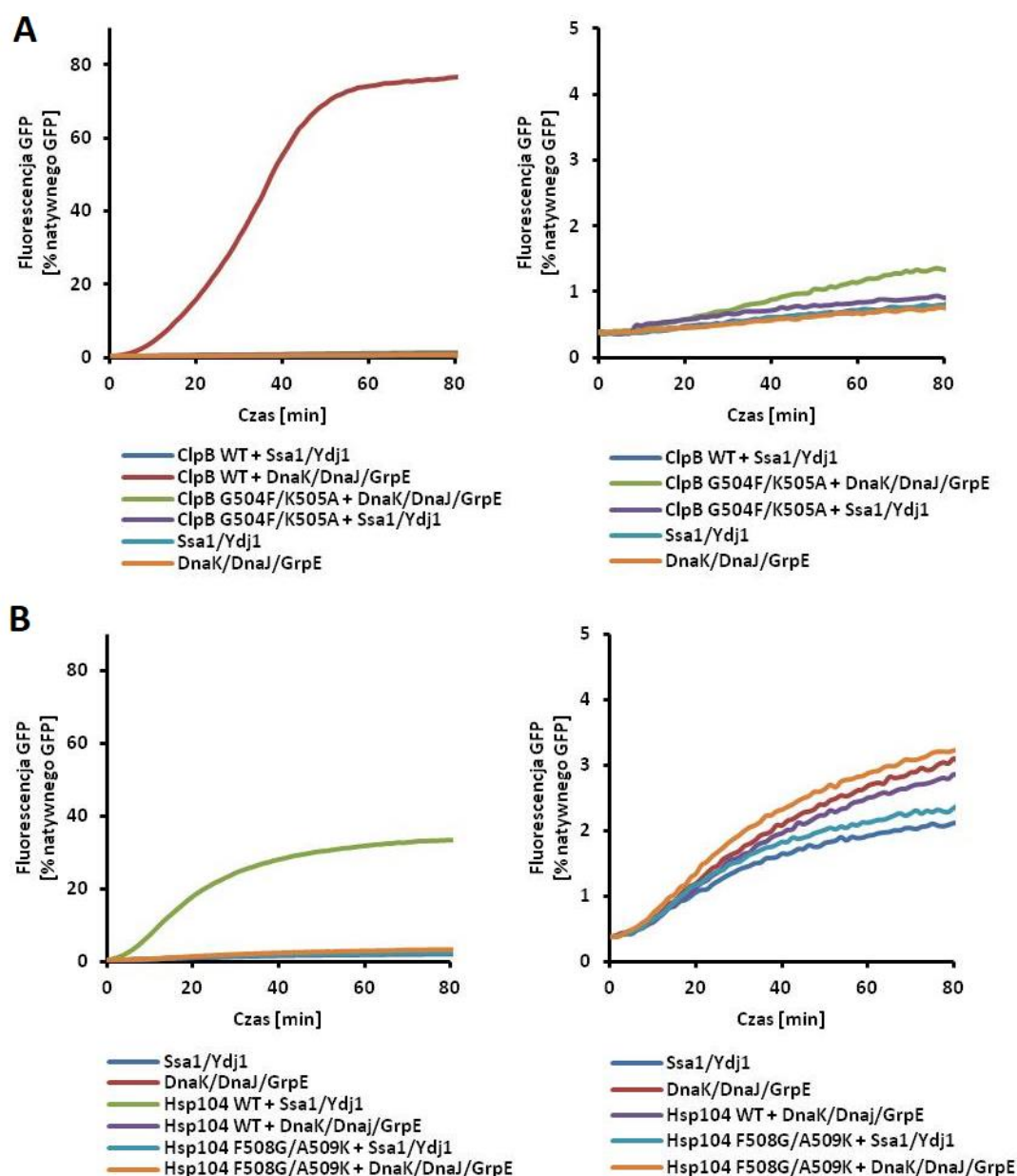
Oddziaływanie pomiędzy białkami opiekuńczymi Hsp100 i Hsp70 opiera się na tzw. specyficzności gatunkowej. Białka opiekuńcze z bakterii nie współpracują z eukariotycznymi i na odwrót. Ta specyficzność ma swoje odzwierciedlenie w sekwencji aminokwasowej regionu MD odpowiedzialnego za oddziaływanie z Hsp70. U bakterii tuż obok silnie konserwowanej tyrozyny znajduje się glicyna, która jest aminokwasem zaburzającym strukturę α -helisy, natomiast u eukariotów obok tyrozyny znajduje się drugi aromatyczny aminokwas (tyrozyna lub fenyloalanina). Ze względu na to można zadać pytanie czy wprowadzenie reszt konserwowanych u *E.coli* (tyrozyna i glicyna) do białka drożdżowego spowoduje współpracę

z bakteryjnym Hsp70, innymi słowy chcę sprawdzić czy kluczowe różnice w sekwencji reszt aminokwasowych w regionie odpowiedzialnym za oddziaływanie z Hsp70 powodują niekompatybilność systemów.

Aby spróbować odpowiedzieć na to pytanie stworzyłem dwa nowe warianty białek Hsp104 i ClpB. Wykorzystując mutagenezę miejscowo specyficzną do białka Hsp104 wprowadziłem dwie mutacje: F508G oraz A509K pochodzące z homologicznego miejsca w białku ClpB z *E.coli*, natomiast do białka ClpB, mutacje G504F oraz K505A. Dzięki temu zabiegowi chciałem sprawdzić czy przez zmianę sekwencji aminokwasowych uda się uzyskać współpracę pomiędzy Hsp104 a DnaK oraz pomiędzy ClpB a Ssa1, a co za tym idzie ustalić przyczynę tzw. specyficzności gatunkowej w procesie dezagregacyjnym.

Oba oczyszczone warianty przetestowałem w reaktywacji zagregowanego GFP. Wyniki analizy wskazują, że wariant ClpB G504F/K505A wykazuje minimalną aktywności renaturacyjną z bakteryjnym systemem Hsp70/JDP (DnaK, DnaJ i GrpE), natomiast systemem drożdżowym Ssa1/Ydj1 nie obserwujemy żadnej aktywności (Ryc. 29A). Wyniki uzyskane dla białka Hsp104 F508G/A509K (Ryc.29B) pokazują, że wariant nie jest stymulowany zarówno przez z system bakteryjny jak i drożdżowy.

Oczyszczone białka nie wykazują aktywności dezagregacyjnej, co może być spowodowane tym, że wprowadzenie miejsc oddziaływania z Ssa1 lub DnaK do dezagregaz z innych gatunków, powoduje zerwanie oddziaływania z dotychczasowymi partnerami jednocześnie nie umożliwiając stymulacji w procesie dezagregacji przez białka Hsp70 z innych organizmów. Z drugiej jednak strony wprowadzenie mutacje mogą powodować złe zwijanie się białek przez co nie można zaobserwować stymulacji przez białka Hsp70.



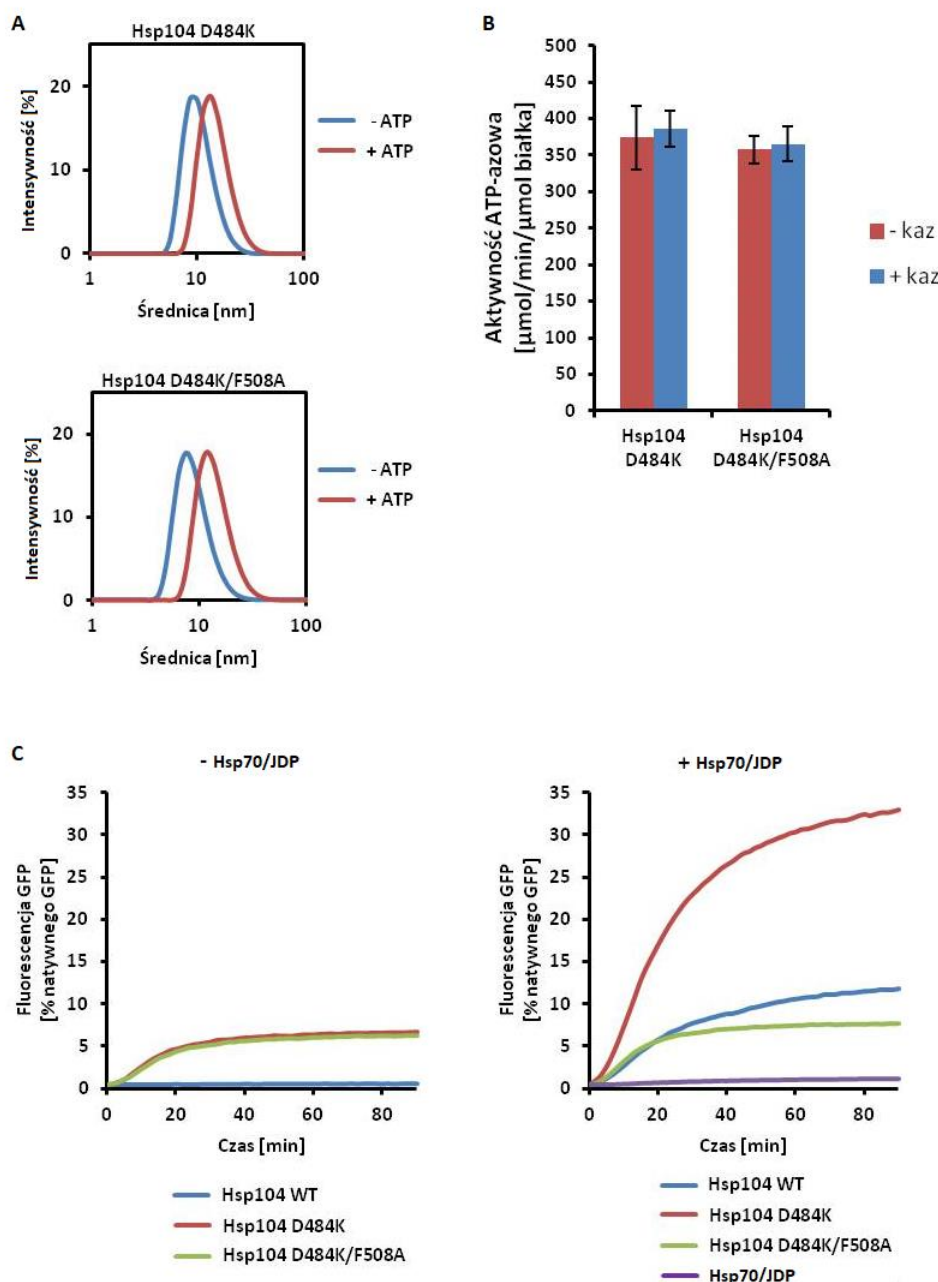
Rycina 29 | Aktywność renaturacyjną białek ClpB G504F/K505A i Hsp104 F508G/A509K. **A** | Aktywność renaturacyjna białka ClpB G504F/K505A. (lewy panel) Reaktywacja zagregowanego termicznie GFP przez warianty ClpB WT (1 μ M) i ClpB G504F/K505A (1 μ M) w obecności Ssa1 (1 μ M) i Ydj1 (1 μ M) lub DnaK (1 μ M), DnaJ (0,4 μ M) i GrpE (0,3 μ M). (prawy panel) Przeskalowany wykres bez pomiaru ClpB WT + DnaK/DnaJ/GrpE. **B** | Aktywność renaturacyjna białka Hsp104 F508G/A509K. (lewy panel) Reaktywacja zagregowanego termicznie GFP przez warianty Hsp104 WT (1 μ M) i Hsp104 G504F/K505A (1 μ M) w obecności Ssa1 (1 μ M) i Ydj1 (1 μ M) lub DnaK (1 μ M), DnaJ (0,4 μ M) i GrpE (0,3 μ M). (prawy panel) Przeskalowany wykres bez pomiaru Hsp104 WT + Ssa1/Ydj1.

6.7. Białko Hsp104 D484K/F508A – wariant nie oddziałujący z Ssa1 i niewymagający jego obecności przy aktywacji

Białko Hsp104 jest kluczowe w procesie dezagregacji, jednakże sam proces reaktywacji białek z agregatów nie mógłby zachodzić bez obecności białka Hsp70. Można wymienić kilka prawdopodobnych funkcji podczas dezagregacji, w których

uczestniczy białko Ssa1, są to: (1) zmiana struktury agregatu (razem z białkami JDP), (2) promowanie oddziaływania Hsp104 z agregatem; (3) aktywacja białka Hsp104 poprzez odchylenie M domeny, oraz (4) udział w ponownym zwinięciu łańcucha polipeptydowego do struktury natywnej po przejściu przez kanał Hsp104. Wariant białka Hsp104 z substytucją F508A stracił możliwość funkcjonalnego i fizycznego oddziaływania z białkiem Hsp70, a co za tym idzie, przestał być stymulowany przez Ssa1 podczas dezagregacji. Z kolei w wariacie Hsp104 D484K opisanym w pracy Lipińska i wsp., (2013), poprzez wprowadzenie lizyny zamiast kwasu asparaginowego w pozycji 484 domeny M, uzyskano odpychanie się jednoimiennych ładunków reszt aminokwasowych pomiędzy tą resztą i lizyną w pozycji 358 znajdującej się w NBD1. Spowodowało to stałe odchylenie M-domeny od NBD1. Mutacja ta uniezależnia białko Hsp104 od białka Hsp70 w aktywacji dezagregacji. Mimo to, wariant D484K w dalszym ciągu jest stymulowany przez system Hsp70, najprawdopodobniej dzięki udziałowi Ssa1 w wiązaniu Hsp104 do agregatów, co zwiększa jego zdolność reaktywacji zagregowanych substratów.

