



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Aneta Grabińska-Rogala

Oddziaływania systemu Hsp70 z substratem białkowym oraz rola tych oddziaływań w zależnej od proteazy Lon degradacji substratu

The Hsp70 system interactions with substrate protein and
the role of these interactions in Lon-dependent
proteolysis of substrate

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

Promotor: prof. dr hab. Jarosław Marszałek
Promotor pomocniczy: dr hab. Rafał Dutkiewicz, prof. UG
Zakład Biochemii Ewolucyjnej

GDAŃSK 2023

OŚWIADCZENIE

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

.....

data

.....

własnoręczny podpis

Chciałabym serdecznie podziękować:

Profesorowi Jarosławowi Marszałkowi

za możliwość realizacji projektu, za przekazaną wiedzę i umiejętności, cenne uwagi oraz opiekę nad przebiegiem mojej pracy naukowej.

Dr. hab. Rafałowi Dutkiewiczowi, prof. UG

za całą przekazaną wiedzę i umiejętności, wszelką pomoc, cierpliwość i pogodę ducha.

Zespołowi Zakładu Biochemii Ewolucyjnej

za pomoc w realizacji badań i przyjemną atmosferę w pracy,

a w szczególności Milenie Stolarskiej

za przyjaźń i wzajemną motywację.

Rodzicom Mariannie i Eugeniuszowi

dzięki którym miałam możliwość kształcenia się i zdobywania cennej wiedzy.

Pracę dedykuję mojemu Mężowi Andrzejowi

który był nieocenionym wsparciem w najtrudniejszych chwilach.

Badania wykonano w ramach
programu TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej
„Cykl wiązania substratu przez białka opiekuńcze Hsp70/J: molekularne
mechanizmy i funkcjonalne konsekwencje”

nr POIR.04.04.00-00-4114 /17-00



oraz

grantu Narodowego Centrum Nauki - Opus 21

„Wpływ białek opiekuńczych JDP/Hsp70 na konformację i stabilność
sfaldowanego substratu białkowego”

nr UMO-2021/41/B/NZ1/00449



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Spis treści

Streszczenie	7
Summary	8
1. Wstęp	9
1.1. Oddziaływanie Hsp70 z substratem białkowym	9
1.2. Białka pomocnicze JDP	12
1.3. Czynniki wymiany nukleotydu (NEF)	14
1.4. Cykl wiązania substratu białkowego przez system Hsp70 wyspecjalizowany w biogenezie centrów żelazo-siarkowych.....	14
1.4.1. Isu1/IscU	17
1.4.2. Hsc20/HscB.....	18
1.4.3. Ssq1/HscA.....	18
1.5. Funkcja białek opiekuńczych w procesie degradacji białka rusztowania Isu1 przez proteazę Lon (Pim1).....	22
2. Cele pracy	24
3. Materiały	25
3.1 Szczepy bakteryjne.....	25
3.2 Wektory plazmidowe	25
3.3 Białka i ich warianty	28
3.4 Pożywki do hodowli bakteryjnych.....	29
3.5 Złoża chromatograficzne.....	29
4. Metody	29
4.1. Izolacja plazmidowego DNA	29
4.2. Przygotowanie bakteryjnych komórek kompetentnych	29
4.3. Transformacja bakteryjnych komórek kompetentnych.....	30
4.4. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	31
4.5. Oczyszczanie białek	32
4.5.1. Oczyszczanie preparatów Ssq1	32
4.5.2. Oczyszczanie preparatu ^{GST} Ssq1*	33
4.5.3. Oczyszczanie białka Hsc20 oraz Hsc20 ^{LLY}	35
4.5.4. Oczyszczanie białka Hsc20 ^{GST}	36
4.5.5. Oczyszczanie białka Isu1	37
4.5.6. Oczyszczanie białek HscA i HscB	38
4.5.7. Oczyszczanie domeny SBD białka HscA	39
4.5.8. Oczyszczanie białka IscU	40

4.5.9.	Oczyszczanie białka IscU ^{GST}	41
4.6.	Dichroizm kołowy	42
4.7.	Pomiar hydrolizy ATP Hsp70	43
4.8.	Przygotowanie złoza agarozowego do precypitacji kompleksów białkowych.....	44
4.9.	Precypitacja kompleksów białkowych (<i>ang. pulldown</i>).....	44
4.10.	Pomiar interferometrii biowarstwy (BLI)	45
4.11.	Proteoliza bakteryjną proteazą Lon	46
5.	Wyniki	47
5.1.	Wyniki uzyskane przez nasz zespół przed przystąpieniem do badań opisanych w tej rozprawie	47
5.2.	Aktywność ATPazy Ssq1*	49
5.3.	Oddziaływanie Isu1 z kieszenią wiążącą substrat domeny SBDβ Ssq1 jest niezbędne do formowania potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1 ^{GST}	50
5.4.	Precypitacja potrójnego kompleksu z zastosowaniem białek fuzyjnych Hsc20 ^{GST} oraz GSTSsq1*	54
5.5.	Kinetyka formowania kompleksu potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1	59
5.6.	Zaburzenie oddziaływań pomiędzy komponentami hamuje formowanie potrójnego kompleksu	62
5.7.	Nowe oddziaływanie pomiędzy domeną CTD Hsc20 a domeną NBD Ssq1 wpływa na kinetykę i wydajność formowania potrójnego kompleksu.....	65
5.8.	Proteaza Lon degraduje bakteryjne IscU.....	67
5.9.	Białka opiekuńcze HscB/HscA chronią IscU przed proteolizą	70
6.	Dyskusja	79
6.1.	Potrójny kompleks Ssq1(ATP)-Hsc20-Isu1	79
6.2.	Wpływ HscB/HscA na Lon zależną degradację białka rusztowania IscU	81
7.	Bibliografia	83

Streszczenie

Białka Hsp70 współpracujące z białkami posiadającymi domenę J (JDP) to najbardziej rozpowszechnione systemy opiekuńcze zaangażowane w homeostazę białek, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak też w stresie i patologii. Mniej znane są wyspecjalizowane funkcje tych systemów, takie jak udział JDP/Hsp70 w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych (FeS) – kofaktorów niezbędnych dla aktywności wielu białek. Niezależnie od tego czy system JDP/Hsp70 kontroluje proteostazę, czy też uczestniczy w biogenezie FeS, jego funkcja uwarunkowana jest odwracalnym wiązaniem substratu białkowego. Cykl wiązania substratu warunkowany jest przez zmiany konformacji Hsp70 kontrolowane poprzez hydrolizę ATP. ATPaza Hsp70 jest stymulowana allosterycznie poprzez wiązanie domeny J oraz wiązanie substratu. Przy czym domena J i substrat działają synergicznie – łącznie stymulują ATPazę wielokrotnie silniej niż w pojedynkę. Niewiele jednak wiadomo na temat molekularnego mechanizmu przebiegu tego cyklu.

Badania prowadzone przez nasz zespół mają na celu poznanie tego mechanizmu wykorzystując jako model wyspecjalizowane systemy JDP/Hsp70 uczestniczące w biogenezie FeS. Systemy te oddziałują tylko z jednym substratem - białkiem rusztowaniem w obrębie, którego FeS są syntetyzowane i z którego po oddziaływaniu z białkami opiekuńczymi są przekazywane na białka docelowe.

W niniejszej pracy rekonstruowałam biochemicznie potrójny kompleks Hsp70-JDP-substrat stanowiący kluczowy etap cyklu wiązania substratu przez białka opiekuńcze zaangażowane w biogenezę FeS. Wykazałam, stosując techniki precypitacji kompleksów białkowych i interferometrię bio-warstwy (BLI), że formowanie potrójnego kompleksu to proces dwuetapowy: (1) JDP tworzy kompleks z substratem, a następnie (2) rekrutuje Hsp70 poprzez oddziaływania JDP-Hsp70 i substrat-Hsp70. Przy czym zaburzenie każdego z tych oddziaływań uniemożliwia tworzenie kompleksu. Mechanizm wiązania Hsp70 do kompleksu JDP-substrat opisany w tej pracy tłumaczy również synergiczną stymulację aktywności ATPazowej Hsp70 przez JDP i substrat.

Charakteryzowałam również wpływ białek JDP/Hsp70 bakteryjnego systemu biogenezy FeS na degradację białka rusztowania (substratu) przez proteazę Lon. Wykazałam, że podobnie jak ma to miejsce w przypadku białek drożdżowych, wiązanie białek opiekuńczych chroni białko rusztowanie przed proteolizą. Otrzymane wyniki sugerują, że systemy JDP/Hsp70 uczestniczące w biogenezie FeS nie tylko umożliwiają przekazanie FeS z białka rusztowania na białka docelowe, ale również kontrolują poziom białka rusztowania w komórce chroniąc je przed degradacją.

Summary

Hsp70 and its obligatory co-chaperones J-domain proteins (JDP) are the most ubiquitous chaperone systems involved in protein homeostasis, both under physiological conditions and during stress and pathology. Less known, however, are specialized functions of these systems, such as the involvement of JDP/Hsp70 in biogenesis of iron-sulfur clusters (FeS) – cofactors required for activity of many proteins. Regardless of whether the JDP/Hsp70 system controls proteostasis, or is involved in the FeS biogenesis, its function depends on reversible binding of a substrate protein. Substrate binding cycle is driven by conformational changes of Hsp70 controlled by hydrolysis of ATP. The ATPase activity of Hsp70 is allosterically stimulated by binding of J-domain and substrate. The J-domain and substrate function synergistically – together they stimulate the ATPase many fold more efficiently than alone. Little is known however about the molecular mechanisms underlying progression of the substrate binding cycle.

Research conducted by our group aims at revealing these mechanisms using as a model JDP/Hsp70 systems specialized in the FeS biogenesis. These systems interact with only a single substrate – a scaffold protein on which FeS are assembled and from which, upon interaction with chaperones, they are transferred onto target proteins.

In this thesis I described the biochemical reconstruction of a tripartite complex consisting of Hsp70-JDP-substrate, which constitutes a key intermediate in the substrate binding cycle by chaperones involved in the FeS biogenesis. I show, using pull-down and bio-layer interferometry (BLI) assays that formation of this complex is a two-step process: (1) JDP binds substrate and subsequently, (2) JDP-substrate complex recruits Hsp70 via JDP-Hsp70 and substrate-Hsp70 interactions. However, disruption of any of these individual interactions prevents the tripartite complex formation. The mechanism of the Hsp70 binding to the JDP-substrate complex, described in this thesis, can also explain the mechanism behind synergetic activation of the Hsp70's ATPase by the JDP and substrate.

I also characterized the effect of bacterial JDP/Hsp70 system involved in the FeS biogenesis on a Lon protease dependent degradation of a scaffold protein. I show that, like in the yeast system, also in bacteria scaffold protein is proteolyzed by Lon and its degradation is inhibited by interaction with chaperones. The obtained results indicate that JDP/Hsp70 systems functioning in the FeS biogenesis not only facilitate the FeS transfer from the scaffold protein onto the target proteins but also control the cellular level of the scaffold by protecting it against degradation.

1. Wstęp

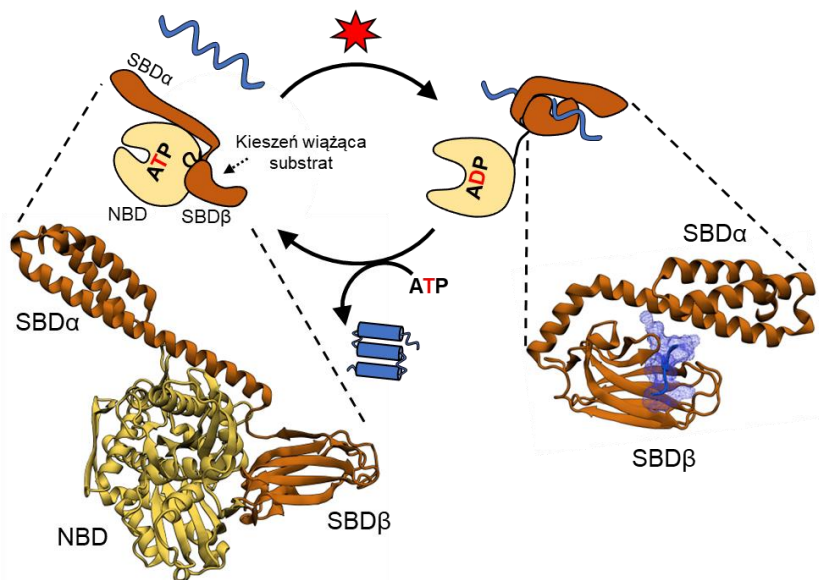
Białka szoku cieplnego (ang. *Heat shock proteins - Hsp*) po raz pierwszy zostały opisane w pracy Ferruccio Ritossy nad muszką owocową *Drosophila melanogaster* w 1962 roku. Ritossa zaobserwował podwyższoną transkrypcję genów kodujących nieznane dotychczas białka po ekspozycji *D. melanogaster* na wysoką temperaturę [1]. Ekspresję białek pod wpływem wysokiej temperatury opisano jako „reakcja szoku cieplnego”, a białka nazwano „białkami szoku cieplnego” (Hsp) [2]. W późniejszych latach odkryto, że ekspresję białek Hsp, indukowaną po ekspozycji na szok termiczny, ale też na inne rodzaje stresu, można wykazać w dowolnym organizmie komórkowym [3]. Jednak białka Hsp odgrywają rolę nie tylko podczas stresu komórkowego, lecz biorą udział w wielu innych procesach zachodzących w warunkach fizjologicznych we wszystkich organizmach [4][5]. Z tego względu nazywane są również „białkami opiekuńczymi” (ang. *molecular chaperones*). Białka Hsp nazywane są zgodnie z ich masą cząsteczkową w kilodaltonach.