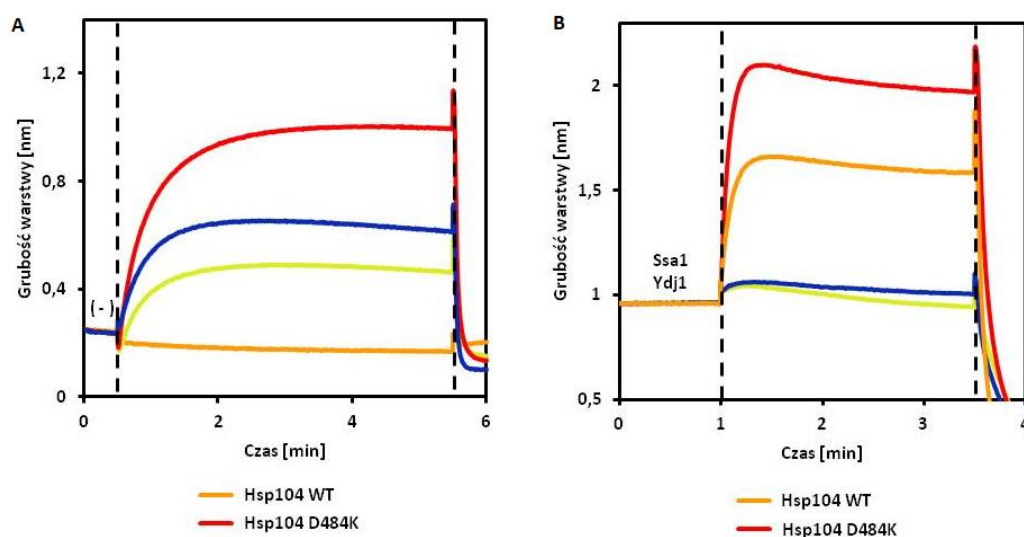
Łącząc ze sobą obie mutacje: D484K – powodującą stałą aktywację białka Hsp104 oraz F508A - zrywającą oddziaływanie z Ssa1, założyłem, że otrzymam wariant niezależny od białka Ssa1 w aktywacji oraz niewspółpracujący z Ssa1 w wiązaniu do agregatów. Za pomocą mutagenyzy miejscowo-specyficznej wprowadziłem obie mutacje, oczyściłem preparat białka Hsp104 D484K/F508A, a następnie wykonałem szereg eksperymentów *in vitro*. Wariant Hsp104 D484K/F508A wykazuje zdolność do oligomeryzacji po dodaniu ATP podobnie jak wariant Hsp104 D484K (Ryc. 30A). Szybkość hydrolizy ATP przez wariant D484K/F508A jest porównywalna do wariantu Hsp104 D484K, a dodanie do reakcji α -kazeiny w obu przypadkach nieznacznie zwiększa szybkość hydrolizy ATP (Ryc. 30B). Tak jak omówiono wcześniej, wariant D484K był zdolny do reaktywacji białek z agregatów bez obecności systemu Hsp70, jednakże dodatek do reakcji systemu Hsp70 powodował jego stymulację. Jak zakładałem wcześniej, wprowadzenie obu mutacji (D484K i F508A) spowodowało brak stymulacji tego białka przez system Hsp70 w procesie refaldowania i dezagregacji GFP (Ryc. 30C). Podobne wyniki otrzymano w reaktywacji lucyferazy (Załącznik 2B).



Rycina 30 | Charakterystyka białek Hsp104 D484K i Hsp104 D484K/F508A. A | Zdolność tworzenia struktur oligomerycznych pod wpływem ATP. ATP (5 mM) powoduje tworzenie się heksamerów zarówno białka Hsp104 D484K (1 μM) i Hsp104 D484K/F508A (1 μM). **B | Aktywność ATPazowa.** Aktywność ATPazowa wariantów Hsp104 D484K (0,5 μM) oraz Hsp104 D484K/F508A (0,5 μM), bez i z dodatkiem α-kazeiny (7,5 μM). **C | Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP.** (lewy panel) Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP przez białka Hsp104 WT (1 μM), Hsp104 D484K (1 μM) i Hsp104 D484K/F508A (1 μM) bez systemu Hsp70/JDP. (prawy panel) Reaktywacja termicznie zagregowanego GFP przez białka Hsp104 WT (1 μM), Hsp104 D484K (1 μM) i Hsp104 D484K/F508A (1 μM) z dodatkiem białek Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (1 μM).

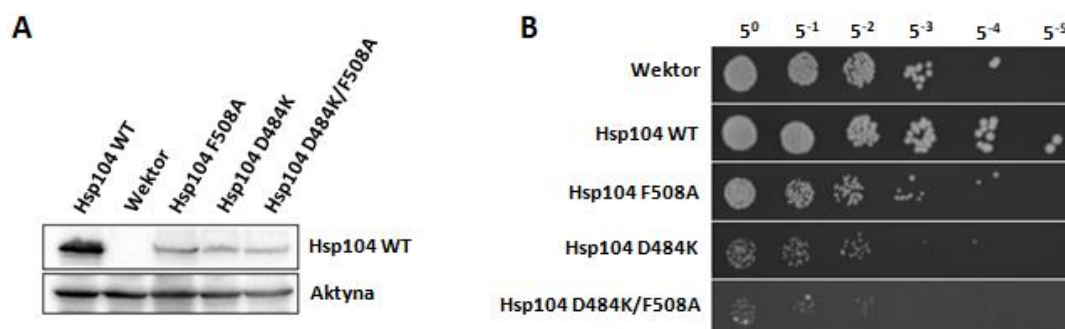
Wyniki analizy BLI pokazują, że warianty: D484K, D484K/F508A i F508A są zdolne do oddziaływania z agregatami lucyferazy zimmobilizowanymi na sensorze bez systemu Hsp70, w przeciwieństwie do białka Hsp104 WT (Ryc. 31A). Natomiast, jeżeli

na sensorze występuje system Hsp70-JDP, białka WT oraz D484K oddziałują z tym systemem, w przeciwieństwie do wariantów F508A i D484K/F508A (Ryc. 31B). I tak dzięki wprowadzeniu jednocześnie mutacji D484K i F508A udało się uzyskać wariant, który stracił możliwość oddziaływania z białkiem Ssa1 oraz który jest zdolny do samodzielnej reaktywacji białek z agregatów.



Rycina 31 | Analiza oddziaływań wariantów białka Hsp104. A | Oddziaływanie pomiędzy agregatami lucyferazy a wariantami białka Hsp104. Sensor BLI pokryty agregatami lucyferazy inkubowano z wariantami Hsp104 (1 μ M): WT, D484K, F508A, oraz D484K/F508A a następnie odplukano białka. **B | Oddziaływanie pomiędzy agregatami lucyferazy a wariantami białka Hsp104 w obecności Hsp70/JDP (Ssa1 i Ydj1)** Sensor BLI pokryty agregatami lucyferazy inkubowano w pierwszej kolejności z białkami Ssa1 (1 μ M), Ydj1 (0,8 μ M), następnie do reakcji dodano poszczególne warianty białka Hsp104 (1 μ M): WT, D484K, F508A i D484K/F508A i odplukano białka. W celu łatwiejszej analizy wykresy przedstawiają tylko etap dodania i odplukania białek Hsp100.

Dodatkowo zadałem sobie pytanie, jaki wpływ będzie miał ten wariant białka Hsp104 na komórki drożdży. Rycina 32A, prezentuje wyniki analizy Western Blot poziomu produkcji białek Hsp104. Komórki, które transformowano plazmidami niosącymi geny kodujące białka nadaktywne, wykazują zmniejszoną ekspresję tych wariantów w porównaniu do poziomu ekspresji białka WT. Na rycinie 32B przedstawiono rezultaty testu, w którym sprawdziłem wpływ wariantów Hsp104 na wzrost komórek drożdży. Jak można zaobserwować wariant F508A czy wariant D484K nie wykazują tak negatywnego wpływu na komórki drożdży, jak połączenie obu tych mutacji, co może sugerować, że oddziaływanie z Ssa1 jest istotne dla kontroli aktywności Hsp104 w komórce.

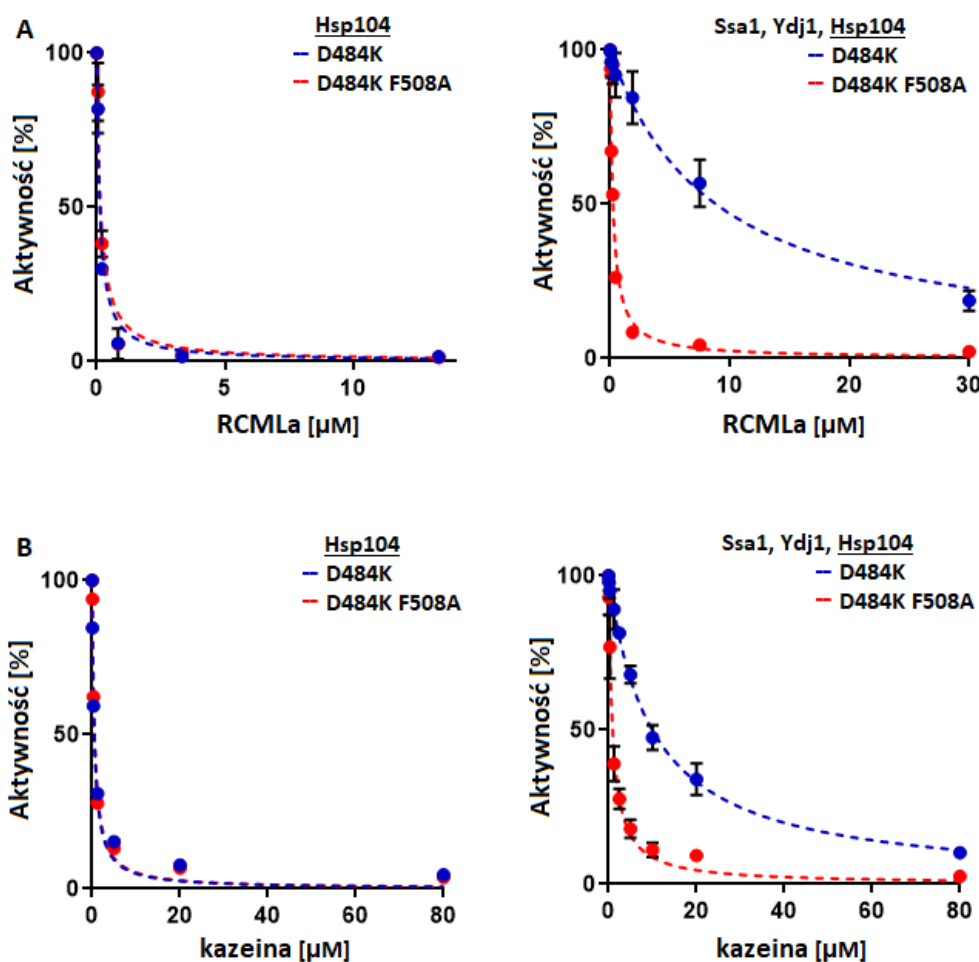


Rycina 32 | Analiza in vivo wariantów Hsp104. A | Poziom eksprymowanych białek. Lizaty komórek drożdży, które były transformowane plazmidami pRS313 zawierającymi geny: HSP104, hsp104 F508A, hsp104 D484K, hsp104 D484K F508A oraz pusty wektor pRS poddano rozdzielaniu SDS-PAGE a następnie wykonano analizę Western Blot przy użyciu przeciwciał anti-Hsp104 i anti-aktyny. **B | Analiza toksyczności wariantów białka Hsp104.** Równą liczbę komórek drożdży W303 hsp104Δ transformowanych plazmidami pRS313 zawierającymi geny: HSP104WT hsp104 F508A, hsp104 D484K, hsp104 D484K F508A, rozcieńczono seryjnie, nałożono na płytkę SC (-His) i hodowano w 30 °C przez 3-4 dni.

6.8. Białko Hsp70 przesuwając preferencję substratową dezagregazy Hsp104 w stronę białek uwieczonych w agregatach.

Biorąc pod uwagę wpływ białka Hsp104 D484K/F508A na komórki drożdży, czyli dramatyczny spadek przeżywalności komórek z wprowadzonym wariantem D484K/F508A chciałem sprawdzić, jaką rolę pełni Hsp70 w zapobieganiu toksyczności dezagregazy. Jedną z hipotez był udział Hsp70 w doborze odpowiedniego substratu dla dezagregazy Hsp104, tzn. promowanie oddziaływania z agregatami, a nie z białkami posiadającymi częściowo rozwinięte łańcuchy polipeptydowe. Translokacja tych drugich mogłaby prowadzić do ich całkowitego rozfałdowania i degradacji, co mogłoby być przyczyną toksyczności dezagregazy uwolnionej spod kontroli Hsp70. Aby to zbadać, zaprojektowano szereg eksperymentów kompetycyjnych, w których wykorzystano różne substraty i w których mierzono względną aktywność wariantów Hsp104 D484K i Hsp104 D484K/F508A względem agregatów i częściowo rozwiniętych białek. W pierwszym eksperymencie użyto agregatów GFP oraz zredukowaną karboksymetylowaną laktalbuminę (RCMLa), jako modelowy, częściowo rozfałdowany substrat. Mierzono fluorescencje reaktywowanego GFP, które występowało w stałym stężeniu (0,35 μ M), natomiast do poszczególnych reakcji dodawano RCMLa w różnych stężeniach (0-30 μ M).

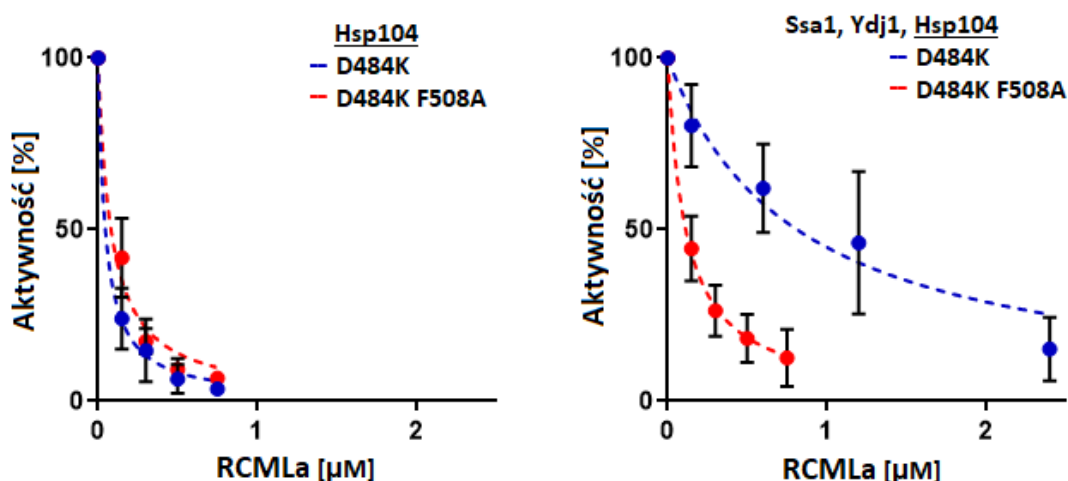
Miareczkowanie przeprowadzono dla białka Hsp104 D484K i Hsp104 D484K/F508A, w dwóch wariantach: z białkami Ssa1 i Ydj1 lub bez (Załącznik 4). W reakcji, w której nie dodano białek Ssa1/Ydj1 zdolność do reaktywacji zagregowanego GFP była hamowana przez wzrastające stężenie RCMLa w przypadku obu wariantów białka Hsp104. Wprowadzenie do reakcji Ssa1/Ydj1 nie spowodowało diametralnych zmian w reaktywacji GFP z wykorzystaniem białka Hsp104 D484K/F508A i było porównywalne do reakcji bez Hsp70/JDP. W przypadku białka Hsp104 D484K, dodatek Ssa1/Ydj1 spowodował zniwelowanie hamującego wpływu RCMLa, przez co obserwujemy znaczący wzrost fluorescencji reaktywowanego GFP (Ryc. 33A). Aby sprawdzić czy obserwowany efekt można uzyskać wykorzystując inny substrat, zamiast RCMLa użyto kolejnego modelowego substratu – kazeinę, która także jest częściowo rozfałdowanym białkiem. W drugim eksperymencie wykorzystano także agregaty GFP (0,35 μ M), reakcję miareczkowano używając rosnącego stężenia kazeiny (0-80 μ M) (Załącznik 5). I w tym przypadku w reakcji bez Ssa1/Ydj1, aktywność reaktywacyjna GFP zarówno białka Hsp104 D484K jak i Hsp104 D484K/F508A, jest hamowana w podobny sposób przy miareczkowaniu kazeiną. Dodanie do reakcji Ssa1/Ydj1 spowodowało zmniejszenie hamującego wpływu kazeiny przy reakcji z wykorzystaniem Hsp104 D484K, w przeciwieństwie do Hsp104 D484K/F508A, gdzie dodanie białek Ssa1/Ydj1 nie wpłynęło znacząco na wzrost reaktywacji agregatów GFP (Ryc. 33B).