Hsp70 są to konserwowane białka o masie wynoszącej około 70 kilodaltonów [6]. Są najbardziej wszechstronnymi białkami opiekuńczymi, oddziałującymi z różnymi substratami białkowymi, pełniąc tym samym istotną rolę w wielu procesach komórkowych [7]. Mechanizm działania białek Hsp70 polega na cyklicznym wiązaniu i uwalnianiu substratu w sposób zależny od związanego nukleotydu adeninowego [8–10]. Jednak działanie tego cyklu we wszystkich funkcjach komórkowych, wymaga współpracy z innymi białkami opiekuńczymi, nazywanymi białkami pomocniczymi (ang. *co-chaperones*) – białkami z domeną J (ang. *J-domain proteins - JDP*) oraz w większości przypadków, czynnikami wymiany nukleotydów (ang. *nucleotide exchange factor - NEF*) [11].

1.1. Oddziaływanie Hsp70 z substratem białkowym

Białka Hsp70 występujące w różnych organizmach wykazują wysokie podobieństwo sekwencji, a także dzielą wspólną aktywność biochemiczną, która warunkuje mechanizm ich działania [12][13]. Ten mechanizm to cykliczne wiązanie i uwalnianie substratu, dzięki zdolności do wiązania i hydrolizy ATP (Ryc. 1).

Strukturę białka Hsp70 tworzą dwie domeny – N-końcowa domena wiążąca nukleotydy oraz C-końcowa domena wiążąca substrat. Domena wiążąca nukleotydy NBD (ang. *Nucleotide Binding Domain*) o masie ok. 45 kDa, składa się z dwóch płatów, które tworzą szczelinę, będącą miejscem wiązania ATP lub ADP. Domena wiążąca substrat SBD (ang. *Substrate Binding Domain*) o masie ok. 25 kDa składa się z dwóch subdomen – SBD β i SBD α . Subdomena SBD β tworzy β -kartkową kieszeń wiążącą krótkie fragmenty łańcuchów polipeptydowych substratu. Kieszeń oddziałuje z fragmentem łańcucha polipeptydowego substratu składającym się z od pięciu do siedmiu aminokwasów. Sekwencje te bogate są w aminokwasy hydrofobowe [14]. Subdomena SBD α tworzy α -helikalne wieczko (ang. *lid*), które zamykając się nad kieszenią SBD β , stabilizuje wiązanie substratu. Domeny są połączone ze sobą za pomocą elastycznego łącznika bogatego w hydrofobowe aminokwasy [15].



Rycina 1. Mechanizm wiązania substratu białkowego przez białka Hsp70.

Białka Hsp70 składają się z dwóch domen: domeny wiążącej nukleotydy NBD (żółta) oraz domeny wiążącej substrat SBD (brązowa). Obie domeny są połączone łącznikiem. Domena SBD składa się z dwóch subdomen: wieczka (SBD α) oraz domeny posiadającej kieszeń wiążącą substrat (SBD β). Hsp70 ze związanym ATP jest w konformacji otwartej. W tej konformacji łącznik jest schowany pomiędzy domeną NBD a SBD. Obie subdomeny SBD α i SBD β są zadokowane na NBD, a kieszeń wiążąca substrat jest otwarta (struktura po lewej, DnaK PDB: 4B9Q [16]). Takie ułożenie subdomen SBD umożliwia szybkie wiązanie i uwalnianie substratu. Stabilizacja oddziaływania Hsp70 z substratem zachodzi dzięki hydrolizie ATP (zaznaczono czerwoną gwiazdką). Oddziaływanie substratu (niebieski) z Hsp70 stymuluje hydrolizę ATP do ADP, powodując zmiany konformacyjne. Domeny NBD i SBD oddalają się od siebie odsłaniając łącznik. Wieczko SBD α zamyka się nad kieszenią SBD β , co stabilizuje oddziaływanie Hsp70 z substratem (struktura po prawej, SBD β DnaK w kompleksie z peptydem NRLLLTG PDB: 1DKZ [17]). Wymiana ADP na ATP, często stymulowana przez NEF, powoduje zmianę

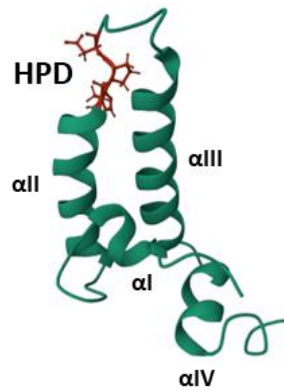
konformacji Hsp70 na otwartą i w efekcie uwolnienie substratu. Białko Hsp70 jest gotowe na wiązanie kolejnego substratu [18][19].

Mechanizm działania białek Hsp70 polega na cyklicznym wiązaniu i uwalnianiu substratu pod wpływem zmian konformacyjnych Hsp70 regulowanych przez wiązanie i hydrolizę ATP. Hsp70 ze związanym ATP jest w konformacji otwartej – domeny NBD i SBD są zakotwiczone względem siebie, a wieczko domeny wiążącej substrat jest otwarte względem kieszeni wiążącej substrat, umożliwiając przyłączenie substratu. Hydroliza ATP skutkuje zmianami konformacyjnymi Hsp70. Domeny NBD i SBD dysocjują względem siebie, a łącznik zmienia lokalizację. Wieczko domeny wiążącej substrat zamyka się nad kieszenią wiążącą substrat stabilizując fragment łańcucha polipeptydowego substratu wewnątrz kieszeni – tworząc konformację zamkniętą białka Hsp70(ADP)[20]. Kompleks Hsp70(ADP)-substrat jest stabilny. Przykładami fragmentów białek, które są rozpoznawane i wiązane w kieszeni substratowej Hsp70 są: peptyd P5 (CALLLSAPRR) [21], motyw LPPVK [22], a także eksponowane hydrofobowe reszty niesfałdowanych białek, które w natywnej konformacji tworzyłyby hydrofobowy rdzeń [14][22].

Następnie czynnik wymiany nukleotydu (NEF) umożliwia wymianę ADP na ATP. Wiązanie NEF do białka Hsp70 wywołuje zmianę konformacyjną domeny NBD, umożliwiając dysocjację ADP z NBD. To sprzyja przyłączeniu kolejnej cząsteczki ATP. Związanie ATP prowadzi do zmiany konformacji Hsp70 na otwartą. Dochodzi do dokowania domen oraz do otwarcia wieczka SBD α i uwolnienia substratu z kieszeni SBD β [23][24]. Ten mechanizm wykorzystywany jest przez białka Hsp70 w takich procesach fizjologicznych jak fałdowanie polipeptydów *de novo*, translokacja białek przez błony, rearanżacja kompleksów białkowych, regulacja aktywności białek oraz ochrona przed proteolizą [10]. W warunkach stresowych Hsp70 biorą udział w zapobieganiu agregacji białek, ponownym fałdowaniu, dezagregacji lub degradacji białek [10][25][26]. Chociaż oddziaływanie substratu z Hsp70 powoduje stymulację aktywności ATPazy, to aktywność ta jest niska i jej efektywna stymulacja wymaga obecności białek pomocniczych - białek z domeną J (JDP) oraz NEF. Białka JDP wiążą substrat niezależnie od Hsp70. Kompleks JDP-substrat oddziałuje z Hsp70 synergicznie stymulując hydrolizę ATP [7][27].

1.2. Białka pomocnicze JDP

Białka JDP tworzą największą i najbardziej zróżnicowaną rodzinę białek opiekuńczych. Białka te zawierają domenę J, która jest konserwowana ewolucyjnie i jest wspólną cechą wszystkich JDP. Składa się z ok. 70 aminokwasów. Tworzą ją cztery α -helisy (nazwane I – IV). Helisy II i III tworzą przeciw równoległe łańcuchy połączone oddziaływaniami hydrofobowymi. Struktura ta jest dodatkowo stabilizowana przez helisy I i IV zlokalizowane na końcach domeny J. Domeny J zawierają charakterystyczny motyw His-Pro-Asp (HPD) na pętli między helisami II i III. Domena J oddziałuje z partnerskim Hsp70 w miejscu oddziaływania obejmującym NBD-linker-SBD β białka Hsp70 [28], a motyw HPD jest odpowiedzialny za stymulację aktywności ATPazowej (Ryc. 2) [29][30][12].

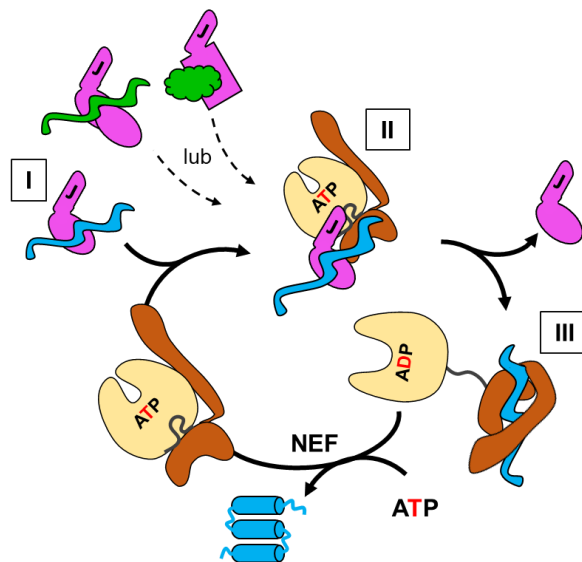


Rycina 2. Struktura domeny J.

Struktura domeny J białka DnaJ z *Escherichia coli* (PDB: 1XBL) zawierająca 4 helisy (helisa I; helisa II; helisa III; helisa IV) oraz motyw HPD (zaznaczony na czerwono) znajdujący się na pętli między helisą II a III.

Zdolność Hsp70 do funkcjonowania w wielu różnorodnych procesach komórkowych wynika z oddziaływania z białkami JDP. Liczba białek JDP często przewyższa liczbę Hsp70 w poszczególnych przedziałach komórkowych. Na przykład u ssaków występuje jedno białko Hsp70 w mitochondriach i jedno w retikulum endoplazmatycznym, które współdziałają odpowiednio z czterema i sześcioma białkami JDP [11]. U ludzi występuje 11 Hsp70 i 13 NEF, ale za to aż 41 białek JDP [11]. Ponadto, w przeciwieństwie do Hsp70, białka JDP wykazują duży stopień zróżnicowania sekwencji i struktury, co jest zgodne z hipotezą, że JDP warunkują wielofunkcyjność systemów Hsp70, poprzez dostarczanie specyficznych substratów białkowych [11] [31] [32].

Główną funkcją białek JDP w mechanizmie działania systemów Hsp70 jest rozpoznanie i dostarczenie substratu do Hsp70 (Ryc. 3). W pierwszej kolejności tworzy się kompleks JDP-substrat (Ryc. 3 I). Wiele takich kompleksów jest dobrze poznanych i scharakteryzowanych, na przykład białko JDP auksylina, która oddziałuje z pęcherzykami klatrynowymi umożliwiając przyłączenie Hsp70 i w konsekwencji uwolnienie zawartości pęcherzyków [33]. Następnie substrat jest przekazywany do Hsp70-ATP (konformacja otwarta). Tworzy się przejściowy kompleks potrójny Hsp70(ATP)-JDP-substrat (Ryc. 3 II). Ten etap cyklu wiązania substratu przez Hsp70 nie jest dotychczas dobrze scharakteryzowany. Krótki czas życia tego kompleksu jest wynikiem jednoczesnego oddziaływania domeny J oraz substratu z Hsp70, co skutkuje synergiczną stymulacją hydrolizy ATP, która prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie Hsp70. Domeny NBD i SBD dysocjują, a łącznik zmienia lokalizację. Te zmiany konformacyjne wpływają na zmianę miejsca oddziaływania JDP z Hsp70, powodując uwolnienie JDP z potrójnego kompleksu. Wiczeko domeny wiążącej substrat białka Hsp70 zamyka się nad kieszenią wiążącą substrat stabilizując fragment polipeptydu wewnątrz kieszeni – powstaje stabilny kompleks Hsp70(ADP)-substrat (Ryc. 3 III). Przykładem takiego kompleksu jest struktura krystalograficzna domeny wiążącej substrat bakteryjnego białka Hsp70 – DnaK z peptydem NRLLLTG (Ryc.1) [17].



Rycina 3. Rola JDP w cyklu wiązania substratu przez partnerskie Hsp70.

Białka JDP rozpoznają i wiążą substraty w zależności od swojej domeny wiążącej substrat (przykładowe substraty zaznaczono kolorem zielonym). (I) kompleks JDP-substrat wchodzi w interakcję z Hsp70 związanym z ATP (konformacja otwarta), tworząc przejściowy kompleks trzech białek Hsp70(ATP)-JDP-substrat (II), w obrębie, którego dochodzi do stymulacji hydrolizy

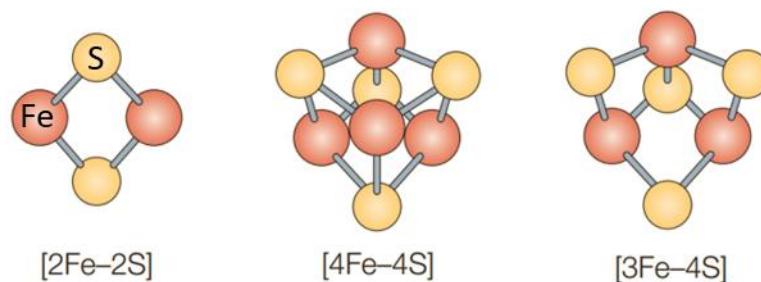
ATP i zmian konformacyjnych Hsp70 prowadzących do uwolnienia JDP z kompleksu. Tworzy się stabilny kompleks Hsp70(ADP)-substrat (III) - substrat zostaje „uwięziony” w kieszeni wiążącej substrat SBD β poprzez zamknięcie wieczka (SBD α). Następnie dochodzi do wymiany ADP na ATP, często przy udziale czynnika wymiany nukleotydów (NEF), przywracając Hsp70 do stanu związanego z ATP i powodując uwolnienie sfałdowanego substratu [18] [34].

1.3. Czynniki wymiany nukleotydu (NEF)

Zarówno wiązanie, jak i uwalnianie substratu przez Hsp70 wynika ze zmian konformacyjnych w obrębie Hsp70, wynikających z obecności ATP lub ADP. Funkcjonowanie domeny wiążącej nukleotyd Hsp70 obejmuje oddziaływanie z białkami pomocniczymi, którymi są czynniki wymiany nukleotydów. Białka NEF asystują w wymianie cząsteczki ADP na ATP w obrębie NBD białka Hsp70, poprzez destabilizację wiązania ADP co prowadzi do jego uwolnienia. Następnie Hsp70 może wiązać kolejną cząsteczkę nukleotydu, którą jest najczęściej ATP, ze względu na jego wysokie stężenie w komórce. Wynikiem tego jest zmiana konformacji Hsp70 na otwartą i jednoczesne uwolnienie substratu z kieszeni wiążącej substrat domeny SBD [35]. Pomimo wspólnej funkcji, jaką jest asystowanie w wymianie nukleotydu przez białka Hsp70, białka NEF należą do białek charakteryzujących się różnym pochodzeniem ewolucyjnym, strukturą, a także mechanizmem oddziaływania z Hsp70 [35][36].

1.4. Cykl wiązania substratu białkowego przez system Hsp70 wyspecjalizowany w biogenezie centrów żelazo-siarkowych

Przykładem systemu JDP/Hsp70, którego funkcja opiera się na cyklicznym oddziaływaniu z substratem białkowym, jest system uczestniczący w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych (FeS). Centra FeS są jedną z najstarszych i najpowszechniej występujących grup prostetycznych. Występują zarówno w białkach bakteryjnych, jak i eukariotycznych [38]. Zbudowane są z atomów żelaza i siarki i mogą występować w różnych formach. Najprostsza i najczęściej spotykana jest forma romboidalna [2Fe-2S], która składa się z dwóch atomów żelaza i dwóch atomów siarki. Drugą najczęściej spotykaną konformacją jest forma kubiczna [4Fe-4S], która składa się z czterech atomów żelaza i czterech atomów siarki (Ryc. 4). Jony żelaza w centrum są zazwyczaj koordynowane przez siarkę związaną z resztami cysteinowymi [39].



Rycina 4. Schematy najpowszechniej występujących centrów żelazo-siarkowych [40].

Centra żelazo-siarkowe są grupami prostetycznymi niezbędnymi do aktywności wielu białek [41][42]. Ma to związek z ich zdolnością transferu elektronów ze względu na zróżnicowany potencjał oksydacyjno-redukcyjny [43]. W zależności od aminokwasów znajdujących się w środowisku centrum, może ono przyjmować wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w zakresie od -700 mV do +300 mV, co czyni centra FeS doskonałymi akceptorami i donorami elektronów [44]. Oprócz transferu elektronów, do funkcji centrów FeS należy także katalizowanie reakcji enzymatycznych. Przykładem jest akonitaza zawierająca centrum FeS w konformacji [4Fe-4S] biorąca udział w pierwszym etapie cyklu Krebsa [45].

We wszystkich komórkach biogeneza centrów FeS jest procesem przebiegającym *de novo*. W procesie biogenezy FeS zaangażowanych jest kilka złożonych systemów biologicznych. Bez względu na rodzaj systemu, w każdym z nich występuje białko rusztowanie molekularne, w obrębie którego centrum jest syntetyzowane. W pierwszej kolejności dostarczany jest jon żelaza, lecz jego źródło nadal nie jest znane. Na następnym etapie syntezy FeS desulfuraza cysteinowa uwalnia siarkę z cysteiny wytwarzając alaninę. Aby zredukować siarkę w cysteinie do siarczku (S^{2-}) obecnego w centrach FeS do reakcji dostarczane są elektrony przez odpowiednie komponenty w zależności od systemu biogenezy FeS. Powstały nadsiarczek jest przenoszony do białka rusztowania. Na kolejnym etapie zsyntezowane centrum jest przenoszone na białko akceptorowe, wymagające obecności centrum do aktywności biologicznej [46].

Rozróżnia się cztery systemy biorące udział w biogenezie centrów FeS. Pierwszym odkrytym był system NIF (ang. *Nitrogen Fixation*). Jest to bakteryjny system uczestniczący w syntezie centrów FeS, które są transportowane na enzym nitrogenazę, odpowiedzialny za asymilację azotu atmosferycznego [47][48]. Drugim systemem jest SUF (ang. *Sulfur Formation*), który działa głównie w warunkach stresowych, takich jak

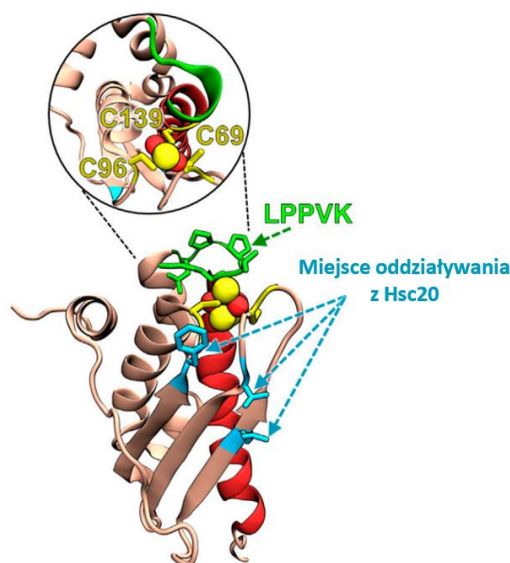
np. stres oksydacyjny czy niedobór żelaza [49]. Trzecim systemem jest ISC (ang. *Iron-Sulfur Cluster assembly*). U wielu bakterii, w tym u *Escherichia coli*, system ISC jest podstawowym systemem odpowiedzialnym za biogenezę centrów FeS [50]. Homologiczne do bakteryjnych systemy ISC i SUF są obecne także, odpowiednio w mitochondriach i chloroplastach komórek eukariotycznych [51][52]. W komórkach tych dodatkowo funkcjonuje system CIA (ang. *Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly*), który jest odpowiedzialny za biogenezę centrów FeS białek cytoplazmatycznych i jądrowych. Funkcjonowanie systemu CIA jest powiązane z mitochondrialnym systemem ISC – źródłem siarki w systemie CIA jest system ISC [52]. To czyni system ISC podstawowym systemem biogenezy centrów FeS w komórkach eukariotycznych.

Proces biogenezy centrów FeS w systemie ISC można podzielić na dwa etapy. Pierwszym jest synteza centrów FeS, a drugim transfer centrów do białek docelowych. W obu etapach biorą udział dedykowane maszynie białkowe. Podczas pierwszego etapu centra są syntetyzowane na białku rusztowaniu IscU w bakteriiach *E. coli* lub ortologicznych białkach Isu1 oraz Isu2 w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Białka Isu1 i Isu2 są paralogami powstałymi w wyniku duplikacji genomu przodka tych drożdży. Sekwencje aminokwasowe obu białek są w 80% identyczne, jednak w komórkach drożdżowych białko Isu1 występuje w wyższym stężeniu [53][54].

Pierwszy etap biogenezy zapoczątkowuje związanie białka rusztowania przez desulfurazę cysteinową w systemie bakteryjnym, zaś w przypadku systemu eukariotycznego – przez kompleks desulfurazy cysteinowej z białkami Isd11 i ACP [55]. W bakteryjnym i eukariotycznym systemie ISC jon żelaza jest dostarczany na białko rusztowanie jako pierwszy, jednak jego źródło jest nadal nieznanne. W następnej kolejności jest dostarczana siarka przez desulfurazę cysteinową. Uwolnienie siarki, jest regulowane przez białko frataksynę, a elektrony niezbędne do redukcji siarki są dostarczane przez ferredoksynę i NADPH [56]. Podczas drugiego etapu biogenezy następuje transfer centrum FeS do białek docelowych. Na tym etapie białko rusztowanie jest substratem białkowym dla systemu białek opiekuńczych JDP/Hsp70.

1.4.1. Isu1/IscU

Drożdżowe białko Isu1 lub bakteryjne IscU pełnią rolę molekularnego rusztowania w obrębie, którego centra FeS są syntetyzowane i z którego przenoszone są na białka docelowe. To małe, jedno domenowe białka, które w przypadku oddziaływania z białkami systemu JDP/Hsp70 są substratami białkowymi. Zbudowane są z pięciu α -helis oraz z trzech β -kartek. Centrum FeS jest koordynowane przez trzy reszty cysteinowe znajdujące się na α -helisach. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że centrum jest koordynowane także przez histydynę [57]. W obrębie β -kartek znajdują się trzy hydrofobowe reszty aminokwasowe niezbędne dla wiązania Hsc20/HscB: L63, V72, F94 (LVF) w Isu1 [58] lub M31, V40, Y61 (MVY) w IscU [59]. Przed C-końcową helisą V znajduje się pętla zawierająca konserwowany motyw Leu, Pro, Pro, Val, Lys (LPPVK), który jest peptydem rozpoznawanym przez domenę wiążącą substrat Hsp70 (Ryc. 5) [18][60].

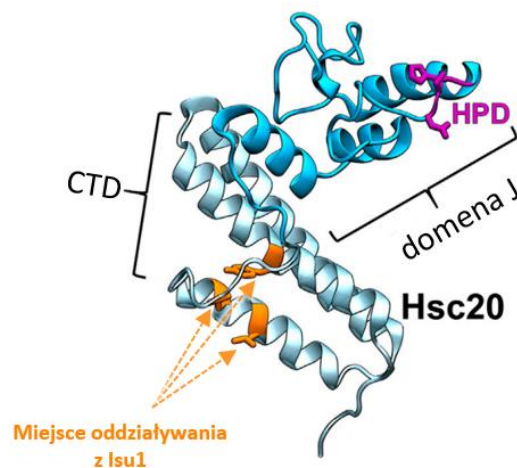


Rycina 5. Model strukturalny białka Isu1.

Model homologiczny białka Isu1 *S. cerevisiae* ze związanym centrum FeS (w oparciu o strukturę krystaliczną IscU związanego z centrum FeS z *Aquifex aeolicus*, PDB: 2Z7E). Wyróżniona powyżej w kółku struktura jest przechylona o 90°, w celu pokazania trzech reszt cysteinowych (zaznaczone na żółto), które koordynują centrum FeS (żółte/czerwone kulki). Sekwencja LPPVK (zielona) zlokalizowana na pętli przed C-końcową helisą V (czerwona) jest miejscem wiązania Hsp70. Na niebiesko zaznaczono reszty aminokwasowe zaangażowane w oddziaływanie Isu1 z Hsc20. Na podstawie [18].