Rycina 33 | Hsp70 przesuwaa preferencję substratową Hsp104 w kierunku agregatów GFP. A | Reaktywacja agregatów GFP podczas miareczkowania z wykorzystaniem RCMLa (lewy panel) Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μM) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A (0,2 μM) przy różnych stężeniach RCMLa (0-30 μM). (prawy panel) Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μM) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A (0,2 μM) przy różnych stężeniach RCMLa (0-30 μM) wraz z Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (0,5 μM). Oba wykresy przedstawiają znormalizowaną aktywność wariantów Hsp104. B | Reaktywacja agregatów GFP podczas miareczkowania z wykorzystaniem kazeiny (lewy panel) Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μM) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A (0,2 μM) przy różnych stężeniach kazeiny (0-80 μM). (prawy panel) Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μM) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A (0,2 μM) przy różnych stężeniach kazeiny (0-80 μM) wraz z Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (0,5 μM). Oba wykresy przedstawiają znormalizowaną aktywność wariantów Hsp104.

W obu przedstawionych eksperymentach można zauważyć, że wzrastające stężenie obu modelowych substratów tj. RCMLa oraz kazeiny powoduje zahamowanie reaktywacji białek z agregatów zarówno w przypadku dezagregacji prowadzonej przy użyciu Hsp104 D484K, jak i Hsp104 D484K/F508A, jednakże wprowadzenie do reakcji białka Ssa1, powoduje zwiększenie reaktywacji agregatów GFP przez białko Hsp104 D484K w przeciwieństwie do Hsp104 D484K/F508A. W przedstawionych powyżej eksperymentach zastosowano ten sam typ agregatów - GFP, dlatego aby mieć pewność, że obserwowany efekt utrzymuje się przy innym typie agregatów, w kolejnym eksperymencie zastosowano agregaty lucyferazy.

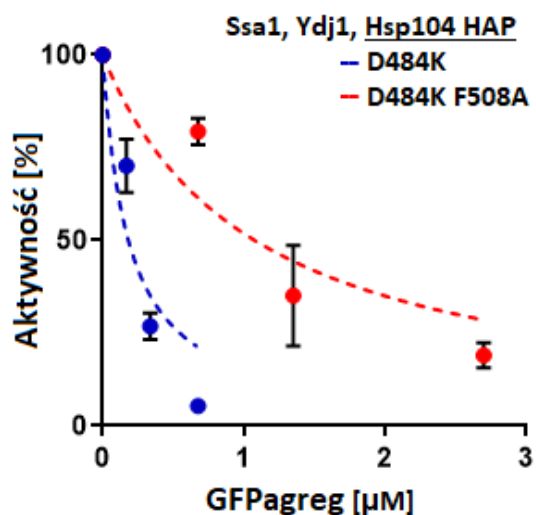
W reakcji agregaty lucyferazy ($0,22 \mu\text{M}$) miareczkowano RCMLa ($0-2,4 \mu\text{M}$) i tak jak w poprzednich eksperymentach reakcje prowadzono dla białek Hsp104 D484K jak i Hsp104 D484K/F508A, bez oraz z białkami Ssa1/Ydj1 (Załącznik 6). Pomimo zmiany rodzaju agregatu, wyniki przedstawiają analogiczną zależność, jak w dwóch poprzednich eksperymentach. W reakcji bez systemu Ssa1/Ydj1 reaktywacja agregatów lucyferazy jest podobnie hamowana przy rosnącym stężeniu RCMLa dla Hsp104 D484K oraz Hsp104 D484K/F508A. W reakcji, w której dodano Ssa1/Ydj1, zdolność reaktywacji lucyferazy przez Hsp104 D484K/F508A jest w dalszym ciągu ograniczana przy wzrastającym stężeniu RCMLa, w przeciwieństwie do reaktywacji prowadzonej przy użyciu Hsp104 D484K (Ryc. 34).



Rycina 34 | Hsp70 przesuwaa preferencją substratową Hsp104 w kierunku agregatów lucyferazy. (lewy panel) Reaktywacja zagregowanej termicznie lucyferazy ($0,22 \mu\text{M}$) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A ($0,25 \mu\text{M}$) przy różnych stężeniach RCMLa ($0-0,75 \mu\text{M}$). (prawy panel) Reaktywacja zagregowanej termicznie lucyferazy ($0,22 \mu\text{M}$) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A ($0,25 \mu\text{M}$) przy różnych stężeniach RCMLa ($0-2,4 \mu\text{M}$) w obecności Ssa1 ($1 \mu\text{M}$) i Ydj1 ($1 \mu\text{M}$). Oba wykresy przedstawiają znormalizowaną aktywność wariantów Hsp104.

W przedstawionych powyżej eksperymentach mierzono zdolność do reaktywacji agregatów GFP jak i lucyferazy. Łańcuchy polipeptydowe GFP lub lucyferazy, uwięzione w agregatach, dzięki Hsp104 były uwalniane, translokowane przez kanał dezagregazy, a następnie wracały do swojej struktury natywnej, przez co mogliśmy monitorować aktywność dezagregacyjną Hsp104. Przeanalizowano również zdolność do translokacji częściowo rozfałdowanych łańcuchów przez analizowane warianty Hsp104 w obecności agregatów. W tym celu wykorzystano technikę anizotropii fluorescencji, dzięki której można monitorować translokację łańcucha przez kanał dezagregazy. W reakcji wykorzystano białko Hsp104 z wprowadzonym miejscem oddziaływania (G739I S740G K741F T746A) z bakteryjną proteazą ClpP (warianty

HAP) (Tessarz i wsp., 2008), dzięki czemu translokowany łańcuch polipeptydowy ulega degradacji przez proteazę ClpP przyłączoną do Hsp104. Wykorzystano kazeinę znakowaną fluoresceiną (FITC-kazeina) w stałym stężeniu 1,8 nM oraz różne stężenia agregatów GFP (0-2,7 μM) (Załącznik 7). Inkubacja znakowanej kazeiny z białkami HAP D484K lub HAP D484K/F508A z dodatkiem Ssa1, Ydj1 i ClpP, spowodowała spadek anizotropii fluorescencji związany z proteolizą znakowanej kazeiny i uwalnianiem krótkich peptydów związanych z fluoresceiną wykazujących niższą anizotropię fluorescencji. Dodanie do reakcji agregatów GFP spowodowało bardziej wydajnie zahamowanie proteolizy kazeiny przez HAP D484K niż w przypadku HAP D484K/F508A (Ryc. 35). Sugeruje to, że w warunkach eksperymentu wariant D484K został przez Hsp70 skierowany do agregatów i dlatego doszło do efektywnego zahamowania degradacji kazeiny.



Rycina 35 | Hsp70 przesuwając preferencję substratową Hsp104 w kierunku agregatów GFP. Proteoliza kazeiny-FITC przez ClpP (0,4 μM) i warianty HAP: D484K lub D484K/F508A (0,2 μM) w obecności Ssa1 (0,5 μM) i Ydj1 (0,5 μM) oraz przy różnym stężeniu agregatów GFP (0-2,7 μM). Wykres przedstawia znormalizowaną aktywność proteolityczną wobec α -kazeiny dla wariantów HAP D484K i HAP D484K/F508A.

Ze wszystkich powyższych eksperymentów wynika, że białko Ssa1 ma kluczowe znaczenie przy rozpoznawaniu substratów przez dezagregację. Wariant Hsp104 D484K, który ma zdolność oddziaływania z Ssa1, we wszystkich przedstawionych eksperymentach w obecności Hsp70 przetwarzał łańcuchy zagregowanych białek wydajniej niż wariant Hsp104 D484K/F508A w tych samych warunkach. Z kolei pod nieobecność Hsp70, oba białka wykazywały podobną konkurencję o rozwinięty substrat. Podsumowując, funkcjonalna współpraca z Hsp70 zwiększa specyficzność substratową Hsp104 względem zagregowanych białek. W ten sposób odzyskiwanie białek z agregatów jest bardziej wydajne a zarazem zahamowane jest przetwarzanie niezagregowanych białek z nieuporządkowanymi regionami.

Większość przedstawionych wyników została opublikowana w pracy Chamera T., Kłosowska A., i wsp., (2019) Selective Hsp70-Dependent Docking of Hsp104 to Protein Aggregates Protects the Cell from the Toxicity of the Disaggregase, *Journal of Molecular Biology*, 431, 2180-2196; doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.014

7. DYSKUSJA

Kompleks dezagregacyjny u drożdży *S. cerevisiae* składa się z białek: Hsp104, Ssa1, JDP: Ydj1 i Sis1, oraz NEF, jednakże białkami które w głównej mierze są odpowiedzialne za prawidłowy przebieg tego procesu są Hsp104 i Ssa1, natomiast JDP i NEF odpowiadają za stymulację cyklu ATPazowego Ssa1. Białko Ssa1 jest odpowiedzialne za dostarczenie substratów do dezagregazy i jej aktywację, natomiast Hsp104 odpowiada za kluczowy etap dezagregacji, jakim jest całkowite wyswobodzenie łańcucha polipeptydowego z agregatu oraz przeciągnięcie go przez kanał centralny, aby mógł on ponownie powrócić do struktury natywnej. Zarówno proces wyswobodzenia, jak i translokacji, wymaga dużych nakładów energii pochodzących z hydrolizy ATP. W przypadku, gdyby aktywność Hsp104 nie była kontrolowana, mogłoby to powodować niekorzystne zmiany w proteomie komórki, poprzez przewlekanie innych substratów niż łańcuchy polipeptydowe wyswobodzone z agregatów. Dlatego komórki wykształciły szereg mechanizmów kontrolujących i ograniczających aktywność dezagregazy. Jednym z nich jest oddziaływanie pomiędzy białkami Hsp70 a Hsp104. Celem przedstawionej pracy było dokładne określenie znaczenia współpracy pomiędzy białkami Hsp70 a Hsp104 dla prawidłowego przebiegu procesu dezagregacji.

7.1. Identyfikacja miejsca oddziaływania między Hsp104 a Hsp70

Na podstawie analizy dopasowania sekwencji reszt aminokwasowych domeny M dezagregaz z różnych organizmów, udało się wytypować kluczowe miejsce dla oddziaływania pomiędzy Hsp70 a Hsp104. U bakterii za oddziaływanie z Hsp70 odpowiedzialna jest silnie konserwowana tyrozyna (Rosenzweig i wsp., 2013, Haslberger i wsp., 2007), odpowiadająca reszcie Y507 u drożdży *S. cerevisiae*, jednakże substytucja tyrozyny na alaninę w tej pozycji u drożdży nie spowodowała zerwania oddziaływania z Hsp70 (Ryc.16C). Dokładniejsza analiza wykazała, że w taksonie Uniconta/Amorphea, do której zaliczają się drożdże *S. cerevisiae*, kolejną resztą aminokwasową jest druga aromatyczna reszta aminokwasowa – fenyloalanina lub tyrozyna, natomiast u Prokariota i u pozostałych Eukaryota, w tym u roślin i glonów pozycja ta jest zajmowana przez glicynę (Ryc.17). Wprowadzenie alanin zarówno w pozycji 507 i 508 spowodowało zahamowanie stymulacji dezagregazy przez Hsp70

w reaktywacji termicznie zagregowanego GFP. Co więcej już wprowadzenie pojedynczej substytucji w pozycji 508 wystarczyło do zaburzenia oddziaływania między tymi białkami. Fenyloalanina w pozycji 508 okazała się kluczowym miejscem oddziaływania funkcjonalnego pomiędzy Hsp70 a Hsp104 u drożdży *S. cerevisiae* (Ryc. 18C). Dodatkowo, dzięki zastosowaniu interferometrii biowarstwowej (BLI) udało się monitorować powstawanie kompleksu dezagregacyjnego w czasie rzeczywistym. Pozwoliło to określić, że warianty z substytucją wprowadzoną w pozycji 508 nie oddziałują fizycznie Hsp70 na powierzchni agregatu (Ryc. 21B). Zatem fenyloalanina w pozycji 508 białka Hsp104 jest odpowiedzialna za funkcjonalne i fizyczne oddziaływanie z białkiem Ssa1 podczas dezagregacji. Otrzymane wyniki potwierdzają ogólnie przyjęty mechanizm współpracy pomiędzy Hsp70 a Hsp104 w dezagregacji białek (Kummer i wsp., 2016).

Zastosowanie techniki interferometrii biowarstwowej (BLI) pozwoliło również zbadać aktywność systemu Hsp70 podczas wiązania dezagregazy do powierzchni agregatu. Hsp70 może ułatwiać wiązanie Hsp104 z agregatem przez wstępną reorganizację powierzchni agregatu, co może zwiększać powierzchnię agregatu lub sprawia, że miejsca wiązania dezagregazy są bardziej dostępne. Taki mechanizm może sugerować obserwacją, że Hsp104 F508A reaktywuje GFP wydajniej i szybciej, gdy agregaty GFP poddano wstępnej inkubacji z białkami Ssa1 i Ydj1 (Załącznik 8). Stosując technikę BLI, udało się monitorować wiązanie poszczególnych białek opiekuńczych do powierzchni agregatu i nie zaobserwowano żadnego pozytywnego wpływu Hsp70 na wydajność wiązania się do powierzchni agregatów przez Hsp104 F508A (Ryc. 21). Wskazuje to, że ewentualny wpływ Hsp70 na agregaty nie odgrywa głównej roli przy rekrutacji Hsp104.

7.2. Hsp70 kieruje Hsp104 do agregatów w komórkach drożdży

Aktywacja Hsp104 przez Hsp70, które oddziałuje z M domeną jest funkcją niezbędną do dezagregacji, jednakże drugą istotną funkcją jest rozpoznanie agregatu przez Hsp104. Hsp70 związane z powierzchnią zagregowanych białek jest informacją dla Hsp104, aby związało się z taką strukturą. W eksperymencie, w którym wykorzystano fuzje genomowe *HSP104: HSP104WT-GFP* oraz *hsp104F508A-GFP*, można zauważyć, że podczas szoku termicznego wariant F508A nie jest zlokalizowany w obrębie powstałych agregatów (Ryc.26B). Dodatkowo wykorzystanie wariantów

fuzyjnych z mCherry oraz lucyferazy ze znacznikiem mCitrine pokazało, że wariant F508A nie jest w stanie rozpoznawać agregatów wytworzonych przez lucyferazę (Ryc.28B). Wyniki te pokazują, że oddziaływanie Hsp104 z Hsp70 związanym z agregatem jest kluczowe, aby Hsp104 rozpoznało agregat i mogło efektywnie przeprowadzić proces dezagregacji. Oddziaływanie pomiędzy Hsp70 i Hsp104 jest również niezbędne dla termotolerancji u drożdży (Ryc.27). Komórki, w których białko Hsp104 zostało pozbawione możliwości komunikowania się z Hsp70 (Hsp104 F508A), nie są w stanie przetrwać, wystawione na działanie wysokiej temperatury, która powoduje powstanie agregatów komórkowych. Brak oddziaływania pomiędzy Hsp104 a Hsp70, a co za tym idzie, upośledzenie dezagregacji białek, może powodować nagromadzenie się agregatów, a to z kolei prowadzi do zachwiania proteostazy komórki.