1.4.2. Hsc20/HscB

Białko rusztowanie w kompleksie z FeS jest rozpoznawane przez białka JDP – drożdżowe Hsc20 lub bakteryjne HscB. Są to białka o masie cząsteczkowej wynoszącej około 20 kDa, składające się z C-końcowej domeny wiążącej białko rusztowanie (CTD), która obejmuje ewolucyjnie konserwowane hydrofobowe reszty L105, L109, Y163 (LLY) w białku Hsc20 [61] lub L92, M93, F153 (LMF) w białku HscB [62]. Te reszty są eksponowane na powierzchni i stanowią miejsce wiązania białka rusztowania. Na N-końcu białka Hsc20 i HscB posiadają domenę J z motywem HPD. Funkcją tej domeny jest stymulacja aktywności ATPazy partnerskiego Hsp70. Domena J i domena CTD tworzą sztywną strukturę w kształcie litery L (Ryc. 6) [61].



Rycina 6. Struktura białka JDP Hsc20.

Struktura krystalograficzna Hsc20 *S. cerevisiae* (PDB: 3UO2 i 3UO3). Hsc20 składa się z N-końcowej domeny J (niebieska) z motywem HPD (fioletowy) i C-końcowej domeny wiążącej Isu1, CTD (błękitna), która oddziałuje z Isu1/Isu2 poprzez trzy konserwowane, hydrofobowe reszty aminokwasowe LLY (pomarańczowe) [18].

1.4.3. Ssq1/HscA

Podczas gdy, mitochondrialne białka JDP(Hsc20) i Isu1 są potomkami odpowiednio bakteryjnego JDP(HscB) i IscU, białka Hsp70 wyspecjalizowane w biogenezie centrów FeS u bakterii i drożdży różnią się pochodzeniem ewolucyjnym. U *E. coli*, podobnie jak u innych bakterii, wyspecjalizowane w biogenezie FeS białko Hsp70 (HscA) ma unikatowe właściwości biochemiczne. Wiąże tylko jeden substrat białkowy – IscU [63], a jego cykl wiązania/uwalniania substratu nie wymaga udziału NEF [64]. HscA współpracuje tylko z jednym białkiem JDP – HscB [65][66][67]. W procesie

ewolucji mitochondriów bakteryjne HscA zostało utracone, a jego rolę w biogenezie FeS przejęło białko Hsp70 pochodzące od bakteryjnego wielofunkcyjnego Hsp70 - DnaK. Oznacza to, że w mitochondriach większości organizmów, w tym człowieka, nie występuje Hsp70 wyspecjalizowane w biogenezie FeS. Zamiast tego, Hsc20 dostarcza Isu1 z centrum FeS do wielofunkcyjnego mitochondrialnego Hsp70 (mtHsp70), które uczestniczy także w innych procesach, takich jak fałdowanie białek *de novo*, czy transport białek przez błony mitochondrialne. Tymczasem w mitochondriach drożdży *S. cerevisiae* i w blisko spokrewnionych z nimi gatunkach w biogenezie FeS uczestniczy wyspecjalizowane Hsp70, które powstało w wyniku duplikacji mtHsp70. Do duplikacji tej doszło u wspólnego przodka *S. cerevisiae* i *Candida albicans* ok. 300 mln lat temu [22]. Jedno ze zduplikowanych białek (Ssc1) pozostało wielofunkcyjne, podczas gdy drugie - Ssq1 uległo specjalizacji. Utraciło zdolność współpracy z innymi niż Hsc20 białkami JDP oraz z innymi niż Isu1 substratami białkowymi [22][68][69].

Oznacza to, że Ssq1 i HscA, mimo różnego pochodzenia ewolucyjnego, posiadają podobne właściwości biochemiczne oraz wspólną wyspecjalizowaną funkcję. Należy też podkreślić rolę białka JDP w obu systemach jako czynnika warunkującego specyficzną funkcjonalną partnerskiego Hsp70 [22][70]. W ramach projektu doktorskiego prowadziłam prace zarówno z użyciem białek drożdżowego systemu mitochondrialnego jak też systemu bakteryjnego.

Wspólną cechą HscA i Ssq1 jest mechanizm uwolnienia białkowego substratu, który jest uwarunkowany zmianami konformacyjnymi SBD na skutek wymiany ADP na ATP (Ryc. 7). Jednak różnicą między HscA a Ssq1 jest mechanizm tej wymiany. Ssq1 wymaga interakcji z czynnikiem wymiany nukleotydu – białkiem Mge1 – które stymuluje uwolnienie ADP z NBD, dzięki czemu Ssq1 może związać kolejną cząsteczkę ATP co powoduje zmianę konformacji SBD [71]. W przypadku bakteryjnego HscA wymiana nukleotydu zachodzi spontanicznie bez udziału czynnika wymiany nukleotydu [72][73].

Transfer centrum FeS na białka docelowe rozpoczyna się od powstania kompleksu JDP-białko rusztowanie ze związanym FeS (Ryc. 7). Następnie kompleks ten rekrutuje białko Hsp70 w konformacji otwartej to znaczy ze związanym ATP. Tworzy się przejściowy kompleks trzech białek Hsp70(ATP)-JDP-substrat, w którym występują trzy oddziaływania białko-białko. Pierwszym jest oddziaływanie JDP (Hsc20/HscB) z białkiem rusztowaniem (Isu1/IscU) odpowiednio w przypadku mitochondriów drożdży

i bakterii. W oddziaływaniu tym uczestniczą reszty LLY/LMF po stronie domeny CTD Hsc20/HscB [61][62] i reszty LVF/MVY po stronie Isu1/IscU [58][59]. Drugie oddziaływanie zachodzi pomiędzy domeną J Hsc20/HscB a partnerskim Hsp70, odpowiednio Ssq1 i HscA. Po stronie domeny J uczestniczy konserwowany ewolucyjnie motyw HPD oraz dodatkowo naładowane reszty znajdujące się na helisie II domeny J. Po stronie Hsp70 miejsce wiązania obejmuje region oddziaływania domeny NBD i SBD β oraz międzydomenowy łącznik [28]. W oddziaływaniu tym uczestniczą ujemnie naładowane reszty znajdujące się w tym regionie. Przykładowo dla Ssq1 są to D246, E248, D249 i E253 [74]. Trzecie oddziaływanie ma miejsce w obrębie kieszeni wiążącej substrat domeny SBD β Hsp70, zarówno w przypadku Ssq1 jak też HscA konserwowana ewolucyjnie sekwencja LPPVK Isu1/IscU oddziałuje z tą kieszenią [75][76].

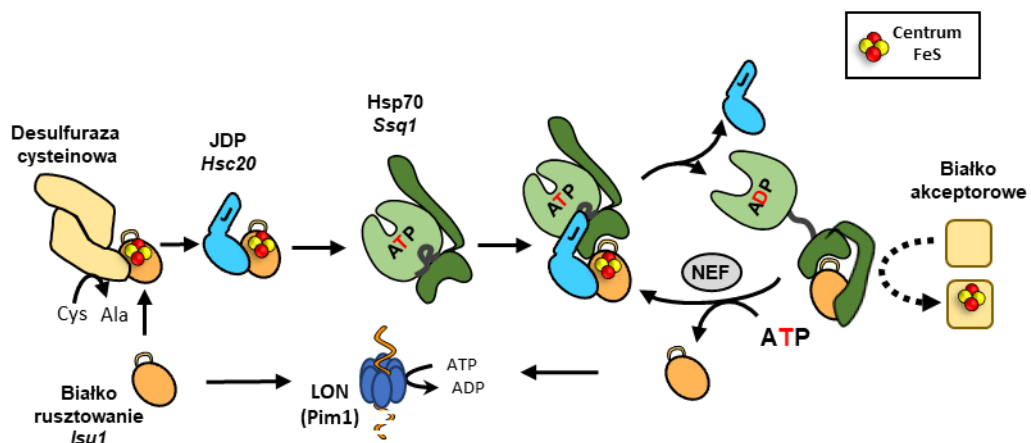
Podobnie jak w innych systemach Hsp70 wiązanie kompleksu JDP-substrat do Hsp70(ATP) stymuluje aktywność ATPazy. Hydroliza ATP do ADP warunkuje zmianę konformacji Hsp70, co skutkuje odłączeniem JDP i stabilizacją kompleksu Hsp70-substrat [13]. W przypadku Isu1/IscU jest to oddziaływanie LPPVK z kieszenią wiążącą substrat [76][77]. Wyniki badań, zarówno biochemicznych jak też genetycznych, sugerują, że tworzenie tego kompleksu Hsp70-Isu1/IscU jest niezbędne dla transferu FeS na białko docelowe [18]. Przypuszcza się, że wskutek oddziaływania Hsp70 z Isu1/IscU dochodzi do zmian konformacyjnych w obrębie białka rusztowania co mogłoby ułatwić transfer centrum na białka docelowe [78]. Jednak molekularny mechanizm tego procesu nie został dotychczas poznany.

Dodatkowym czynnikiem, mogącym mieć wpływ na efektywny transfer centrów FeS z Isu1 na białka docelowe, może być bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy Ssq1 a glutaredoksyną monotiolową 5 - Grx5 [79]. Wykazano wiązanie Grx5 zarówno do Ssq1 w konformacji ATP, jak i ADP. Jednak to konformacja ADP jest preferowana przez Grx5, czyli konformacja, w której Ssq1 jest związane z Isu1. Wiadomo, że Grx5 uczestniczy w przekazywaniu centrów FeS na białka docelowe [80]. Bezpośrednie oddziaływanie Grx5 z Hsp70-ADP mogłoby ułatwić ten proces. Nie wiadomo jednak, czy inne białka Hsp70 zaangażowane w biogenezę FeS (HscA/mtHsp70) również bezpośrednio oddziałują z Grx5 [81].

Cykl wiązania białka rusztowania przez Hsp70 zaangażowane w proces biogenezy FeS kończy się wymianą ADP na ATP. W przypadku bakteryjnego HscA wymiana

zachodzi spontanicznie, bez udziału dodatkowych czynników [64], zaś w przypadku mtHsp70 oraz Ssq1 uwolnienie ADP z NBD wymaga udziału czynnika wymiany nukleotydu – Mge1 [71]. Uwolnienie ADP umożliwia związanie kolejnej cząsteczki ATP co skutkuje zmianą konformacji Hsp70, otwarciem wieczka i uwolnieniem Isu1/IscU. Białko Hsp70 w konformacji otwartej może wiązać kolejną cząsteczkę Isu1/IscU w kompleksie z FeS [71].

Mimo scharakteryzowania większości oddziaływań białko-białko zachodzących podczas cyklu wiązania białka rusztowania przez białka Hsp70 uczestniczące w procesie biogenezy centrów FeS, zarówno w systemie drożdżowym jak też bakteryjnym, nadal nie wiemy, jak te oddziaływania przekładają się na mechanizm transferu FeS z białka rusztowania na białka docelowe. Nie wiemy, jak białko rusztowanie uwalniane jest z kompleksu desulfurazy cysteinowej po syntezie FeS oraz czy system JDP/Hsp70 uczestniczy w tym procesie. Nie wiemy, czy obecności centrów FeS na Isu1/IscU wpływa na powinowactwo Hsc20/HscB do tych białek. Nie wiemy również, w jaki sposób kompleks JDP-białko rusztowanie rekrutuje partnerskie Hsp70(ATP) oraz jaki mechanizm umożliwia uwolnienie Hsc20/HscB po hydrolizie ATP przez Hsp70. Nie znamy mechanizmu przekazywania centrów FeS z białka rusztowania na białka docelowe.



Rycina 7. Schemat cyklu wiązania i uwalniania substratu przez system Hsc20/Ssq1 w procesie biogenezy centrów FeS.

Centrum FeS syntetyzowane jest w obrębie białka rusztowania Isu1 przez kompleks desulfurazy cysteinowej. Następnie białko Hsc20 wiąże Isu1 tworząc kompleks Hsc20-Isu1. Kompleks ten oddziałuje z Hsp70(ATP) tworząc nietrwały potrójny kompleks Hsp70(ATP)-Hsc20-Isu1. Domena J białka Hsc20 oraz Isu1 stymulują aktywność ATPazową białka Ssq1. Hydroliza ATP prowadzi do zmiany konformacji Ssq1 z otwartej na zamkniętą. Skutkiem tego jest uwolnienie Hsc20 z kompleksu i utworzenie kompleksu Ssq1-Isu1. Utworzenie tego kompleksu jest wymagane do transferu centrum FeS do białka docelowego. Następnie dochodzi do wymiany ADP, dzięki NEF (Mge1). Ssq1 może wiązać kolejną cząsteczkę ATP, co prowadzi do zmiany

konformacji na otwartą i uwolnienie Isu1 z kompleksu. Prawidłowe funkcjonowanie tego cyklu jest niezbędne dla transferu FeS, jednak molekularny mechanizm tego transferu nie został dotychczas poznany. W mitochondriach drożdży Isu1 ma krótki czas półtrwania warunkowany degradacją tego białka zależną od proteazy LON(Pim1). Oddziaływanie Isu1 z desulfurazą cysteinową oraz Hsc20 hamuje jego degradację. Nie wiadomo, czy degradacja białka rusztowania IscU przez LON oraz ochrona przed degradacją przez HscB oraz desulfurazę cysteinową IscS ma miejsce również u bakterii.

1.5. Funkcja białek opiekuńczych w procesie degradacji białka rusztowania Isu1 przez proteazę Lon (Pim1)

W komórkach *S. cerevisiae* białko Isu1 ma krótki okres półtrwania wynoszący około 30 minut [82]. Jednak w szczepach z delecją mitochondrialnej proteazy Pim1, będącej ortologiem bakteryjnej proteazy Lon, poziom białka Isu1 jest stabilny [83]. Sugeruje to, że białko Isu1 jest substratem dla proteazy Pim1 oraz że proteoliza wpływa na poziom Isu1 w komórkach drożdżowych [82][83]. Wiadomo również, że delecja proteazy Pim1 nie wpływa na poziom innych białek uczestniczących w biogenezie centrów FeS [83]. Co więcej wykazano, iż poziom białka Isu1 jest wielokrotnie wyższy w szczepach z delecją białka Ssq1 oraz zawierających wariant białka Hsc20 o zaburzonym oddziaływaniu z Isu1 [83]. Uzyskane wyniki sugerują, że zaburzenie oddziaływania białka Isu1 z białkami opiekuńczymi na każdym etapie wiązania przez białka opiekuńcze systemu Hsc20/Ssq1, skutkuje akumulacją Isu1. Zaś gdy cykl wiązania substratu przez Hsc20/Ssq1 zachodzi poprawnie, uwolnione na końcu cyklu Isu1 jest degradowane przez proteazę [82].

Badania na oczyszczonych białkach mitochondrialnych pokazały, że Isu1 jest degradowane przez ludzką mitochondrialną proteazę LON oraz że degradacja nie zachodzi przy braku ATP zgodnie z mechanizmem działania tej proteazy. W badaniach zastosowano ludzką proteazę LON, ponieważ drożdżowa proteaza Pim1 jest trudna do oczyszczenia w natywnej formie - jest podatna na samodegradację i traci aktywność *in vitro* [84]. Wykazano, że w warunkach *in vitro* Isu1 jest efektywnie degradowane, zaś jego degradacja jest hamowana w obecności nadmiaru Hsc20, zaś w obecności desulfurazy cysteinowej Nfs1 degradacja Isu1 przez LON hamowana jest w ponad 90% [85]. W doświadczeniach kontrolnych z wykorzystaniem wariantów Hsc20 i Nfs1 defektywnych w oddziaływaniu z Isu1 wykazano brak ochrony przed proteolizą.

Chociaż oddziaływanie Isu1 z Hsc20 zmniejsza degradację Isu1, ta ochrona przed proteolizą Isu1 jest mniej skuteczna niż ochrona przez oddziaływanie z desulfurazą cysteinową. Ponieważ podczas biogenezy centrów FeS, Hsc20 oddziałuje z Isu1 w kompleksie z FeS, doświadczenia ochrony przed proteolizą w obecności Hsc20 prowadzono w obecności jonów cynku, których wiązanie do Isu1 naśladuje wiązanie FeS [86]. W tych warunkach obserwowana jest wydajniejsza ochrona przed proteolizą. Należy nadmienić, że centra FeS są wrażliwe na obecność tlenu i ich synteza wymaga warunków beztlenowych. Ponadto w przypadku Isu1 nie udało się dotychczas uzyskać stabilnego kompleksu Isu1-FeS *in vitro* nawet w warunkach beztlenowych. Fakt ten utrudnia badania mechanizmu transferu centrów FeS z białka rusztowania na białka docelowe, poznanie roli białek systemu Hsc20/Ssq1 w tym procesie oraz roli białek opiekuńczych w ochronie przed proteolizą.

Powyższe wyniki pokazują wpływ maszynerii białkowej biorącej udział w biogenezie centrów FeS na proces degradacji białka rusztowania (Isu1) przez mitochondrialną proteazę LON/Pim1. Wyniki badań *in vivo* pokazują, że poziom Isu1 w komórce ma znaczenie fizjologiczne zarówno w warunkach fizjologicznych jak też w czasie stresu oksydacyjnego czy też przy braku żelaza w pożywce [85]. Nie wiadomo jednak, czy kontrola poziomu Isu1 przez proteazę LON/Pim1 to zjawisko występujące jedynie w mitochondriach drożdży czy też występuje ono również u bakterii oraz w mitochondriach innych komórek eukariotycznych.

2. Cele pracy

Wyniki uzyskane przez nasz zespół pokazały, że możliwa jest biochemiczna rekonstrukcja potrójnego kompleksu Ssq1(ATP)-Hsc20-Isu1^{GST} oraz że zaburzenie poszczególnych oddziaływań pomiędzy białkami hamuje jego powstanie. Kilka kluczowych pytań pozostało jednak bez odpowiedzi:

1. Czy kieszeń wiążąca substrat domeny SBD β Ssq1 jest niezbędna do tworzenia kompleksu?

2. Czy możliwa jest precypitacja kompleksu stosując białka fuzyjne Hsc20^{GST} oraz GSTSsq1?

Ponieważ rekonstrukcja potrójnego kompleksu opierała się o równowagową metodę precypitacji kompleksów białkowych, pojawiło się pytanie o kinetykę jego formowania. Jak szybko kompleks powstaje oraz czy zgodnie z przewidywaniami jest to proces dwufazowy: (i) tworzenie kompleksu Hsc20-Isu (ii) rekrutacja Hsp70 przez ten kompleks.

3. Zbadanie kinetyki formowania kompleksu Ssq1(ATP)-Hsc20-Isu1^{GST} stosując technikę interferometrii bio-warstwy (ang. bio-layer interferometry- BLI)

4. Czy mutanty zaburzające poszczególne oddziaływania pomiędzy komponentami kompleksu wpływają na kinetykę i wydajność jego formowania?

5. Czy nowo odkryte oddziaływanie pomiędzy domeną CTD Hsc20, a domeną NBD Ssq1 wpływa na kinetykę i wydajność formowania potrójnego kompleksu?

Dotychczasowe badania naszego zespołu pokazały rolę proteazy LON/Pim1 w degradacji Isu1 oraz rolę Hsc20 w ochronie Isu1 przed proteolizą. Pojawiło się pytanie czy podobne zjawisko ma miejsce w przypadku systemu bakteryjnego.

6. Czy bakteryjna proteaza Lon degraduje białko rusztowanie IscU?

7. Czy białka opiekuńcze JDP(HscB)/ Hsp70(HscA) chronią IscU przed degradacją?

3. Materiały

3.1. Szczepy bakteryjne

Escherichia coli DH5 α : *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Escherichia coli BL21(DE3): *F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3)*

Escherichia coli BL21-CodonPlus(DE3): *F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3)*

Escherichia coli C41(DE3): *hsdS gal (λ CIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*

3.2. Wektory plazmidowe

Wektory plazmidowe zostały przygotowane przez dr Brendę Schilke z współpracującego zespołu prof. Elizabeth Craig z Uniwersytetu w Wisconsin-Madison, USA. Plazmidy do ekspresji białek bakteryjnych zostały udostępnione przez prof. Johna Markleya z Uniwersytetu w Wisconsin-Madison, USA.

Plazmidy kodujące Ssq1 i warianty

Sekwencja kodująca białko Ssq1 (reszty od 16 do 657 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' lub sekwencją kodującą GST na końcu 5' oraz białko Hep1 zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pRSF Duet1.

pRSFDuet1- SSQ1His/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *SSQ1* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje Ssq1.

pRSFDuet1- SSQ1^{T239A}His/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *ssq1*^{T239A} z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje Ssq1^{T239A}.

pRSFDuet1- SSQ1^{F462S}His/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *ssq1*^{F462S} z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje Ssq1^{F462S}.

pRSFDuet1- SSQ1^{T239A, F462S}His/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *ssq1*^{T239A, F462S} z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje Ssq1^{T239A, F462S}.

pRSFDuet1- SSQ1^{V472F}His/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *ssq1*^{V472F} z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje Ssq1^{F462S}.

pRSFDuet1- SSQ1^{T239A,V472F}His/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *ssq1*^{T239A,V472F} z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje Ssq1^{T239A,V472F}.

pRSFDuet1- GST-SSQ1^{T239A}/HEP1 - gen oporności na kanamycynę, gen *ssq1*^{T239A} z sekwencją kodującą GST na końcu 5' oraz *HEP1*, pod kontrolą promotora T7, koduje GST^{T239A}Ssq1^{T239A}.

Plazmidy kodujące Hsc20 i jego wariant.

Sekwencja kodująca białko Hsc20 (reszty od 10 do 184 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pET21d. Wektor z oryginalną sekwencją *HSC20* stanowił matrycę do przygotowania wariantów z substytucjami alaninowymi za pomocą mutagenyzy miejscowo specyficznej (Quik Change protocol, Stratagene).

pET21d-HSC20His - gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje Hsc20.

pET21d-HSC20^{L105A,L109A,Y163A}His - gen oporności na ampicylinę, gen *hsc20*^{L105A, L109A, Y163A} z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje wariant Hsc20^{LLY}.

Plazmid kodujący Hsc20^{GST}

Sekwencja kodująca białko Hsc20 wraz z sekwencją kodującą GST została umieszczona w wektorze plazmidowym pET3a.

pET3a-HSC20-GST - gen oporności na ampicylinę, gen *HSC20* z sekwencją GST na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje Hsc20^{GST}.

Plazmid kodujący Isu1

Sekwencja kodująca białko Isu1 (reszty od 36 do 165 bez presekwencji kierującej do mitochondriów) wraz z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3' zostały umieszczone w wektorze plazmidowym pET21d.

pET21d-ISU1His - gen oporności na ampicylinę, gen *ISU1* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje Isu1.

Plazmid kodujący HscA

Sekwencja kodująca białko HscA została umieszczona w wektorze plazmidowym pTrc.

pTrcHscA - gen oporności na ampicylinę, gen *HSCA*, pod kontrolą promotora T7, koduje HscA.

Plazmid kodujący SBD-HscA

Sekwencja kodująca domenę SBD białka HscA wraz z sekwencją kodującą sześć histydyn i SUMO na końcu 5' została umieszczona w wektorze plazmidowym pET28a.

pET28a-His-SUMO-HscA-C-ter - gen oporności na ampicylinę, gen *HSCA* z sekwencją kodującą sześć reszt histydynowych i sekwencję SUMO na końcu 5', pod kontrolą promotora T7, koduje domenę SBD HscA.

Plazmid kodujący HscB

Sekwencja kodująca białko HscB została umieszczona w wektorze plazmidowym pTrc.

pTrcHscB - gen oporności na ampicylinę, gen *HSCB*, pod kontrolą promotora T7, koduje HscB.

Plazmid kodujący IscU

Sekwencja kodująca białko IscU wraz z sekwencją kodującą osiem histydyn została umieszczona w wektorze plazmidowym pTrc.

pVP67K-IscUHis - gen oporności na kanamycynę, gen *ISCU* z sekwencją kodującą osiem reszt histydynowych na końcu 5', pod kontrolą promotora T7, koduje IscU.

Plazmid kodujący IscU^{GST}

Sekwencja kodująca białko IscU wraz z sekwencją kodującą GST została umieszczona w wektorze plazmidowym pET3a.

pET3aIscU^{GST} - gen oporności na ampicylinę, gen *ISCU* z sekwencją GST na końcu 3', pod kontrolą promotora T7, koduje IscU^{GST}.

3.3. Białka i ich warianty

Tabela 1. Lista wykorzystanych białek i ich wariantów.