7.3. Specyficzność gatunkowa wpływa na oddziaływanie pomiędzy Hsp70 i Hsp104 lub ClpB

Identyfikacja miejsca oddziaływania zarówno pomiędzy Hsp104 a Ssa1 u drożdży *S. cerevisiae*, jak i pomiędzy ClpB i DnaK u *E.coli* (Haslberger i wsp., 2007) pozwoliła zaprojektować i oczyścić dwa warianty dezagregaz z wprowadzonymi potencjalnymi miejscami oddziaływań dla Hsp70 z innych organizmów. W ten sposób powstał wariant Hsp104 F508G/A509K z hipotetycznym miejscem oddziaływania dla białka DnaK, pochodzącym z ClpB oraz wariant ClpB G504F/K505A z hipotetycznym miejscem oddziaływania dla Ssa1, pochodzącym z Hsp104. Wyniki analizy reaktywacji termicznie zagregowanych agregatów GFP przez oczyszczone warianty wykazały, że dezagregazy straciły możliwość oddziaływania z białkami Hsp70 z własnych gatunków, jednocześnie nie zyskując możliwości oddziaływania z partnerami od innych gatunków (Ryc. 29). Może to sugerować, że wprowadzone mutacje utrudniają odchylenie się MD od NDB1 w obu dezagregazach, przez co nie widzimy aktywacji dezagregazy przez Hsp70. Jednak z drugiej strony nie można wykluczyć, że oczyszczone warianty nie są aktywne, przez co nie są stymulowane przez Hsp70. Wskazuje to, że oprócz zidentyfikowanych kluczowych miejsc oddziaływania między dezagregazą a Hsp70, nie można wykluczyć, że za tzw. specyficzność gatunkową odpowiadają jeszcze inne dotychczas niezidentyfikowane elementy. Ułożenie MD w dezagregazach u różnych organizmów, może być inne przez to wprowadzenie

lokalnych, lecz kluczowych zmian w jej strukturze, nie spowoduje komunikacji z partnerem pochodzącym od innego gatunku.

7.4. Oddziaływanie pomiędzy Hsp70 a Hsp104 wpływa na wydajność dezagregazy

Ingerencja w strukturę M domeny zarówno w białku Hsp104 jak i ClpB może spowodować powstanie wariantów nadaktywnych, tzn. zdolnych do reaktywacji zagregowanych łańcuchów polipeptydowych bez systemu Hsp70. Takie warianty (np. Hsp104 D484K) mogą być stymulowane przez Hsp70, przez co reaktywacja białek z agregatów jest znacznie wydajniejsza niż w przypadku białka WT (Oguchi i wsp., 2012; Seyffer i wsp., 2012; Lipinska i wsp., 2013; Jackrel i wsp., 2014; DeSantis i wsp., 2014). Pokazuje to, że pomimo tego, iż oddziaływanie z Hsp70 jest niezbędne do aktywacji Hsp104, nie jest to wystarczające, aby w białku WT wyzwolić pełną aktywność dezagregacyjną, tak jak w przypadku wariantów nadaktywnych. Dodatkowo pokazano, że warianty nadaktywne silnie zależą od Hsp70 przy wiązaniu agregatów (Lipinska i wsp., 2013; Klosowska i wsp., 2016). W przeprowadzonych eksperymentach można zauważyć, że zarówno białko Hsp104 WT jak i wariant D484K silnie zależą od Hsp70, w przeciwieństwie do wariantów Hsp104 F508A i Hsp104 D484K/F508A, które nie wykazują silniejszego wiązania agregatów w obecności Hsp70 (Ryc. 30B). Ta zależność sugeruje, że fizyczne oddziaływanie między Hsp70 a Hsp104 poprzez fenyloalaninę w pozycji 508 jest krytyczne dla stabilizacji oddziaływania między Hsp104 a agregatem, a to z kolei wpływa na wydajność dezagregacyjną.

7.5. Aktywność dezagregazy jest zależna od ilości funkcjonalnych miejsc oddziaływania z Hsp70

Białko Hsp104, aby aktywnie uczestniczyć w dezagregacji musi utworzyć heksamer oraz oddziaływać z Hsp70. Wytworzenie heksamerów, w których występują zarówno podjednostki białka WT, jak i podjednostki wariantu F508A, pozwoliło w przybliżeniu określić, ile podjednostek jest wymaganych do pełnej aktywności dezagregacyjnej białka Hsp104. Wyniki renaturacji lucyferazy oraz analizy z wykorzystaniem interferometrii biowarstwowej (Ryc. 24) pokazały, że zwiększanie

ilości podjednostek zmutowanych upośledza aktywność dezagregacyjną oraz zdolność wiązania z Hsp70 oddziałującym z agregatami. Nałożenie wyników eksperymentalnych na krzywe teoretyczne pokazało, że aby Hsp104 w pełni wykazywało swoją aktywność dezagregacyjną potrzeba przynajmniej 5 podjednostek funkcjonalnych, czyli że już 2 podjednostki zmutowane powodują drastyczne zahamowanie aktywności dezagregacyjnej (Ryc.25). Otrzymane wyniki nie są zgodne z wcześniejszymi, w których użyto wariantu Hsp104 A430W (DeSantis i wsp. 2014). Przez wprowadzenie tryptofanu w pozycji 430 wariant ten nie był stymulowany przez systemem Hsp70/JDP podczas reaktywacji agregatów lucyferazy, jednakże wykazywał pewną aktywność w obecności ATP γ S. Eksperymenty przy wykorzystaniu tego wariantu wykazały, że do prawidłowej aktywności Hsp104 wymagane są tylko dwie funkcjonalne podjednostki. Rozbieżność tę można wyjaśnić, uwzględniając umiejscowienie mutacji. Mutacja A430W znajduje się tuż za helisą 1 domeny M, gdzie może ona stabilizować pierścień M domen w heksamerze oraz stabilizować oddziaływanie z NBD1. W tym wypadku Hsp70 może nie być w stanie odgiąć tak zablokowanej M domeny w celu aktywacji Hsp104, pomimo tego, że główne miejsce oddziaływania z Hsp70 pozostaje dostępne. Natomiast przez wprowadzenie mutacji F508A, znajdującej się w pętli pomiędzy helisą 3 i 4, zablokowano miejsce oddziaływania z Hsp70 na M domenie, przez co Hsp70 nie może związać się z M domeną i nie może odgiąć jej w celu aktywacji dezagregazy. Porównując wyniki uzyskane przez DeSantis i wsp. (2014) oraz otrzymane przeze mnie można sugerować, że Hsp104 jest znacznie bardziej wrażliwe na zaburzenie oddziaływania z Hsp70, jak w przypadku wariantu Hsp104 F508A, a mniej wrażliwe na ograniczenie możliwości allosterycznej aktywacji przez Hsp70, w przypadku wariantu A430W.

Wyniki przedstawione w tej pracy, pokazują, że wprowadzenie do heksameru dezagregazy, 1-2 podjednostek niefunkcjonalnych w oddziaływaniu z Hsp70, diametralnie hamuje aktywność dezagregacyjną Hsp104, wskazując na istotne znaczenie oddziaływania pomiędzy Hsp104 a Hsp70 dla efektywnego procesu dezagregacyjnego. Rosenzweig i wsp. (2013) sugerują, że wiązanie pomiędzy dezagregazą a Hsp70 jest bardzo słabe. Wprowadzenie 1-2 podjednostek zrywających oddziaływanie z Hsp70 do heksameru Hsp104 może obniżyć już i tak słabe oddziaływanie pomiędzy partnerami dezagregacyjnymi. Dodatkowo można spekulować, że dla wiązania Hsp104 z Hsp70 istotna jest ilość dostępnych miejsc oddziaływania z Hsp70. Im większa ilość dostępnych miejsc dla Hsp70 tym tworzenie

się kompleksu między tymi białkami jest stabilniejsze a zaburzenie chociaż jednego z nich bardzo zmniejsza wydajność wiązania. Z drugiej strony można spekulować, że przy zaburzeniu chociaż jednego miejsca oddziaływania z Hsp70 na Hsp104, w nieznanym sposobie zmienia się struktura monomeru, powodując „reakcję łańcuchową”, która może wpływać na cały heksametr, hamując jego aktywność.

7.6. Toksyczność dezagregazy zależy od nadaktywności białka oraz od zdolności do oddziaływania z Hsp70 a Hsp104

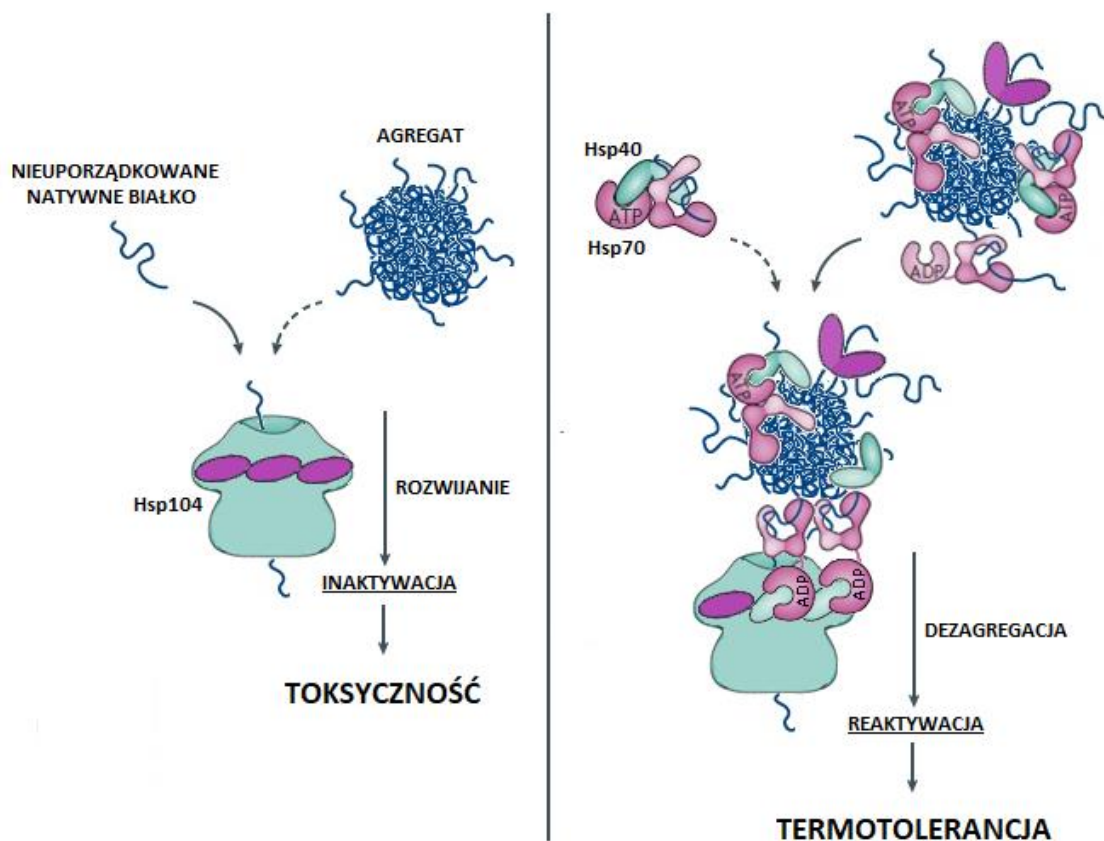
W formie nieaktywnej, domeny M dezagregazy oplatają NBD1, dzięki temu ograniczona jest aktywność białka. Oddziaływanie pomiędzy Hsp70 a MD powoduje przerwanie pierścienia oplatającego NBD1 i aktywację dezagregazy. Zerwanie oddziaływania pomiędzy Hsp104 a Hsp70, tak jak to obserwujemy w wariantach z wprowadzoną mutacją F508A, powoduje brak stymulacji przez Ssa1. Z drugiej strony, wprowadzenie mutacji w obrębie M domeny powoduje aktywację dezagregazy bez udziału Hsp70. Nadaktywność taką obserwujemy dla wariantów Hsp104 Y507A, Y507A/F508A, F508A, D484K czy D484K/F508A. Wprowadzenie nadaktywnych wariantów Hsp104 do komórek drożdży skutkuje niższym poziomem ekspresji tych białek (Ryc. 31A) w porównaniu do białka typu dzikiego. Mechanizm powodujący zahamowanie ekspresji takich wariantów nie jest znany. Dodatkowo można zauważyć, że wprowadzone warianty są toksyczne dla komórek drożdży (Ryc. 32B). Z analizowanych wariantów ten zawierający tylko mutację F508A wykazuje najmniejszą nadaktywność w reaktywacji agregatów GFP oraz dodatkowo jest najmniej toksyczny dla komórek. Wariant Hsp104 D484K, który zachowuje zdolność oddziaływania z Hsp70, jest mniej toksyczny niż wariant D484K/F508A - nadaktywny w tym samym stopniu, ale całkowicie uwolniony spod kontroli Hsp70 (Ryc. 32B). Można zatem wnioskować, że toksyczność wariantów Hsp104 zależy od dwóch czynników: nadaktywności i zdolności do tworzenia kompleksu z Hsp70. Jest to ważne w świetle poszukiwań terapeutycznego zastosowania hiperaktywnych wariantów Hsp104 w chorobach neurodegeneracyjnych (Jackrel i Shorter, 2017; Shorter, 2017; Torrente i wsp., 2016). Przypuszczalnie, dostosowując te czynniki indywidualnie poprzez mutację, można by wytworzyć mniej toksyczne warianty Hsp104 o większej aktywności dezagregacyjnej, dostosowując Hsp104 do oddziaływania z Hsp70 z docelowego organizmu. Uważa się, że toksyczność Hsp104 wynika z rozpoznawania

i translokacji funkcjonalnych białek (Lipinska i wsp., 2013; Schirmer i wsp., 2004; Tessarz i wsp., 2009; Johnston i wsp., 2017; Ruan i wsp., 2017). Zwiększona toksyczność wariantu Hsp104 D484K/F508A pozbawionego kontroli przez Hsp70 w porównaniu do wariantu Hsp104 D484K sugeruje, że oddziaływanie z Hsp70 zapobiega przetwarzaniu niepożądanych substratów białkowych. W obecności agregatów i niezagregowanych, lecz nieustrukturyzowanych wewnętrznie (ang. Intrinsically disordered) białek, zdolność do współpracy z Hsp70 chroni przed przetwarzaniem natywnych, nieustrukturyzowanych wewnętrznie białek (Ryc. 33).