<i>S. cerevisiae</i>	Funkcja
Ssq1	Hsp70
Ssq1*	Wariant Hsp70 niezdolny do hydrolizy ATP z substytucją alaninową reszty T239.
^{GST} Ssq1*	Wariant Hsp70 z fuzją GST, niezdolny do hydrolizy ATP
Ssq1*F462S	Wariant Hsp70 niezdolny do hydrolizy ATP z substytucją reszty w SBD odpowiedzialnej za oddziaływanie z Isu1
Ssq1*V472F	Wariant Hsp70 niezdolny do hydrolizy ATP z substytucją reszty w SBD odpowiedzialnej za oddziaływanie z Isu1
Ssq1 F462S	Wariant Hsp70 z substytucją reszty w SBD odpowiedzialnej za oddziaływanie z Isu1
Ssq1 V472F	Wariant Hsp70 z substytucją reszty w SBD odpowiedzialnej za oddziaływanie z Isu1
Hsc20	Białko JDP
Hsc20 ^{GST}	Wariant JDP z fuzją GST
Hsc20 K20A, R35A, K38A, R41A, H50A	Wariant Hsc20 z podstawieniami w obrębie domeny J, które hamują jego oddziaływanie z Ssq1
Hsc20 L105A, L109A, Y163A	Wariant Hsc20, którego zdolność oddziaływania z Isu1 jest znacznie osłabiona
Hsc20 D50A	Wariant Hsc20 z substytucją w konserwowanym motywie HPD niezbędnym do oddziaływania z Hsp70
Hsc20 R37A	Wariant Hsc20 z substytucją pozytywnie naładowanej reszty helisy II domeny J zaangażowanej w oddziaływanie z Ssq1
Hsc20 K132A	Wariant Hsc20 z substytucją reszty CTD zaangażowanej w oddziaływanie z Ssq1
Hsc20 K172A	Wariant Hsc20 z substytucją reszty CTD zaangażowanej w oddziaływanie z Ssq1
Hsc20 K132A, K172A	Wariant Hsc20 z substytucjami reszt CTD zaangażowanej w oddziaływanie z Ssq1
Isu1	Substrat białkowy/białko rusztowanie, na którym syntetyzowane są centra FeS
Isu1 ^{GST}	Substrat białkowy/białko rusztowanie z fuzją GST
Isu1 P134A, V135A, K136A	Wariant Isu1, który nie oddziałuje z Ssq1
<i>E. coli</i>	Funkcja
HscA	Hsp70
SBD-HscA	Domena wiążąca substrat
HscB	Białko JDP
HscB ^{GST}	Wariant JDP z fuzją GST
IscU	Substrat białkowy/białko rusztowanie, na którym syntetyzowane są centra FeS
IscU ^{GST}	Substrat białkowy/białko rusztowanie z fuzją GST
IscS	Desulfuraza cysteinowa

3.4. Pożywki do hodowli bakteryjnych.

LA (ang. *Lysogenic agar*): 0.5% (w/v) ekstrakt drożdżowy, 1% (w/v) trypton, 1% (w/v) NaCl, 2% (w/v) agar

LB (ang. *lysogenic broth*): 0.5% (w/v) ekstrakt drożdżowy, 1% (w/v) trypton, 1% (w/v) NaCl

TB (ang. *terrific broth*): 24 g/l ekstrakt drożdżowy, 20 g/l trypton, 4 ml/l glicerol, 0.017 M KH₂PO₄, 0.072 M K₂HPO₄

3.5. Złoża chromatograficzne

Ni-NTA agarose (Novagen); HisBind Resin (Millipore); Q-Sepharose (GE Healthcare); Phenyl-Agarose (GE Healthcare); Złoże agarozowe opłaszczzone zredukowanym glutationem (Glutathione reduced, immobilized on Agarose CL-4B, Sigma-Aldrich); PD-10 (GE Healthcare); HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich)

4. Metody

4.1. Izolacja plazmidowego DNA

Do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych *E.coli* użyłam komercyjnego zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology), postępując zgodnie z załączonym przez producenta protokołem. Uzyskany lizat 3 ml płynnej hodowli nocnej bakterii nanosiłam na złożę krzemionkowe. Związane zanieczyszczenia odpłukiwałam stosując załączone do zestawu bufony, a następnie plazmidowe DNA eluowałam 60 µl wody destylowanej. Stężenie i czystość otrzymanego preparatu sprawdzałam spektrofotometrycznie (NanoDrop, Thermo Scientific) mierząc absorbancję próbki przy długości fali świetlnej $\lambda=260$ nm.

4.2. Przygotowanie bakteryjnych komórek kompetentnych

Bakterie *E. coli* (szczyepy DH5 α , BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3) lub C41(DE3)) hodowane przez noc w 50 ml pożywki LB w wytrząsarce wodnej w 37°C z wytrząsaniem 120 RPM odmłodziłam poprzez pobranie 4 ml hodowli do 96 ml świeżej pożywki LB. Odmłodzoną hodowlę inkubowałam ponownie w wytrząsarce wodnej w 37°C z wytrząsaniem 120 RPM do uzyskania hodowli o gęstości optycznej OD₆₀₀=0.5. W kolejnym kroku hodowlę schłodziłam przez 20 minutową inkubację w lodzie, by

następnie oddzielić komórki bakteryjne od pożywki poprzez wirowanie w wirówce (5000 RPM, 5 min., Sigma, rotor 12134). Osad komórkowy zawiesiłam w 50 ml jałowego 50 mM roztworu CaCl₂ (chlorek wapnia) i inkubowałam w lodzie przez 30 min. Po ponownym wirowaniu (5000 RPM, 5 min., Sigma, rotor 12134), osad komórkowy zawiesiłam w 7 ml świeżego roztworu 50 mM CaCl₂ i pozostawiłam na noc w 4°C. Następnego dnia do bakterii dodałam 1.5 ml jałowego 50% roztworu glicerolu, całość porcjowałam po 100 µl do jałowych 1.5 ml plastikowych probówek typu „ependorf”, które następnie zamroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -80°C.

4.3. Transformacja bakteryjnych komórek kompetentnych

Do rozmrożonej porcji komórek kompetentnych wybranego szczepu *E. coli* dodawałam 1-2 µl wybranego plazmidu, po czym inkubowałam przez godzinę w lodzie. Po tym czasie komórki bakteryjne poddawałam szokowi cieplnemu poprzez 3-minutową inkubację w 43°C, a następnie 3-minutową inkubację w lodzie. Następnie do komórek kompetentnych dodawałam 1 ml pożywki LB i inkubowałam w 37°C z wytrząsaniem 700 RPM w termomikserze (Eppendorf). Po 2-godzinnej inkubacji komórki zostały odwirowane (5000 RPM, 5 min., Sigma, rotor 12134). Osad komórkowy wysiałam na płytkę z pożywką LA zawierającą antybiotyk stanowiący czynnik selekcyjny odpowiedni dla wykorzystywanego plazmidu i inkubowałam przez noc w cieplarni w 37°C. Następnego dnia uzyskane transformaty przesiewałam posiewem redukcyjnym płytki z pożywką LA zawierającą odpowiedni antybiotyk.

Szczepy *E. coli* BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3) oraz C41(DE3) używałam, jako szczepy ekspresyjne białek. Sprawdziłam nadprodukcję białek w tych szczepach po transformacji odpowiednimi plazmidami kodującymi wybrane białka. Hodowlę nocną odmładzałam w 100 ml świeżej pożywki LB z docelowym antybiotykiem do gęstości optycznej OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam do OD₆₀₀=0.6. Następnie hodowlę bakteryjną dzieliłam na dwie porcje po 50 ml. Do jednej dodawałam IPTG (izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd) do końcowego stężenia 1 mM, w celu zaindukowania ekspresji białka, a drugą pozostawiałam jako referencję. Hodowlę bakteryjną inkubowałam w wytrząsarce wodnej z wytrząsaniem 120 RPM w 30°C lub 37°C w zależności od nadprodukowanego białka. Co godzinę mierzyłam gęstość optyczną hodowli i pobierałam objętość hodowli będącą ekwiwalentem 1 ml o OD₆₀₀=1, wirowałam (5000 RPM; 5 min; Sigma; rotor 12134), usuwałam supernatant, a osad zawieszałam

w 100 μ l dwukrotnie stężonego buforu Laemmli i inkubowałam w temperaturze 100°C przez 10 minut. Próbki analizowałam metodą SDS-PAGE, nakładając po 10 μ l z próbki na ścieżki żelu poliakrylamidowego i prowadząc rozdzielanie przy 180 V przez godzinę. Gotowy żel barwiłam w roztworze Coomassie Brilliant Blue G 250 i oglądałam na transluminatorze, szukając prążków odpowiadających masą molekularną nadprodukowanemu białku.

4.4. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Do rozdzielania elektroforetycznego białek używałam systemu mini-Protean firmy BIO-RAD oraz dwufazowych żeli poliakrylamidowych o grubości 1 mm. Do przygotowania dolnej fazy rozdzielającej żelu wykorzystywałam 12.5% lub 15% (v/v) roztwór akrylamidu/bisakrylamidu (33:1) zawierający 375 mM Tris-Cl pH 8.8 i 0.1% (w/v) SDS (dodecylosiarczan sodu) oraz 0.1% (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina) i 0.04% (w/v) APS (nadsiarczan amonu) do zaindukowania polimeryzacji. Przygotowaną mieszaninę wylewałam pomiędzy przygotowane zestawy szybki, a na wierzchu dodawałam etanol, w celu usunięcia dostępu powietrza, po czym pozostawiałam do całkowitej polimeryzacji fazy dolnej rozdzielającej. Następnie przygotowywałam mieszaninę fazy górnej zagęszczającą o składzie 5% (v/v) akrylamid/bisakrylamid (33:1), 125 mM Tris-Cl pH 6.8 i 0.1% (w/v) SDS, której polimeryzację indukowałam dodając 0.1% (v/v) TEMED i 0.04% (w/v) APS, a na wierzchu umieszczałam grzebień formujący studzienki w żelu. Żele pozostawiałam na około 2 godziny do całkowitej jego polimeryzacji.

Próbki białek do rozdzielania elektroforetycznego przygotowywałam poprzez zmieszanie ich z 2-krotnie lub 4-krotnie (w zależności od stężenia białek w próbce) stężonym buforem obciążającym Laemmli (250 mM Tris-HCl pH 6.8; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) glicerol; 10% β -merkaptoetanol; 0.025% (w/v) błękit bromofenolowy) w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowałam termobloku przez 10 minut w 100°C. Próbki po inkubacji wirowałam w wirówce (14000 RPM; 30 s; Sigma; rotor 12134) i nanosiłam na studzienki w żelu. Rozdział w fazie górnej zagęszczającej żelu przeprowadzałam przy stałym napięciu 110 V przez około 30 min, a następnie w fazie dolnej rozdzielającej przy stałym napięciu 180 V przez godzinę.

Do części analiz biochemicznych używałam systemu Mini Gel Tank firmy ThermoFisher Scientific i komercyjnych gotowych żeli Bolt™ 12%, Bis-Tris, Mini Protein Gels o grubości 1 mm. Rozdział przeprowadzałam przy stałym napięciu 170 V przez około 30 min. Rozdzielane próbki białek były przygotowywane analogicznie, jak przy używaniu systemu mini-Protean (opis powyżej).

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym żele poliakrylamidowe umieszczałam w 100 ml roztworu Coomassie Brilliant Blue G 250 na co najmniej godzinę, przygotowanego przez rozcieńczenie stężonego roztworu (0.28% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% (v/v) metanol) z kwasem octowym i wodą w stosunku 5:2:3. Nadmiar barwnika usuwałam poprzez inkubację żelu w roztworze odbarwiający (10% (v/v) kwas octowy, 20% (v/v) metanol).

4.5. Oczyszczanie białek

Oprócz oczyszczonych przeze mnie preparatów białek, wykorzystywałam również preparaty znajdujące się w zasobach Zakładu Biochemii Ewolucyjnej.

4.5.1. Oczyszczanie preparatów Ssq1

Drożdżowe białka mitochondrialne Hsp70 – natywne Ssq1 oraz jego warianty (Ssq1*; Ssq1^{F462S}; Ssq1*^{F462S}; Ssq1^{V472F}; Ssq1*^{V472F}) ze znacznikami histydynowymi na C-końcu oczyszczałam zgodnie z opublikowaną procedurą dla Ssq1 [58].