7.7. Hsp70 wpływa na specyficzności substratową Hsp104

Dezagregaza nie jest zdolna do właściwego rozpoznawania łańcuchów polipeptydowych i potencjalnie może rozpoznawać jako substraty zarówno białka uwięzione w agregatach jak i nieustrukturyzowane motywy, które są częścią wielu funkcjonalnych białek. Ciekawym przykładem rozpoznawania natywnych białek przez Hsp104 jest białko Spa2. Białko Spa2 jest częścią kompleksu białkowego (ang. Polarisome) i uczestniczy w tworzeniu rusztowania aktynowego podczas podziału komórkowego. Badania pokazały, że Hsp104 rozpoznaje natywne białko Spa2 i oddziałuje z nim co sugeruje, że Hsp104 może odgrywać rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego (Tessarz i wsp., 2009). Jednakże przetwarzanie natywnych substratów może doprowadzić do utraty funkcji biologicznych białka zawierającego takie nieuporządkowane regiony, a w następstwie do śmierci komórki. W związku z tym wykształcił się mechanizm, który pozwala chronić komórki przed negatywnym działaniem dezagregazy. Związanie Hsp70 do powierzchni agregatu a co za tym idzie częściowe wyswobodzenie i związanie łańcucha polipeptydowego, powoduje nakierowanie dezagregazy do agregatu. Jednakże wielofunkcyjność Hsp70 pozwala wiązać również nowo zsyntetyzowane łańcuchy, które nie zostały jeszcze zwinięte, co może spowodować ich przetworzenie przez Hsp104, a to z kolei może spowodować zachwianie proteostazy komórkowej. Rozwiązaniem tego problemu staje się ilość cząsteczek Hsp70 uczestniczących w dezagregacji. Pojedyncza cząsteczka Hsp70 poprzez oddziaływanie z M domeną, nie jest w stanie aktywować dezagregazy, a żeby proces dezagregacji był w pełni efektywny, wymagane jest więcej cząsteczek Hsp70, oddziałujących z dezagregazą. Taka sytuacja zdarza się, gdy Hsp70 oddziałuje z agregatem. Samo powinowactwo dezagregazy do Hsp70 pod nieobecność agregatów

jest niezwykle niskie (Schlee i wsp., 2004; Kedzierska i wsp., 2005; Rosenzweig i wsp., 2013), dodatkowo dezagregaza wymaga wielu cząsteczek Hsp70 związanych z agregatem, aby stworzyć stabilny kompleks dezagregaza-Hsp70-agregat (Ryc.14) (Mogk i wsp., 2018; Fernandez-Higuero i wsp., 2018). To powoduje, że dezagregaza oddziałując z Hsp70 związanym z agregatem jest w stanie zainicjować reakcję translokacji i przetwarzać łańcuchy uwięzione w agregatach (Ryc. 36). Wydaje się, że dostępność i rozkład miejsc wiązania Hsp70 na powierzchni substratu białkowego czy też agregatów białkowych jest kryterium selektywności kompleksu inicjującego proces dezagregacji. Wymaga to jednak dalszych badań, aby zrozumieć ten aspekt selektywnego rozpoznawania substratu przez system Hsp104-Hsp70.



Rycina 36 | Oddziaływanie z Hsp70 odgrywa podwójną rolę w regulacji Hsp104. (lewy panel) Brak współpracy pomiędzy Hsp104 a Hsp70 podczas dezagregacji może powodować rozwijanie białek posiadających nieuporządkowane regiony w natywnej strukturze, co powoduje ich czasową dezaktywację i zwiększa prawdopodobieństwo ich nieprawidłowego ponownego fałdowania. W przypadku białek pełniących ważne funkcje komórkowe, taka aktywność Hsp104 może być toksyczna dla komórek. (prawy panel) Efektywna współpraca pomiędzy Hsp104 a Hsp70 przesuwaa specyficzność substratową w kierunku agregatów białkowych. Dzięki związaniu się cząsteczek Hsp70 do agregatu, Hsp104 zostaje ukierunkowane do agregatu, a obecność Hsp70 pozwala na aktywację dezagregazy i efektywną dezagregację.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abbas-Terki T., Donzé O., Briand P. A., Picard D. (2001) Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7569–7575.
- Abrams J.L., Verghese J., Gibney P.A., Morano K.A., (2014) Hierarchical functional specificity of cytosolic heat shock protein 70 (Hsp70) nucleotide exchange factors in yeast. *J Biol Chem.*, 9;289(19):13155-67.
- Acebrón S.P., Fernández-Sáiz V., Taneva S.G., Moro F., Muga A. (2008) DnaJ recruits DnaK to protein aggregates. *J Biol Chem.*, 283(3):1381-90.
- Alberti S. (2012) Molecular mechanisms of spatial protein quality control. *Prion.*, 6(5):437-42.
- Alderson, T. R., Kim, J. H. Markley, J. L. (2016) Dynamical Structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 Complexes. *Structure*, 24(7), 1014-30.
- Andréasson C., Fiaux J., Rampelt H., Druffel-Augustin S., Bukau B. (2008) Insights into the structural dynamics of the Hsp110-Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 28;105(43):16519-24.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. (2016) In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353(6294), aac4354.
- Bhattacharya A, Kurochkin AV, Yip GN, Zhang Y, Bertelsen EB, Zuiderweg ER (2009) Allosteric in Hsp70 chaperones is transduced by subdomain rotations. *J Mol Bio.*, 388:475–490 9.
- Biter A. B., Lee S., Sung N., Tsai F. T. (2012) Structural basis for intersubunit signaling in a protein disaggregating machine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31), 12515-20.
- Budina A., Basu S., Belcastro L., Murphy M.E., (2015) The Hsp70 Family of Heat Shock Proteins in Tumorigenesis: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities., Stress response pathways in cancer: From molecular targets to novel therapeutics *Springer.*, str. 203-224
- Bukau B., Deuerling E., Pfund C., Craig E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell.*, 14;101(2):119-22.
- Bukau B., Horwich A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.*, 92(3):351-66.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.*, 5;125(3):443-51.
- Burki F. (2014) The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(5):a016147
- Bracher A., Verghese J. (2015) GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 and BAG domain proteins: nucleotide exchange factors for Hsp70 molecular chaperones. *Subcell Biochem.*, 78:1-33.
- Cashikar A. G., Schirmer E. C., Hattendorf D. A., Glover J. R., Ramakrishnan M. S., Ware D. M., Lindquist S. L. (2002) Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein. *Mol Cell*, 9(4), 751-60.
- Carroni M., Kummer E., Oguchi Y., Wendler P., Clare D. K., Sinning I., Kopp J., Mogk A., Bukau B., Saibil H. R. (2014) Head-to-tail interactions of the coiled-coil domains regulate ClpB activity and cooperation with Hsp70 in protein disaggregation. *Elife*, 3, e02481.
- Chamera T., Kłosowska A., Janta A., Wyszowski H., Obuchowski I., Gumowski K., Liberek K. (2019) Selective Hsp70-dependent docking of Hsp104 to protein aggregates protects the cell from the toxicity of the disaggregase. *J Mol Biol.* 431/11. S0022-2836(19)30210-4.

- Chen B., Retzlaff M., Roos T., Frydman J. (2011) Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1;3(8):a004374.
- Craig E. A., Huang P., Aron R., Andrew A. (2006) The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 156, 1-21.
- De Los Rios P., Ben-Zvi A., Slutsky O, Azem A., Goloubinoff P. (2006) Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(16):6166-71.
- DeSantis M.E., Leung E.H., Sweeny E.A., Jackrel M.E., Cushman-Nick M., Neuhaus-Follini A., Vashist S., Sochor M.A., Knight M.N., Shorter J. (2012) Operational plasticity enables hsp104 to disaggregate diverse amyloid and nonamyloid clients. *Cell.*, 151(4):778-793.
- DeSantis M.E., Shorter J. (2012) The elusive middle domain of Hsp104 and ClpB: location and function. *Biochim Biophys Acta.*, 1823(1):29-39.
- DeSantis M. E., Sweeny E. A., Snead D., Leung E. H., Go M. S., Gupta K., Wendler P., Shorter J. (2014) Conserved distal loop residues in the Hsp104 and ClpB middle domain contact nucleotide-binding domain 2 and enable Hsp70-dependent protein disaggregation. *J. Biol. Chem.*, 289, 848–867.
- Deville C., Carroni M., Franke K.B., Topf M., Bukau B., Mogk A., Saibil H.R. (2017) Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase. *Sci Adv.*, 3(8):e1701726.
- Díaz-Villanueva J.F., Díaz-Molina R., García-González V. (2015) Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int J Mol Sci.*, 16(8):17193-230.
- Di Gregorio S.E., Duennwald M.L. (2018) ALS Yeast models-past success stories and new opportunities. *Front Mol Neurosci.*, 11:394.
- Doyle S.M., Hoskins J.R., Wickner S. (2007) Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(27):11138-44.
- Doyle S. M., Hoskins J. R., Wickner S. (2012) DnaK chaperone-dependent disaggregation by caseinolytic peptidase B (ClpB) mutants reveals functional overlap in the N-terminal domain and nucleotide-binding domain-1 pore tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 287, 28470–28479.
- Doyle S. M., Shastry S., Kravats A. N., Shih Y. H., Miot M., Hoskins J. R., Stan G., Wickner S. (2015) Interplay between E. coli DnaK, ClpB and GrpE during protein disaggregation. *J Mol Biol.*, 427(2), 312-27.
- Dragovic Z., Shomura Y., Tzvetkov N., Hartl F. U., Bracher A. (2006a) Fes1p acts as a nucleotide exchange factor for the ribosome-associated molecular chaperone Ssb1p. *Biol. Chem.*, 387, 1593–1600.
- Dragovic Z., Broadley S.A., Shomura Y., Bracher A., Hartl F.U. (2006b) Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* 2006; 25: 2519-2528.
- Dulle J. E., Stein K.C., True H. L. (2014) Regulation of the Hsp104 middle domain activity is critical for yeast prion propagation. *PLoS One* 9, e87521.
- Duran E.C., Weaver C.L., Lucius A.L. (2017) Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: common threads and disparate functions. *Front Mol Biosci.*, 3;4:54.
- Erives, A. J., Fassler, J. S. (2015) Metabolic and chaperone gene loss marks the origin of animals: evidence for Hsp104 and Hsp78 chaperones sharing mitochondrial enzymes as clients. *PLoS One*, 10(2), e0117192.

- Erzberger J.P., Berger J.M. (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 35:93-114.
- Estruch F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.*, 24(4):469-86.
- Fan Q., Park K. W., Du Z., Morano K. A., Li L. (2007) The role of Sse1 in the de novo formation and variant determination of the [PSI⁺] prion. *Genetics.*, 177, 1583–1593.
- Fan C. Y., Lee S., Ren H. Y., Cyr D. M. (2004) Exchangeable chaperone modules contribute to specification of type I and type II Hsp40 cellular function. *Mol Biol Cell.*, 15(2), 761-73.
- Fang N. N., Chan G. T., Zhu M., Comyn S. A., Persaud A., Deshaies R. J., Rotin D., Gsponer J., Mayor T. (2014) Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heatstress. *Nat Cell Biol.*, 16(12):1227-37.
- Fernández-Higuero J.A., Aguado A., Perales-Calvo J., Moro F., Muga A. (2018) Activation of the DnaK-ClpB complex is regulated by the properties of the bound substrate. *Sci Rep.*, 8(1):5796.
- Finley D., Ulrich H.D., Sommer T., Kaiser P. (2012) The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, 192(2):319-60.
- Franzmann T. M., Czekalla A., Walter S. G. (2011) Regulatory circuits of the AAA+ disaggregase Hsp104. *J Biol Chem.*, 286(20), 17992-8001.
- Gamer J., Multhaup G., Tomoyasu T., McCarty J.S., Rüdiger S., Schönfeld H.J., Schirra C., Bujard H., Bukau B. (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *EMBO J.*, 15(3):607-17.
- Gates S.N., Yokom A.L., Lin J., Jackrel M.E., Rizo A.N., Kendsersky N.M., Buell C.E., Sweeny E.A., Mack K.L., Chuang E., Torrente M.P., Su M., Shorter J, Southworth D.R. (2017) Ratchet-like polypeptide translocation mechanism of the AAA+ disaggregase Hsp104. *Science.*, 357(6348):273-279.
- Ghaemmaghami S., Huh W. K., Bower K., Howson R. W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E. K., Weissman J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.*, 425, 737–741
- Glover J.R., Lindquist S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell.*, 94(1):73-82.
- Goeckeler J. L., Petruso A. P., Aguirre J., Clement C. C., Chiosis G., Brodsky J. L. (2008) The yeast Hsp110, Sse1p, exhibits high-affinity peptide binding. *FEBS Lett.*, 582, 2393–2396.
- Golas E., Maisuradze G. G., Senet P., Oldziej S., Czaplewski C., Scheraga H. A., Liwo A. (2012) Simulation of the opening and closing of Hsp70 chaperones by coarse-grained molecular dynamics. *J Chem Theory Comput.*, 8:1750–1764.
- Gowda N. K., Kandasamy G., Froehlich M. S., Dohmen R. J., Andréasson C. (2013) Hsp70 nucleotide exchange factor Fes1 is essential for ubiquitin-dependent degradation of misfolded cytosolic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 5975–5980.
- Görner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schüller C. (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.*, 21(1-2):135-44.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.*, 386(6624):463-71.
- Han W., Christen P. (2003) Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. *J Biol Chem.*, 278(21):19038-43.

- Han W, Christen P. (2004) cis-Effect of DnaJ on DnaK in ternary complexes with chimeric DnaK/DnaJ-binding peptides. *FEBS Lett.*, 563(1-3):146-50.
- Hartl F. U., Hayer-Hartl M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.*, 295:1852–1858 2.
- Haslbeck M., Walke S., Stromer T., Ehrnsperger M., White H.E., Chen S., Saibil H.R., Buchner J.(1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.*, 18:6744–6751.
- Haslberger T., Weibezahn J., Zahn R., Lee S., Tsai F. T., Bukau B., Mogk A. (2007) M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity. *Mol Cell.*, 25(2), 247-60.
- Hattendorf D. A., Lindquist S. L. (2002) Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *Embo J.*, 21(1-2), 12-21.
- Hecht K.A., O'Donnell A.F., Brodsky J.L. (2014) The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cell Logist.* 4(1):e28023.
- Heck J. W., Cheung S. K., Hampton R. Y. (2010) Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 1106–1111.
- Heuck, A., Schitter-Sollner, S., Suskiewicz, M. J., Kurzbauer, R., Kley, J., Schleiffer, A., Rombaut, P., Herzog, F. & Clausen, T. (2016) Structural basis for the disaggregase activity and regulation of Hsp104. *Elife.*, 5.
- Higurashi T., Hines J. K., Sahi C., Aron R., Craig E. A. (2008) Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(43):16596-601.
- Hill S.M., Hanzén S., Nyström T. (2017) Restricted access: spatial sequestration of damaged proteins during stress and aging. *EMBO Rep.*, 18(3):377-391.
- Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U. (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*
- Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J., Castelle C.J., Butterfield C.N., HERNSDORF A.W., Amano Y., Ise K., Suzuki Y., Dudek N., Relman D.A., Finstad K.M., Amundson R., Thomas B.C., Banfield J.F. (2016) A new view of the tree of life. *Nat Microbiol.* 1:16048
- Hung G.C., Masison D.C. (2006) N-terminal domain of yeast Hsp104 chaperone is dispensable for thermotolerance and prion propagation but necessary for curing prions by Hsp104 overexpression. *Genetics.*, 173(2):611-20.
- Jackrel M.E., DeSantis M.E., Martinez B.A., Castellano L.M., Stewart R.M., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Shorter J. (2014) Potentiated Hsp104 variants antagonize diverse proteotoxic misfolding events. *Cell.*, 156(1-2):170-82.
- Jackrel M.E., Shorter J. (2017) Protein-remodeling factors as potential therapeutics for neurodegenerative disease. *Front Neurosci.*, 11:99.
- Johansen T., Lamark T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.*, 7(3):279-96.
- Johnston D.M., Miot M., Hoskins J.R., Wickner S., Doyle S.M. (2017) Substrate discrimination by ClpB and Hsp104. *Front Mol Biosci.*, 4:36.
- Jolly C., Morimoto R.I. (2000) Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.*, 92(19):1564-72.
- Jordan R., McMacken R. (1995) Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J Biol Chem.*, 270(9):4563-9.
- Kabani M., Beckerich J. M., Brodsky J. L. (2002) Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 4677–4689.