Bakterie *E. coli* szczepu BL21(DE3) niosące plazmid pRSFDuet1 kodujący natywne Ssq1 lub jego zmutowany wariant oraz białko Hep1 (białko *S. cerevisiae*, które stabilizuje Ssq1 w trakcie ekspresji w komórkach bakteryjnych, ale nie oddziałuje z Ssq1 i nie jest obecne w końcowym preparacie Ssq1 [87]) hodowałam w 300 ml pożywki LB z kanamycyną (50 µg/ml) przez noc w wytrząsarce wodnej w 30°C, 120 RPM. Następnego dnia uzyskaną hodowlę odmłodziłam w 6 litrach pożywki LB z kanamycyną (50 µg/ml) do OD₆₀₀=0.1 i hodowałam w wytrząsarce powietrznej w 30°C, 160 RPM. Po osiągnięciu gęstości optycznej hodowli OD₆₀₀=0.6 indukowałam ekspresję białka poprzez dodanie do hodowli IPTG o końcowym stężeniu 1 mM. Hodowlę kontynuowałam przez kolejne 4 godziny. Następnie hodowlę bakteryjną poddałam wirowaniu (5000 RPM; 10 min; 4°C; Beckman; rotor JLA 10.500), usunęłam supernatant, a osady bakteryjne zawiesiłam w buforze A (20 mM HEPES-KOH pH 7.5; 150 mM KCl; 20 mM imidazol, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 2 mM octan magnezu) w proporcji 10 g

osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu osadów bakteryjnych w lodzie, poddałam trzykrotnej lizie mechanicznej w prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Lizaty bakteryjne wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti), a uzyskany supernatant nanosiłam grawitacyjnie na 2.5 ml złoża niklowego Ni-NTA agarose (Novagen), zrównoważonego wcześniej 20 ml buforu A. Po naniesieniu supernatantu z oczyszczonym białkiem, złożę płukałam następująco: 50 ml buforu A, 50 ml buforu A z 0.05% Triton X-100, 20 ml buforu A z 1 mM ATP i 10 mM MgCl₂, 20 ml buforu A z 1 M KCl. Białko eluowałam liniowym gradientem imidazolu (40-250 mM) w buforze A, zbierając całkowitą objętość 30 ml (przepływ 0.3 ml/min, frakcje 1 ml). Chcąc wyeluować jak najwięcej białka przepuszczałam dodatkowo 20 ml buforu A z 250 mM imidazolu, zbierając frakcje po 1 ml. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające czyste białko Ssq1 zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Oczyszczony preparat białka dializowałam wobec 3 litrów buforu B (20 mM HEPES-KOH pH 8.0; 100 mM KCl; 10% glicerol; 5 mM β-merkaptioetanol) wymieniając 1 litr buforu co godzinę. Następnie gotowy preparat białka porcjowałam, mroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.2. Oczyszczanie preparatu ^{GST}Ssq1*

Do nadprodukcji białka Ssq1 ^{GST}Ssq1* wykorzystałam, *E. coli* szczep BL21-CodonPlus(DE3) niosący plazmid pRSFDuet1-SSQ1^{T239A}GST/HEP1. Bakterie hodowałam w 300 ml pożywki TB z kanamycyną (50 µg/ml) i chloramfenikolem (34 µg/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 30°C w 120 RPM. Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki TB z kanamycyną do gęstości optycznej wynoszącej OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w 30°C, 160 RPM w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia OD₆₀₀=0.6. Po osiągnięciu przez hodowlę bakteryjną wymaganego OD, do hodowli dodałam IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM i inkubowałam ponownie w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C przez 3 godziny. Następnie hodowlę bakteryjną poddałam wirowaniu (5000 RPM; 10 min; 4°C; Beckman; rotor JLA 10.500). Osady bakteryjne zawiesiłam w buforze C (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 1mM PMSF; 200 mM NaCl; 0.05% Triton X-100; 1 mM DTT - ditiotreitol) w stosunku 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie, a następnie po rozmrożeniu w lodzie, poddałam trzykrotnej lizie mechanicznej w prasie French'a

(ciśnienie 1000 psi). Lizaty bakteryjne ponownie wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant naniosłam grawitacyjnie na 2 ml złoża agarozowego opłaszczzonego zredukowanym glutationem (Glutathione reduced, immobilized on Agarose CL-4B, Sigma-Aldrich), zrównoważonego 10 ml buforu C. Następnie złoże płukałam 100 ml buforu C bez dodatku PMSF, 10 ml buforu C z dodatkiem 1 mM ATP i 10 mM MgCl₂ oraz 10 ml buforu C. Białko eluowałam 20 ml buforu C z 50 mM zredukowanym glutationem pH 8.0 i zbierałam frakcje o objętości 1 ml. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające białko ^{GST}Ssq1* dializowałam wobec 2 litrów buforu D (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM NaCl; 10% glicerol; 5 mM β-merkaptioetanol) ze zmianą buforu – 500 ml co pół godziny. Następnie białko ^{GST}Ssq1* oczyszczałam z wykorzystaniem 2.5 ml złoża Q-Sepharose zrównoważonego uprzednio 30 ml buforu D. Po nanoszeniu zawiesiny białka złoże Q-Sepharose płukałam 30 ml buforu D. Białko eluowałam gradientem NaCl (50-300 mM) w buforze D o łącznej objętości wynoszącej 40 ml (przepływ 0.3 ml/min, frakcje 1 ml). W celu wyeluowania jak największej ilości białka przepuszczałam dodatkowo 30 ml buforu D z 600 mM NaCl, zbierając frakcje po 1 ml. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające białko ^{GST}Ssq1* zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore).

W kolejnym etapie preparat ^{GST}Ssq1* doczyszczalam z wykorzystaniem złoża HTP (Bio-Gel® HTP Hydroxyapatite, BIO-RAD). W tym celu zagęszczony preparat dializowałam wobec 2 litrów buforu E (20 mM Kpi pH 6.8; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 0.05% Triton X-100; 5 mM β-merkaptioetanol) ze zmianą buforu – 500 ml co pół godziny. Po dializie nanosilałam grawitacyjnie preparat ^{GST}Ssq1* na 2.5 ml złoża HTP zrównoważonego wcześniej 25 ml buforu E, a następnie złoże płukałam 25 ml buforu E. Białko eluowałam ze złoża liniowym gradientem KPi (20-220 mM) w buforze E o łącznej objętości 50 ml (0.2 ml/min, frakcje 1.2 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające białko ^{GST}Ssq1* zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Zagęszczony preparat ^{GST}Ssq1* dializowałam wobec buforu końcowego 2 litrów F (20mM HEPES-KOH pH

8.0; 100 mM KCl; 10% glicerol; 5 mM β -merkaptotanol). Gotowy preparat białka porcjaowałam, mroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C .

4.5.3. Oczyszczanie białka Hsc20 oraz Hsc20^{LLY}

Białko Hsc20 oraz wariant Hsc20^{LLY} oczyszczałam według poniższej procedury [58,88]. Do nadprodukcji białka Hsc20 wykorzystałam, bakterie *E. coli* szczep C41(DE3) niosący plazmid pET21d-HSC20His. Bakterie hodowałam w 300 ml pożywki LB z ampicyliną (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) w wytrząsarce wodnej przez noc w 30°C w 120 RPM. Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki LB z ampicyliną do gęstości optycznej wynoszącej $\text{OD}_{600}=0.1$ i inkubowałam w 30°C w 160 RPM w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia $\text{OD}_{600}=0.6$. Po osiągnięciu przez hodowlę bakteryjną wymaganego OD, do hodowli dodałam IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM i inkubowałam ponownie w wytrząsarce powietrznej w tej samej temperaturze przez 3 godziny. Następnie hodowlę bakteryjną poddałam wirowaniu (5000 RPM; 10 min; 4°C ; Beckman; rotor JLA 10.500). Osady bakteryjne zawiesiłam w buforze G (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 50 mM NaCl; 1 mM PMSF; 30 mM imidazol) w stosunku 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu zawiesiny bakteryjnej w lodzie, poddałam ją trzykrotnej lizie mechanicznej w prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Lizaty bakteryjne następnie wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C ; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Białka obecne w supernatancie po wirowaniu precypitowałam siarczanem amonu (0.35g/ml) w temperaturze 4°C z mieszaniem przez godzinę. Po godzinie zawiesinę wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C ; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti), a uzyskany osad zawieszałam w 20 ml buforu G po czym dializowałam przez noc w 4°C wobec 2 litrów tego samego buforu. Po dializie zawiesinę białka nakładałam grawitacyjnie na 2.5 ml złoża niklowego (HisPurTM Ni-NTA Resin, Thermo Scientific), wstępnie zrównoważonego 25 ml buforu G. W kolejnym kroku złożo płukałam kolejno 100 ml buforu G, 12 ml buforu G z 1 mM ATP, 2 mM MgCl_2 i 1 M NaCl oraz 12 ml buforu G. Następnie białko eluowałam gradientem imidazolu w buforze G (30 – 300 mM), zbierając całkowitą objętość 30 ml (przepływ 0.4 ml/min., frakcje 0.8 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające oczyszczone białko łączyłam i dializowałam wobec litra buforu H (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 50 mM NaCl; 5 mM β -merkaptotanol), wymieniając bufor trzykrotnie co godzinę. W kolejnym kroku roztwór białka poddawany dializie nanosiłam na 4 ml złoża Q-Sepharose (GE Healthcare) zrównoważoną 40 ml

buforu H. Po naniesieniu białka, kolumnę płukano 10 objętościami buforu H zawierającego 50 mM NaCl. Białko eluowano liniowym gradientem NaCl (50 - 300 mM) w buforze H o całkowitej objętości gradientu 40 ml (przepływ 0.5 ml/min; frakcje po 1 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające czyste białko Hsc20 zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Oczyszczony preparat białka Hsc20 dializowałam wobec 2 litrów buforu H. Następnie gotowy preparat białka porcjowałam, mroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.4. Oczyszczanie białka Hsc20^{GST}

Do nadprodukcji białka Hsc20^{GST} wykorzystałam, bakterie E. coli szczep C41(DE3) niosący plazmid pET3a-HSC20-GST. Bakterie hodowałam w 300 ml pożywki LB z ampicyliną (100 µg/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 37°C w 120 RPM. Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki LB z ampicyliną do gęstości optycznej wynoszącej OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w 37°C w 160 RPM w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia OD₆₀₀=0.6. Po osiągnięciu przez hodowlę bakteryjną wymaganego OD, do hodowli dodałam IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM i inkubowałam ponownie w wytrząsarce powietrznej w 30°C przez 4 godziny. Następnego dnia hodowlę bakteryjną poddałam wirowaniu (5000 RPM; 10 min; 4°C; Beckman; rotor JLA 10.500). Osady bakteryjne zawiesiłam w buforze I (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 200 mM NaCl; 0,05% Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) w stosunku 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu zawiesiny bakteryjnej w lodzie, poddałam ją trzykrotnej lizie mechanicznej w prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Lizaty bakteryjne następnie wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant nanosiłam grawitacyjnie na 2.5 ml złoża agarozowego ze zredukowanym glutationem (Glutathione reduced, immobilized on Agarose CL-4B, Sigma-Aldrich), które wcześniej zostało zrównoważone 25 ml buforu I. Następnie złożo płukałam kolejno 100 ml buforu I bez PMSF, 25 ml buforu I z 0.5 mM NaCl, 25 ml buforu I z 10 mM MgCl₂ i 1 mM ATP oraz 25 ml buforu I. Białko eluowałam 20 ml buforu I z 50 mM zredukowanym glutationem pH 8.0 i zbierałam frakcje o objętości 1 ml. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające czyste białko Hsc20^{GST} zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192)

w Centricon o wielkości porów 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Zagęszczony preparat białkowy dializowałam wobec 1 l buforu J (50mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 50 mM NaCl). Następnie gotowy preparat białka porcjowałam, mroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.5. Oczyszczanie białka Isu1

Białko Isu1 oczyszczałam zgodnie z opublikowaną procedurą [71]. Bakterie *E. coli* szczepu C41(DE3) niosące plazmid pET21d-ISU1His hodowałam w 300 ml pożywki LB z ampicyliną (100 µg/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 30°C w 120 RPM. Następnego dnia hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki LB z ampicyliną do gęstości optycznej wynoszącej OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w 30°C w 160 RPM w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia OD₆₀₀=0.6. Po osiągnięciu przez hodowlę bakteryjną wymaganego OD, do hodowli dodałam jony cynku (Zinc sulfate heptahydrate, Sigma-Aldrich) do końcowego stężenia wynoszącego 50 µM oraz IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM i inkubowałam ponownie w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C przez 3 godziny. Następnie hodowlę bakteryjną poddałam wirowaniu (5000 RPM; 10 min; 4°C; Beckman; rotor JLA 10.500). Osady bakteryjne zawiesiłam w buforze K (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 50 mM KCl; 0.05% Triton X-100; 50 mM imidazol) w stosunku 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie, a następnie po rozmrożeniu w lodzie, poddałam trzykrotnej lizie mechanicznej w prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Lizaty bakteryjne ponownie wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant naniósłłam grawitacyjnie na 2.5 ml złoża niklowego (HisPur™ Ni-NTA Resin, Thermo Scientific), wstępnie zrównoważonego 40 ml buforu K. Po naniesieniu supernatantu złożę płukałam kolejno: 40 ml buforu K z 1 M KCl, 100 ml buforu K z 150 mM KCl. Następnie białko eluowałam gradientem imidazolu (50 – 500 mM) w buforze K, zbierając całkowitą objętość 50 ml (przepływ 0.3 ml/min., frakcje 0.9 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające Isu1 łączyłam i zagęszczałam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). W następnej kolejności preparat białka Isu1 rozdzielałam za pomocą sączenia molekularnego, w celu oddzielenia frakcji zawierających formę monomeru od dimeru tego białka. Przeprowadziłam rozdział chromatograficzny zagęszczonych preparatów

białkowych na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich) zrównoważonej wcześniej buforem L (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 200 mM KCl; 0.05% Triton X-100; 5 mM β -merkaptotanol). Całkowita objętość rozdziału wynosiła 120 ml (przepływ 1 ml/min., frakcje 1 ml). Następnie przeprowadziłam analizę SDS-PAGE frakcji odpowiadających monomerowi, a frakcje o największej zawartości białka łączyłam i zagęszczałam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Preparaty następnie porcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.6. Oczyszczanie białek HscA i HscB