- Kabani M. (2009) Structural and functional diversity among eukaryotic Hsp70 nucleotide exchange factors. *Protein Pept. Lett.*, 16, 623–660.
- Kaganovich D., Kopito R., Frydman J. (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature.*, 454(7208):1088-95.
- Kaimal, J. M., Kandasamy, G., Gasser, F. & Andreasson, C. (2017) Coordinated Hsp110 and Hsp104 activities power protein disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 37(11).
- Kakish J., Allen K.J., Harkness T.A., Krol E.S., Lee J.S. (2016) Novel dimer compounds that bind α -synuclein can rescue cell growth in a yeast model overexpressing α -synuclein. A possible prevention strategy for Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci.*,7(12):1671-1680.
- Kandasamy G., Andréasson C. (2018) Hsp70-Hsp110 chaperones deliver ubiquitin-dependent and -independent substrates to the 26S proteasome for proteolysis in yeast. *J Cell Sci.*;131(6).
- Kampinga H. H., Craig E. A. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(8):579-92.
- Kedzierska S., Akoev V., Barnett M. E., Zolkiewski M. (2013) Structure and function of the middle domain of ClpB from *Escherichia coli*. *Biochemistry.*, 42, 14242–14248.
- Kedzierska S., Chesnokova L.S., Witt S.N., Zolkiewski M. (2005) Interactions within the ClpB/DnaK bi-chaperone system from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.*, 444(1):61-5.
- Kłosowska A., Chamera T., Liberek K. (2016) Adenosine diphosphate restricts the protein remodeling activity of the Hsp104 chaperone to Hsp70 assisted disaggregation. *Elife.*, 5.
- Kryndushkin D., Wickner R. B. (2007) Nucleotide exchange factors for Hsp70s are required for [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, 18, 2149–2154.
- Kummer E., Szlachcic A., Franke K.B., Ungelenk S., Bukau B., Mogk A. (2016) Bacterial and yeast AAA+ disaggregases ClpB and Hsp104 operate through conserved mechanism involving cooperation with Hsp70. *J Mol Biol.*, 428(21):4378-4391.
- Kwon Y.T., Ciechanover A. (2017) The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends Biochem Sci.*, 42(11):873-886.
- Langer T., Lu C., Echols H., Flanagan J., Hayer M.K., Hartl F.U.(1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature.*, 356(6371):683-9.
- Laufen T., Mayer M. P., Beisel C., Klostermeier D., Mogk A., Reinstein J., Bukau, B. (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96, 5452-5457.
- Lee J., Kim J.H., Biter A.B., Sielaff B., Lee S., Tsai F. T., (2013) Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 110, 8513–8518.
- Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigler P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T.(2003) The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell.*, 115(2):229-40.
- Lewandowska A., Matuszewska M., Liberek K. (2007) Conformational properties of aggregated polypeptides determine ClpB-dependence in the disaggregation process. *J Mol Biol.*, 371(3):800-11.
- Li C, Wen A, Shen B, Lu J, Huang Y, Chang Y. (2011) FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnol.*, 11:92.
- Li Z., Hartl F.U., Bracher A. (2013) Structure and function of Hip, an attenuator of the Hsp70 chaperone cycle. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(8):929-35.

- Lipinska N., Zietkiewicz S., Sobczak A., Jurczyk A., Potocki W., Morawiec E., Wawrzycka A., Gumowski K., Slusarz M., Rodziewicz-Motowidlo S., Chrusciel E., Liberek K. (2013) Disruption of ionic interactions between the nucleotide binding domain 1 (NBD1) and middle (M) domain in Hsp100 disaggregase unleashes toxic hyperactivity and partial independence from Hsp70. *J Biol Chem.* 288(4):2857-69.
- Liu Q., D'Silva P., Walter W., Marszalek J., Craig E.A. (2003) Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science.*, 300(5616):139-41.
- Louw C. A., Ludewig M. H., Mayer J., Blatch G. L. (2010) The Hsp70 chaperones of the tritryps are characterized by unusual features and novel members. *Parasitol Int.*, 59:497-505.
- Löw P. (2011) The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *Gen Comp Endocrinol.*, 172(1):39-43.
- Lu Z., Cyr D.M. (1998) The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J Biol Chem.*, 273(10):5970-8.
- Lum, R., Niggemann, M., Glover, J. R. (2008) Peptide and protein binding in the axial channel of Hsp104. Insights into the mechanism of protein unfolding. *J Biol Chem.*, 283(44), 30139-50.
- Lum, R., Tkach, J.M., Vierling, E., Glover, J.R. (2004) Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *J. Biol. Chem.* 279, 29139-29146.
- Mackay, R. G., Helsen, C. W., Tkach, J. M., Glover, J. R. (2008) The C-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 plays a role in oligomer assembly. *Biochemistry*, 47(7), 1918-27.
- Martin A., Baker T.A., Sauer R.T. (2005) Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature.* 437(7062):1115-20.
- Mayer M.P., Brehmer D., Gässler C.S., Bukau B. (2001) Hsp70 chaperone machines. *Adv Protein Chem.*, 59:1-44.
- Mayer M. P., Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.*, 62:670-684.
- Mayer M. P., Kityk R. (2015) Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s. *Front Mol Biosci.*, 2:58.
- McClellan A.J., Tam S., Kaganovich D., Frydman J. (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nature Cell Biol.*, 7: 736-741
- Malinowska L., Kroschwald S., Munder M. C., Richter D., Alberti S. (2012) Molecular chaperones and stress-inducible protein-sorting factors coordinate the spatiotemporal distribution of protein aggregates. *Mol Biol Cell.*, 23(16):3041-56.
- Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. (2015) Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.*, 16(6):345-57.
- Miller S.B., Ho C.T., Winkler J., Khokhrina M., Neuner A., Mohamed M.Y., Guilbride D.L., Richter K., Lisby M., Schiebel E., Mogk A., Bukau B. (2015) Compartment-specific aggregases direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J.* 34(6):778-97.
- Miot M., Reidy M., Doyle S.M., Hoskins J.R., Johnston D.M., Genest O., Vitery M.C., Masison D.C., Wickner S. (2011) Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 108(17):6915-20.
- Mogk A., Bukau B., Kampinga H.H. (2018) Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol Cell.*, 69(2):214-226.
- Mogk A., Kummer E., Bukau B. (2015) Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front Mol Biosci.*, 2:22.

- Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rüdiger S., Röder D., Langen H., Bukau B. (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.*, 18(24):6934-49.
- Mukai H., Kuno T., Tanaka H., Hirata D., Miyakawa T., Tanaka C. (1993) Isolation and characterization of SSE1 and SSE2, new members of the yeast HSP70 multigene family. *Gene.*, 132, 57-66.
- Muszkopf M., Preusser de Mattos E., Bergink S., Kampinga H.H. (2018) HSP40/DNAJ Chaperones rozdział w eLS, str. 1-11
- Neal S., Mak R., Bennett E.J., Hampton R. (2017) A Cdc48 "Retrochaperone" Function Is Required for the Solubility of Retrotranslocated, Integral Membrane Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD-M) Substrates. *J Biol Chem.*; 292(8):3112-3128.
- Newcomb L.L., Diderich J.A., Slattey M.G., Heideman W. (2003) Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryot. Cell.*, 2:143-149.
- Nillegoda N.B., Bukau B. (2015) Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Front Mol Biosci.*, 2:57.
- Oguchi Y., Kummer E., Seyffer F., Berynskyy M., Anstett B., Zahn R., Wade R. C., Mogk A., Bukau B. (2012) A tightly regulated molecular toggle controls AAA+ disaggregase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1338-1346.
- Oh H.J., Easton D., Murawski M., Kaneko Y., Subject J.R. (1999) The chaperoning activity of Hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 15712-15718.
- Okuda, M., Niwa, T. & Taguchi, H. (2015) Single-molecule analyses of the dynamics of heat shock protein 104 (Hsp104) and protein aggregates. *J Biol Chem*, 290(12), 7833-40.
- Park S. H., Kukushkin Y., Gupta R., Chen T., Konagai A., Hipp M. S., Hayer-Hartl M., Hartl F. U. (2013) PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. *Cell.*, 154(1):134-45.
- Park Y.N., Zhao X., Yim Y.I., Todor H., Ellerbrock R., Reidy M., Eisenberg E., Masison D.C., Greene L.E. (2014) Hsp104 overexpression cures *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] by causing dissolution of the prion seeds. *Eukaryot Cell.*, 13(5):635-47.
- Parsell D.A., Kowal A.S., Singer M.A., Lindquist S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature.*, 372(6505):475-8.
- Polier S., Hartl F. U., Bracher A. (2010) Interaction of the Hsp110 molecular chaperones from *S. cerevisiae* with substrate protein. *J. Mol. Biol.*, 401, 696-707.
- Preston G.M., Guerriero C.J., Metzger M.B., Michaelis S., Brodsky J.L. (2018) Substrate Insolubility Dictates Hsp104-Dependent Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation. *Mol Cell.*; 70(2):242-253.e6.
- Qi R., Sarbeng E. B., Liu Q., Le K. Q., Xu X., Xu H., Yang J., Wong J. L., Vorvis C., Hendrickson W. A., Zhou L. (2013) Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(7), 900-7.
- Qiu X. B., Shao Y. M., Miao S., Wang L. (2006) The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci.*, 63, 2560-70.
- Oromendia A. B., Dodgson S.E., Amon A. (2012) Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast. *Genes* 26:2696-708.
- Rajan V. B., D'Silva P. (2009) *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Funct Integr Genomics.*, 9, 433-446.

- Reggiori F., Klionsky D.J. (2013) Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics.*, 194(2):341-61.
- Reidy M., Sharma R., Shastry S., Roberts B. L., Albino-Flores I., Wickner S., Masison D. C. (2014) Hsp40s specify functions of Hsp104 and Hsp90 protein chaperone machines. *PLoS Genet.*, 10(10), e1004720.
- Rosenzweig R., Farber P., Velyvis A., Rennella E., Latham M. P., Kay L. E. (2015) ClpB N-terminal domain plays a regulatory role in protein disaggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112, E6872–E6881.
- Rosenzweig R., Moradi S., Zarrine-Afsar A., Glover J. R. i Kay L. E. (2013) Unraveling the mechanism of protein disaggregation through a ClpB-DnaK interaction. *Science.*, 339(6123), 1080-3.
- Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* doi: 10.1038/s41580-019-0133-
- Ruan L., Zhou C., Jin E., Kucharavy A., Zhang Y., Wen Z., Florens L., Li R. (2017) Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature.*, 543(7645):443-446.
- Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo J.*, 16(7), 1501-7.
- Saibil H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14(10):630-42.
- Sanchez Y., Lindquist S.L. (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science.*, 248(4959):1112-5.
- Sauer R.T., Bolon D.N., Burton B.M., Burton R.E., Flynn J.M., Grant R.A., Hersch G.L., Joshi S.A., Kenniston J.A., Levchenko I., Neher S.B., Oakes E.S., Siddiqui S.M., Wah D.A., Baker T.A. (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell.*, 119(1):9-18.
- Schaupp A., Marcinowski M., Grimminger V., Bosl B., Walter S. (2007) Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. *J Mol Biol.*, 370(4), 674-86.
- Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 21(8):289-96.
- Schirmer E.C., Ware D.M., Queitsch C., Kowal A.S., Lindquist S.L. (2001) Subunit interactions influence the biochemical and biological properties of Hsp104. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 98(3), 914-9.
- Schirmer E.C., Homann O.R., Kowal A.S., Lindquist S. (2004) Dominant gain-of-function mutations in Hsp104p reveal crucial roles for the middle region. *Mol Biol Cell.*, 15(5):2061-72.
- Schlee S., Beinker P., Akhrymuk A., Reinstein J. (2004) A chaperone network for the resolubilization of protein aggregates: direct interaction of ClpB and DnaK. *J Mol Biol.*, 336(1):275-85.
- Schlieker C., Weibezahn J., Patzelt H., Tessarz P., Strub C., Zeth K., Erbse A., Schneider-Mergener J., Chin J.W., Schultz P.G., Bukau B., Mogk A. (2004) Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol.*, 11(7):607-15.
- Schneider K.L., Nyström T., Widlund P.O. (2018) Studying spatial protein quality control, proteopathies, and aging using different model misfolding proteins in *S. cerevisiae*. *Front Mol Neurosci.*; 11:249.

- Schröder H., Langer T., Hartl F.U., Bukau B. (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.*, 12(11):4137-44.
- Seyffer F., Kummer E., Oguchi Y., Winkler J., Kumar M., Zahn R., Sourjik V., Bukau B., Mogk A. (2012) Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 1347–1355.
- Shaner L., Sousa R., Morano K.A. (2006) Characterization of Hsp70 binding and nucleotide exchange by the yeast Hsp110 chaperone Sse1. *Biochemistry.*, 45: 15075-15084.
- Shaner L., Wegele H., Buchner J., Morano K.A. (2005) The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *J Biol Chem.*, 280(50):41262-9.
- Sharma D., Martineau C.N., Le Dall M.T. Reidy M., Masison D.C., Kabani M. (2009) Function of SSA subfamily of Hsp70 within and across species varies widely in complementing *Saccharomyces cerevisiae* cell growth and prion propagation. *PLoS One.*, (8):e6644.
- Shintani T., Klionsky D.J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.*, 306(5698):990-5.
- Shomura Y., Dragovic Z., Chang H. C., Tzvetkov N., Young J. C., Brodsky J. L., Guerriero V., Hartl F. U., Bracher A. (2005) Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol. Cell.*, 17, 367–379.
- Shorter J. (2016) Engineering therapeutic protein disaggregases. *Mol Biol Cell.*, 27(10):1556-60.
- Shorter J. (2017) Designer protein disaggregases to counter neurodegenerative disease. *Curr Opin Genet Dev.*, 44:1-8.
- Shorter J., Lindquist S. (2006) Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. *Mol Cell.*, 23(3), 425-38.
- Shorter J., Southworth D.R. (2019) Spiraling in control: structures and mechanisms of the Hsp104 disaggregase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, pii: a034033.
- Sielaff B., Tsai F.T. (2010) The M-domain controls Hsp104 protein remodeling activity in an Hsp70/Hsp40-dependent manner. *J Mol Biol.*, 402(1):30-7.
- Sondermann H., Ho A. K., Listenberger L. L., Siegers K., Moarefi I., Wente S. R., Hartl F. U., Young J. C. (2002) Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 33220–33227.
- Soti C., Csermely P. (2007) Aging cellular networks: chaperones as major participants. *Exp Gerontol.*, 42(1-2):113-9.
- Sousa R., Lafer E.M. (2019) The physics of Entropic Pulling: A novel model for the Hsp70 motor mechanism. *Int J Mol Sci.*, 20(9). pii: E2334.
- Specht S., Miller S.B., Mogk A., Bukau B. Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.*, 14;195(4):617-29.
- Sweeny E.A., Jackrel M.E., Go M.S., Sochor M.A., Razzo B.M., DeSantis M.E., Gupta K., Shorter J. (2015) The Hsp104 N-terminal domain enables disaggregase plasticity and potentiation. *Mol Cell.*, 5;57(5):836-849.
- Sweeny E.A., Shorter J. Mechanistic and structural insights into the prion-disaggregase activity of Hsp104. *J Mol Biol.*, 428(9 Pt B):1870-85.
- Tanaka K. (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(1):12-36.

- Tariq A., Lin J., Noll M.M., Torrente M.P., Mack K.L., Murillo O.H., Jackrel M.E., Shorter J. (2018) Potentiating Hsp104 activity via phosphomimetic mutations in the middle domain. *FEMS Yeast Res.*, 18(5).
- Tessarz, P., Mogk, A., Bukau, B. (2008) Substrate threading through the central pore of the Hsp104 chaperone as a common mechanism for protein disaggregation and prion propagation. *Mol Microbiol.*, 68(1), 87-97.
- Tessarz P., Schwarz M., Mogk A., Bukau B. (2009) The yeast AAA+ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins. *Mol Cell Biol.*, 29(13):3738-45.
- Torrente M.P., Chuang E., Noll M.M., Jackrel M.E., Go M.S., Shorter J. (2016) Mechanistic insights into Hsp104 potentiation. *J Biol Chem.*, 291(10):5101-15.
- Trott A., Morano K.A. (2004) SYM1 is the stress-induced *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the mammalian kidney disease gene *Mpv17* and is required for ethanol metabolism and tolerance during heat shock. *Eukaryot Cell.*, 3(3):620-31.
- Truman A. W., Kristjansdottir K., Wolfgeher D., Hasin N., Polier S., Zhang H., Perrett S., Prodromou C., Jones G. W., Kron S. J. (2012) CDK-dependent Hsp70 Phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell.*, 151(6):1308-18.
- Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(11):777-88.
- Verghese J., Morano K. A. (2012) A lysine-rich region within fungal BAG domain-containing proteins mediates a novel association with ribosomes. *Eukaryot. Cell* 11, 1003–1011.
- Verghese J., Abrams J., Wang Y. Morano K.A. (2012b) Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(2):115-58
- Voos W., Röttgers K. (2002) Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta.*, 1592(1):51-62.
- Walsh P., Bursac D., Law Y. C., Cyr D. Lithgow T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.*, 5, 567-571.
- Walters R. W., Muhrad D., Garcia J., Parker R. (2015) Differential effects of Ydj1 and Sis1 on Hsp70-mediated clearance of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.*, 21(9):1660-71.
- Wegele H., Haslbeck M., Reinstein J., Buchner J. (2003) Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J Biol Chem.*, 278(28):25970-6.
- Weibezahn J., Schlieker C., Tessarz P., Mogk A., Bukau B. (2005) Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biol Chem.*, 386(8):739-44.
- Weibezahn J., Tessarz P., Schlieker C., Zahn R., Maglica Z., Lee S., Zentgraf H., Weber-Ban E.U., Dougan D.A., Tsai F.T., Mogk A., Bukau B. (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell.*, 119(5):653-65.
- Wendler P., Shorter J., Plisson C., Cashikar A.G., Lindquist S., Saibil H.R. (2007) Atypical AAA+ subunit packing creates an expanded cavity for disaggregation by the protein-remodeling factor Hsp104. *Cell.*, 131(7):1366-77.
- Werbeck N.D., Schlee S., Reinstein J. (2008) Coupling and dynamics of subunits in the hexameric AAA+ chaperone ClpB. *J Mol Biol.*, 378(1):178-90.
- Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. (2012a) Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. *J Struct Biol.*, 179(2), 152-60.

- Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. (2012b) Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation. *J Cell Biol.*, 198(3), 387-404.
- Woo K. M., Kim K. I., Goldberg A. L., Ha D. B., Chung C. H. (1992) The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J Biol Chem*, 267(28), 20429-34.
- Wortmann S.B., Ziętkiewicz S., Kousi M., Szklarczyk R., Haack T.B., Gersting S.W., Muntau A.C., Rakovic A., Renkema G.H., Rodenburg R.J., Strom T.M., Meitinger T., Rubio-Gozalbo M.E., Chrusciel E., Distelmaier F., Golzio C., Jansen J.H., van Karnebeek C., Lillquist Y., Lücke T., Őunap K., Zordania R., Yaplito-Lee J., van Bokhoven H., Spelbrink J.N., Vaz F.M., Pras-Raves M., Ploski R., Pronicka E., Klein C., Willemsen M.A., de Brouwer A.P., Prokisch H., Katsanis N., Wevers R.A. (2015) CLPB mutations cause 3-methylglutaconic aciduria, progressive brain atrophy, intellectual disability, congenital neutropenia, cataracts, movement disorder. *Am J Hum Genet.* 96(2):245-57.
- Xu X., Sarbeng E. B., Vorvis C., Kumar D. P., Zhou L., Liu Q. (2012) Unique peptide substrate binding properties of 110-kDa heat-shock protein (Hsp110) determine its distinct chaperone activity. *J. Biol. Chem.*, 287, 5661–5672.
- Yokom A.L., Gates S.N., Jackrel M.E., Mack K.L., Su M., Shorter J., Southworth D.R. (2016) Spiral architecture of the Hsp104 disaggregase reveals the basis for polypeptide translocation. *Nat Struct Mol Biol.*, 23(9):830-7.
- Young J.C., Agashe V.R., Siegers K., Hartl F.U. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 5(10):781-91.
- Youker R.T., Walsh P., Beilharz T., Lithgow T., Brodsky J.L.(2004) Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol Biol Cell.*, 15(11):4787-97.
- Yu H. Y., Ziegelhoffer T., Osipiuk J., Ciesielski S. J., Baranowski M., Zhou M., Joachimiak A., Craig E. A. (2015) Roles of intramolecular and intermolecular interactions in functional regulation of the Hsp70 J-protein co-chaperone Sis1. *J Mol Biol.*, 427(7), 1632-43.
- Zeymer C., Fischer S., Reinstein J. (2014) trans-Acting arginine residues in the AAA+ chaperone ClpB allosterically regulate the activity through inter- and intradomain communication. *J Biol Chem*, 289(47), 32965-76.
- Zhang T., Ploetz E.A., Nagy M., Doyle S.M., Wickner S., Smith P.E., Zolkiewski M. (2012) Flexible connection of the N-terminal domain in ClpB modulates substrate binding and the aggregate reactivation efficiency. *Proteins.*, 80(12):2758-68.
- Zhao X., Rodriguez R., Silberman R.E., Ahearn J.M., Saidha S., Cummins K.C., Eisenberg E., Greene L.E. (2017) Heat shock protein 104 (Hsp104)-mediated curing of [PSI⁺] yeast prions depends on both [PSI⁺] conformation and the properties of the Hsp104 homologs. *J Biol Chem.*, 292(21):8630-8641.
- Zietkiewicz S., Krzewska J., Liberek K. (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem.*, 279(43):44376-83.
- Zietkiewicz S., Lewandowska A., Stocki P., Liberek K. (2006) Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70-Hsp100-dependent disaggregation. *J Biol Chem.*, 281(11):7022-9.

9. ZAŁĄCZNIKI

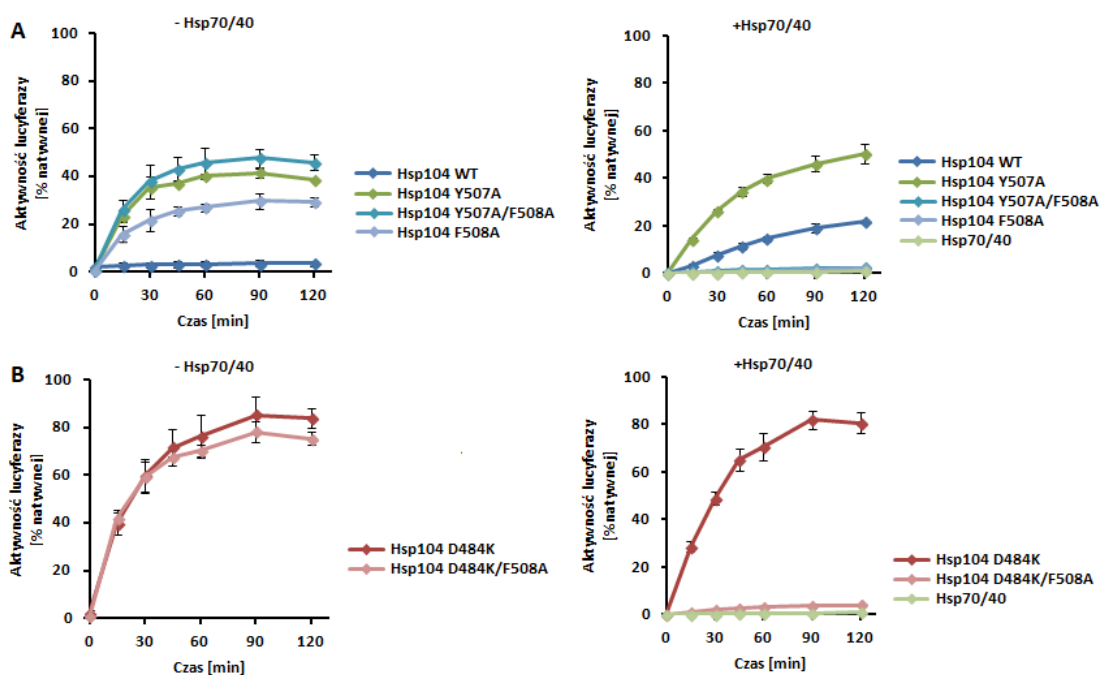
Załącznik 1

Klasa	Białko/a	Funkcje	Ilość cząsteczek na komórke (Ghaemmaghami i wsp., 2003)
Hsp100	Hsp104	Dezagregaza	5530
Hsp90	Hsp82	Dojrzewanie białek, indukowane stresem	444943
	Hsc82	Dojrzewanie białek ekspresja konstytutywna	132053
Białka współdziałające z Hsp90	Sti1	Oddziaływanie Hsp70/Hsp90, zawiera motyw TPR	67600
	Cns1	Podobny do Sti1	672
	Cdc37	Oddziaływanie z kinazami białkowymi	10200
	Sba1	Regulator aktywności ATPazowej Hsp90	33700
	Cpr6	Homolog immunofiliny, przyspiesza fałdowanie białek, zawiera motyw TPR, indukowany stresem	18600
	Cpr7	Homolog immunofiliny, przyspiesza fałdowanie białek, zawiera motyw TPR, ekspresja konstytutywna, odgrywa rolę w regulacji Hsf1	3230
	Sgt1	Zawiera motyw TPR, białko adaptorowe Hsp90, uczestniczy w ubiquitynacji i późniejszej degradacji białek	1340
	Aha1	Regulator aktywności ATPazowej Hsp90	13939
	Ppt1	Zawiera motyw TPR, fosfataza białkowa, która specyficznie wiąże się i defosforyluje Hsp90 (Hsc82 i Hsp82)	6990
Hsp110	Sse1	Wymiennik nukleotydów Hsp70, uczestniczy w ubiquitynacji i późniejszej degradacji białek, wiąże substraty, ekspresja konstytutywna	71700
	Sse2	Wymiennik nukleotydów Hsp70, uczestniczy w ubiquitynacji i późniejszej degradacji białek, wiąże substraty, indukowany stresem	6300
Hsp70	Ssa1, Ssa2	Składanie białka, translokacja, ekspresja konstytutywna	Ssa1 - 269000 Ssa2 - 364000
	Ssa3, Ssa4	Składanie białka, translokacja, indukowany stresem	Ssa3 - 6440 Ssa4 - 17900
	Ssb1, Ssb2	Fałdowanie pierwotnego łańcucha polipeptydowego	Ssb1 - 170000 Ssb2 - 104000
Czynniki wymiany nukleotydów Hsp70	Fes1	Wymiennik nukleotydów Hsp70, zaangażowany w translację białek, propagację prionów [PSI +]	13100
	Snl1	Wymiennik nukleotydów Hsp70, związany z ER	3346
JDP/Białka J	Ydj1	Aktywator ATPazy Hsp70, wiąże substraty	119000
	Sis1	Aktywator ATPazy Hsp70, wiąże substraty	20300
	Zou1	Składnik kompleksu związanego z rybosomem (RAC), biorący udział w regulacji dokładnego zakończenia translacji i w fałdowaniu lub utrzymywaniu powstających polipeptydów w stanie zdolnym do fałdowania. ZUO1 może działać jako białko J dla SSB1 / SSB2 tylko w połączeniu z SSZ1.	86400
	Caj1	Aktywator ATPazy Hsp70, wiąże substraty	?
	Djp1	Aktywator ATPazy Hsp70, wiąże substraty, import peroksymalny	8970
	Xdj1	Aktywator ATPazy Hsp70, wiąże substraty	1210
	Apj1	Aktywator ATPazy Hsp70, wiąże substraty	125
	Jjj1	Aktywator ATPazy Hsp70, biogeneza rybosomów	2310
	Jjj2	Aktywator ATPazy Hsp70	184
	Jjj3	Aktywator ATPazy Hsp70	2010
	Hlj1	Aktywator ATPazy Hsp70, degradacja białek związana z siateczką endoplazmatyczną (ERAD)	1840
	Cwc23	Aktywator ATPazy Hsp70, składanie mRNA	?

	Swa2	Aktywator ATPazy Hsp70, transport pęcherzyków kleratynowych	768
Szaperoniny	TriC/Cct1–Cct8	Składanie białka, substraty cytoszkieletu	Cct1- 3050 Cct2 - ? Cct3 - ? Cct4 - 5530 Cct5 - ? Cct6 - ? Cct7 - ? Cct8?
Białka współdziałające z szaperoninami	Pfd1–Pfd6	Składanie białka, substraty cytoszkieletu	Pfd1 - 721 Pfd2 - 1660 Pfd3 - 6550 Pfd4 - 7470 Pfd5 - 2900 Pfd6 - 784
sHSP	Hsp42	Zapobiegają agregacji	1470
	Hsp26	Zapobiegają agregacji	19300
Inne	Hsp12	Białko błonowe?	4490

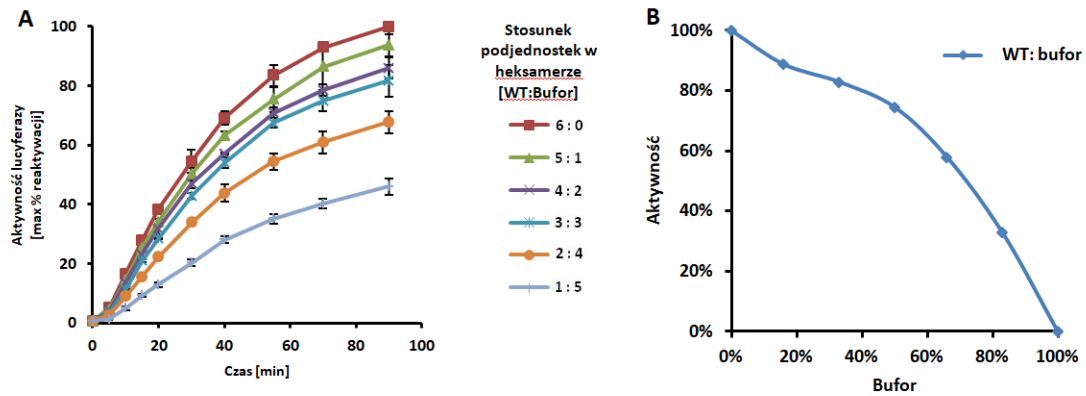
Tabela Z1 | Białka opiekuńcze i białka z nimi współdziałające występujące w cytozolu drożdży *S. cerevisiae*.
Zmodyfikowano na podstawie: Verghese i wsp., 2012b

Załącznik 2



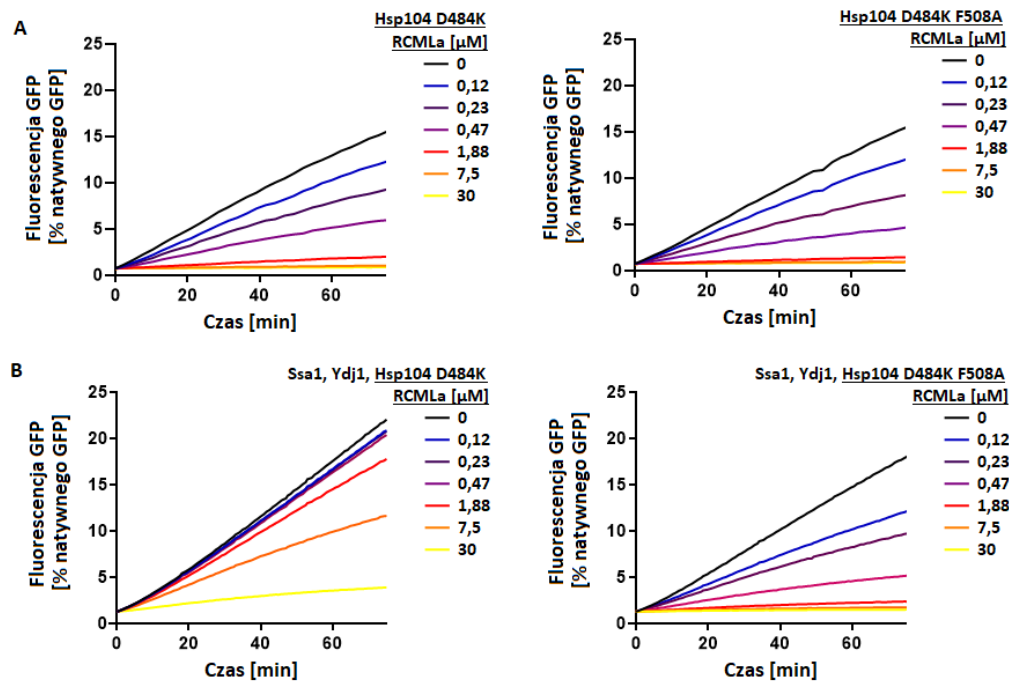
Rycina Z2 | Reaktywacja lucyferazy denaturowanej mocznikiem. A | Reaktywacja lucyferazy przy użyciu wariantów Hsp104 WT (0,5 μ M), Hsp104 Y507A, Hsp104 Y507A/F508A lub Hsp104 F508A (0,5 μ M) bez Ssa1/Ydj1 (panel lewy) lub z dodaniem Ssa1 (2 μ M) i Ydj1 (1 μ M) (panel prawy). **B |** Reaktywacja lucyferazy przy użyciu wariantów Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K F508A (0,5 μ M), bez Ssa1/Ydj1 (panel lewy) oraz z dodaniem Ssa1 (2 μ M) i Ydj1 (1 μ M) (panel prawy).

Załącznik 3



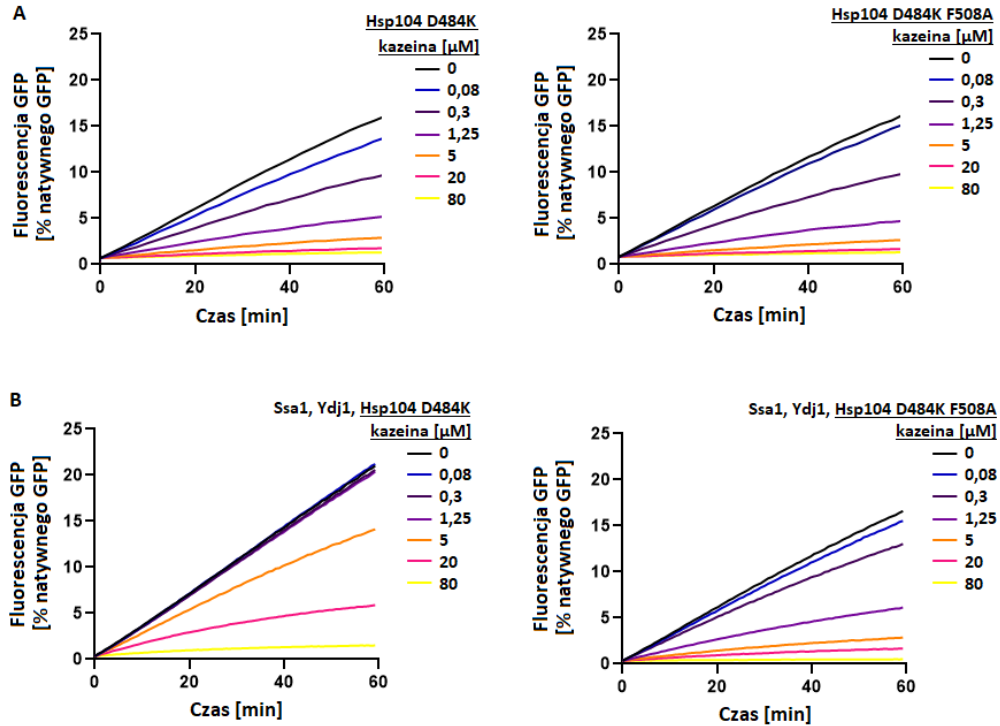
Rycina Z3 | Aktywność Hsp104 WT w reakcji reaktywacji zagregowanej lucyferazy. **A** | Zdolność do reaktywacji zagregowanej lucyferazy przez heteroheksamery. Zdenaturowaną termicznie lucyferazę reaktywowano przez dodatek Hsp104 rozcieńzanego buforem w odpowiednich stosunkach w obecności Ssa1 (1 μ M) oraz Ydj1 (1 μ M). Wyniki przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym z minimum trzech pomiarów. **B** | Znormalizowana aktywność reaktywacyjna Hsp104 rozcieńzanego buforem wyliczona na podstawie danych zawartych w A.

Załącznik 4



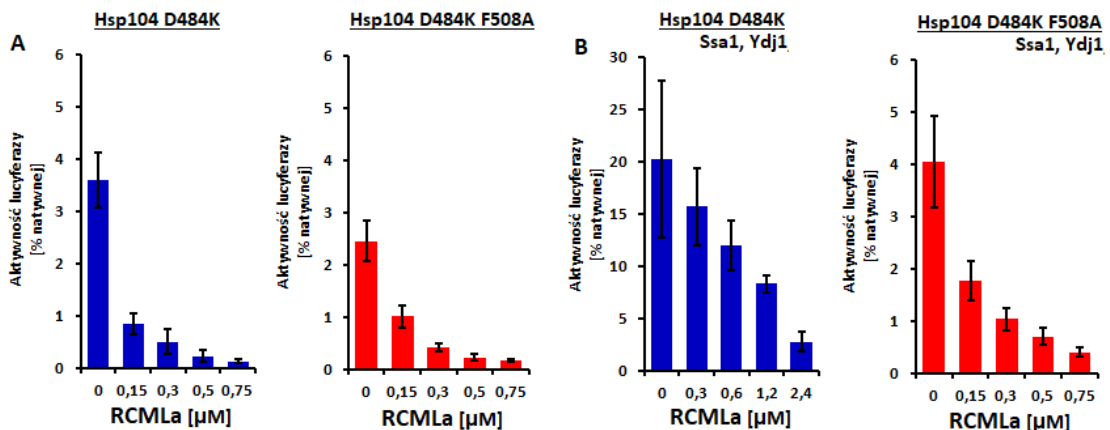
Rycina Z4 | Reaktywacja zagregowanego termicznie GFP w obecności RCMLa. **A** | Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μ M) przez wariant Hsp104 D484K (lewy panel) lub wariant Hsp104 D484K F508A (prawy panel) (0,2 μ M) przy wskazanych stężeniach RCMLa (0-30 μ M). **B** | Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μ M) przez wariant Hsp104 D484K (lewy panel) lub wariant Hsp104 D484K F508A (prawy panel) (0,2 μ M), wraz z Ssa1 (1 μ M) i Ydj1 (0,5 μ M) przy wskazanych stężeniach RCMLa (0-30 μ M).

Załącznik 5



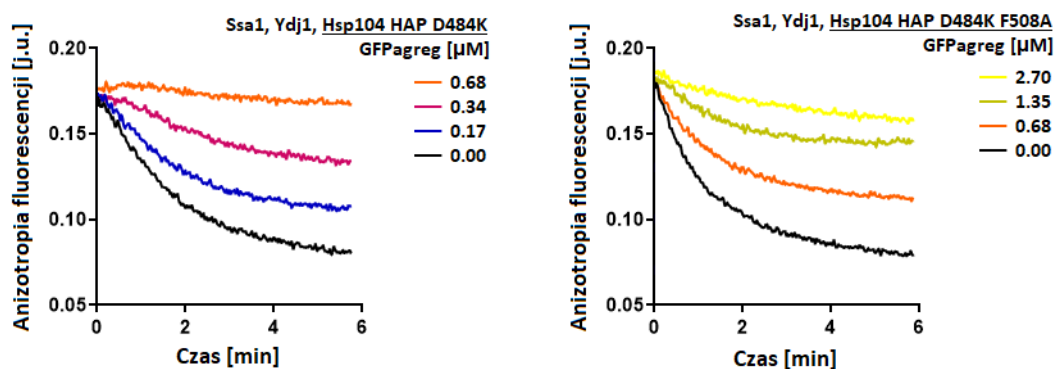
Rycina Z5 | Reaktywacja zagregowanego termicznie GFP w obecności kazeiny. A | Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μM) przez wariant Hsp104 D484K (lewy panel) lub wariant Hsp104 D484K F508A (prawy panel) (0,2 μM) przy wskazanych stężeniach kazeiny (0-80 μM). **B |** Reaktywacja zagregowanego GFP (0,35 μM) przez wariant Hsp104 D484K (lewy panel) lub wariant Hsp104 D484K F508A (prawy panel) (0,2 μM), wraz z Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (0,5 μM) przy wskazanych stężeniach kazeiny (0-80 μM).

Załącznik 6



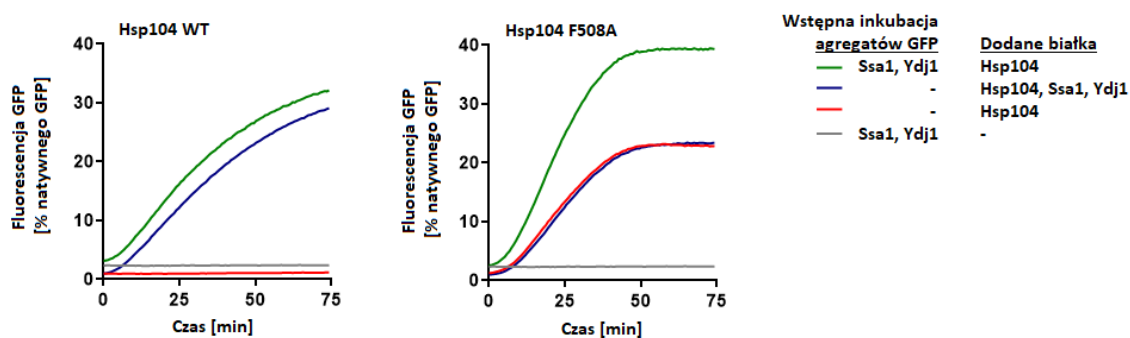
Rycina Z6 | Reaktywacja lucyferazy denaturowanej mocznikiem A | Reaktywacja zagregowanej lucyferazy (0,22 μM) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A (0,25 μM) przy różnych stężeniach RCMLa (0-0,75 μM). **B |** Reaktywacja zagregowanej lucyferazy (0,22 μM) przez wariant Hsp104 D484K lub Hsp104 D484K/F508A (0,25 μM) przy różnych stężeniach RCMLa (0-2,4 μM) w obecności Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (1 μM). Pomiary wykonano po 40 minutach inkubacji. Wykresy przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym.

Załącznik 7



Rycina Z7 | Proteoliza FITC-kazeiny przez ClpP. Proteoliza FITC-kazeiny przez ClpP (0,4 μM) i wariant Hsp104 HAP D484K (lewy panel) lub Hsp104 HAP D484K F508A (0,2 μM) (prawy panel) w obecności Ssa1 (0,5 μM) i Ydj1 (0,5 μM), przy wybranych stężeniach agregatów GFP (0-2,7 μM). Proteolizę mierzono, śledząc zmiany w anizotropii fluorescencji.

Załącznik 8



Rycina Z8 | Wstępna inkubacja zagregowanego GFP z białkami Ssa1 i Ydj1. Agregaty GFP (0,34 μM) wstępnie inkubowano (1 h, 25°C) z białkami Ssa1 (1 μM) i Ydj1 (0,5 μM), następnie mierzono reaktywację tak przygotowanych agregatów GFP przez Hsp104 WT (1 μM) (panel lewy) i Hsp104 F508A (1 μM) (panel prawy). Reakcja została inicjowana przez dodanie białek opiekuńczych tak jak to przedstawiono w legendzie.