Białka HscA i HscB oczyszczalam według poniższej procedury [65]. Do nadprodukcji białka HscA wykorzystałam, bakterie *E. coli* szczep DH5 α niosący plazmid pTrcHscA, tak jak w przypadku białka HscB niosących plazmid pTrcHscB. Bakterie hodowałam w 300 ml pożywki LB z ampicyliną (100 μ g/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 37°C w 120 RPM. Następnego dnia hodowlę nocne odmładzałam w 6 l pożywki TB z ampicyliną (100 μ g/ml) do OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w wytrząsarce powietrznej w 37°C w 160 RPM do uzyskania OD₆₀₀=0.6. Następnie indukowałam nadprodukcję białka poprzez dodanie do hodowli IPTG do końcowego stężenia równego 0.5 mM. Od tego momentu hodowlę komórkową prowadziłam w wytrząsarce powietrznej w 30°C w 160 RPM przez noc. Kolejnego dnia hodowlę bakteryjną zwirowałam (5000 g; 10 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JLA-10.500), a uzyskany osad bakteryjny zawieszałam w buforze M (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.5 mM EDTA pH 7.5; 1 mM DTT; 0.4 mM PMSF) w proporcji 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu zawieszonoego osadu bakteryjnego w lodzie, poddawałam go 3-krotnej lizie w Prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Uzyskany lizat zwirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Roztwór białka w supernatancie nosisłam grawitacyjnie na 50 ml złoża Q-Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare), przygotowanego w szklanej kolumnie i zrównoważonego buforem M (10-krotną objętością złoża). Po naniesieniu roztworu białka złożę płukałam ponownie buforem M (10-krotną objętością złoża). Związane białko eluowałam liniowym gradientem NaCl (0-1 M) w buforze M, zbierając całkowitą objętość 500 ml (przepływ 2 ml/min., frakcje 12.5 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie najlepsze z nich łączyłam i dializowałam wobec 2 litrów buforu N

(100 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM DTT) przez noc. Dializowany roztwór białka mieszałam w temperaturze 4°C, stopniowo dodając siarczan amonu (0.35 g/ml). Po godzinnej inkubacji mieszaninę wirowałam (75600 g.; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant nakładałam grawitacyjnie na 35 ml złoża Phenyl-Agarose (GE Healthcare) poprzednio zrównoważonego buforem O (100 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM DTT; 1 M siarczan amonu) (10-krotną objętością złoża). Po naniesieniu roztworu białka złożę płukałam 10-krotną objętością złoża buforem O. Związane białko eluowałam liniowym gradientem siarczanu amonu (1-0 M) w buforze O, zbierając całkowitą objętość 500 ml (przepływ 1.6 ml/min., frakcje 10 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie najlepsze z nich łączyłam i zagęszczałam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Zagęszczone preparaty białkowe dializowałam wobec 2 litrów buforu końcowego P (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 20 mM KCl) przez noc. Preparaty białek następnie porcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.7. Oczyszczanie domeny SBD białka HscA

Do nadprodukcji domeny SBD białka HscA (SBD-HscA) wykorzystałam, bakterie *E. coli* szczep C41(DE3) niosący plazmid pSMT-His-SUMO-HscA-C-ter. Bakterie hodowałam w 200 ml pożywki LB z kanamycyną (50 µg/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 37°C w 120 RPM. Następnego dnia hodowle nocne odmładzałam w 3 l pożywki LB z kanamycyną (50 µg/ml) do OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w wytrząsarce powietrznej w 30°C w 160 RPM do uzyskania OD₆₀₀=0.6. Następnie indukowałam nadprodukcję białka poprzez dodanie do hodowli IPTG do finalnego stężenia równego 0.8 mM i kontynuowałam inkubację w wytrząsarce powietrznej w 30°C w 180 RPM przez kolejne 3 godz. Następnie hodowlę bakteryjną zwirowałam (5000 g; 10 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JLA-10.500), a uzyskany osad bakteryjny zawieszałam w buforze R (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 250 mM NaCl; 10% glicerol; 20 mM imidazol pH 8.0) z 1 mM PMSF) w proporcji 10 g osadu na 35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu zawieszonego osadu bakteryjnego w lodzie, poddawałam go 3-krotnej lizie w Prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Uzyskany lizat zwirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Roztwór białka w supernatancie nanosiłam grawitacyjnie na 2.5 ml złoża niklowego HisBind Resin (Millipore), przygotowanego

w szklanej kolumnie i zrównoważonego 30 ml buforu R. Po naniesieniu roztworu białka złoże płukałam kolejno 100 ml buforu R, 40 ml buforu R z 1 mM ATP i 10 mM MgCl₂, 40 ml buforu R z 1 mM NaCl, 40 ml buforu R z 20 mM NaCl i 30 ml buforu R. Związane białko eluowałam liniowym gradientem imidazolu (20-350 mM) w buforze R, zbierając całkowitą objętość 50 ml (przepływ 0.5 ml/min., frakcje 1.2 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające oczyszczane białko łączyłam i dializowałam wobec 2 litrów buforu S (20 mM HEPES-KOH pH 7.5; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10% glicerol; 5 mM β-merkaptoetanol) w obecności Ulp 1 (30 ng Ulp1 na 1 μg oczyszczanego białka) przez noc, co miało na celu usunięcie znacznika SUMO. Dializowany roztwór białka inkubowałam z 1 ml złoża HisBind Resin (Millipore) zrównoważonego buforem S. Następnie roztwór białka ze złożem poddawałam wirowaniu, usuwałam złoże, a supernatant z oczyszczanym białkiem zagęszczałam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Zagęszczony preparat białkowy następnie porcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.8. Oczyszczanie białka IscU

Białko IscU oczyszczalam według poniższej procedury [89]. Do nadprodukcji białka IscU wykorzystalam, bakterie *E. coli* szczep C41(DE3) niosący plazmid pVP67K-IscUHis. Bakterie hodowalam w 300 ml pożywki LB z kanamycyną (50 μg/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 37°C w 120 RPM. Następnego hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki LB z kanamycyną do gęstości optycznej wynoszącej OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w 37°C w 160 RPM w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia OD₆₀₀=0.6, a następnie do hodowli dodałam jony cynku (Zinc sulfate heptahydrate, Sigma-Aldrich) do końcowego stężenia wynoszącego 50 μM oraz IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM i inkubowałam ponownie w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C przez 3 godziny. Po tym czasie hodowlę bakteryjną wirowalam (5000 RPM; 10 min; 4°C; Beckman; rotor JLA 10.500). Osady bakteryjne zawiesiłam w buforze T (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 150 mM KCl; 20 mM imidazol) w proporcji 10 g osadu komórkowego na 35 ml buforu. Zawiesinę mroziłam w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu zawieszonoego osadu bakteryjnego w lodzie, poddawałam go 3-krotnej lizie w Prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Uzyskany lizat zwirowalam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Następnie

supernatant nosiłam grawitacyjnie na 2.5 ml złoża niklowego (HisPur™ Ni-NTA Resin, Thermo Scientific), wstępnie zrównoważonego 20 ml buforu T. Po naniesieniu supernatantu złożę płukałam kolejno 20 ml buforu T, 40 ml buforu T z 1 M KCl, 50 ml buforu T. Następnie białko eluowałam gradientem imidazolu w buforze T (20 – 500 mM) zbierając całkowitą objętość 50 ml (przepływ 0.3 ml/min., frakcje 1 ml). Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające IscU łączyłam i zagęszczałam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). W następnej kolejności preparat białka IscU rozdzielałam za pomocą sączenia molekularnego, w celu oddzielenia frakcji zawierających formę monomeru od dimeru tego białka. Przeprowadziłam rozdział chromatograficzny zagęszczonych preparatów białkowych na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (Sigma-Aldrich) zrównoważonej wcześniej buforem L (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 200 mM KCl; 0.05% Triton X-100; 5 mM β-merkaptioetanol). Całkowita objętość rozdziału wynosiła 120 ml (przepływ 1 ml/min., frakcje 1 ml). Następnie przeprowadziłam analizę SDS-PAGE frakcji odpowiadających monomerowi, a frakcje o największej zawartości białka łączyłam i zagęszczałam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów wynoszącej 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Preparaty następnie porcjowałam, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

4.5.9. Oczyszczanie białka IscU^{GST}

Białko IscU^{GST} oczyszczalam według poniższej procedury [70]. Do nadprodukcji białka IscU^{GST} wykorzystałam, bakterie *E. coli* szczep C41(DE3) niosący plazmid pET3a-IscU-GST. Bakterie hodowałam w 300 ml pożywki LB z ampicyliną (100 µg/ml) w wytrząsarce wodnej przez noc w 37°C w 120 RPM. W kolejnym dniu hodowlę nocną odmłodziłam w 6 l pożywki LB z ampicyliną do gęstości optycznej wynoszącej OD₆₀₀=0.1 i inkubowałam w 37°C w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia OD₆₀₀=0.6. Po osiągnięciu przez hodowlę bakteryjną wymaganego OD, do hodowli dodawałam IPTG do końcowego stężenia wynoszącego 1 mM i inkubowałam ponownie w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C przez noc. Następnego dnia hodowlę bakteryjną poddałam wirowaniu (5000 RPM; 10 min; 4°C; Beckman; rotor JLA 10.500). Osady bakteryjne zawiesiłam w buforze V (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 1mM PMSF; 200 mM NaCl; 0.05% Triton X-100; 1 mM DTT) w stosunku 10 g osadu na

35 ml buforu i mroziłam w ciekłym azocie, a następnie po rozmrożeniu w lodzie, poddałam trzykrotnej lizie mechanicznej w prasie French'a (ciśnienie 1000 psi). Lizaty bakteryjne ponownie wirowałam (75600 g; 60 min.; 4°C; Beckman Coulter; rotor JA 30.50 Ti). Uzyskany supernatant naniosłam grawitacyjnie na 1 ml złoża agarozowego opłaszczonego zredukowanym glutationem (Glutathione reduced, immobilized on Agarose CL-4B, Sigma-Aldrich), 10 ml buforu V. Następnie złożę płukałam 100 ml buforu V bez dodatku PMSF, 10 ml buforu V z dodatkiem 1 mM ATP i 10 mM MgCl₂ oraz 10 ml buforu V. Białko eluowałam 20 ml buforu V z 50 mM zredukowanym glutationem pH 8.0 i zbierałam frakcje o objętości 1 ml. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach sprawdzałam metodą SDS-PAGE, a następnie frakcje zawierające czyste białko IscU^{GST} zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w Centricon o wielkości porów 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore).

Następnie wymieniłam bufor w zagęszczonym preparacie białka IscU^{GST}, w celu usunięcia KCN. W tym celu zastosowałam kolumnę do sączenia molekularnego PD-10 (GE Healthcare). Zagęszczone frakcje uzupełniłam buforem W (20mM Tris-HCl pH 8.0; 10% glicerol; 1mM DTT; 20mM KCl) do objętości końcowej 2.25 ml, a następnie dodałam 250 µl 1 M cyjanku potasu (KCN rozpuszczony w 1 M Tris-HCl pH 8.0). Roztwór białka z cyjankiem potasu inkubowałam przez godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie nanosiłam na kolumnę PD-10 zrównoważoną wcześniej 25 ml buforu W. Białko eluowałam 3.5 ml buforu W. Zebrałam 3.5 ml eluatu i zamroziłam w -70°C do dalszych doświadczeń.

4.6. Dichroizm kołowy

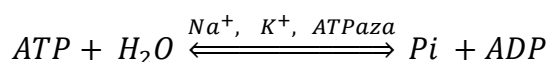
Pomiary wykonałam razem dr hab. Rafałem Dutkiewiczem, prof. UG. Do pomiarów wykorzystano spektrofotometr dichroizmu kołowego JASCO J-1500. Do pomiarów wykorzystano białka o stężeniu 5 µM. Pomiary zostały przeprowadzone w buforze CD (20 mM KPi pH 7.6; 80 mM KCl) przy następujących parametrach pomiaru: zakres długości fali 196-260 nm; temperatura 25°C; długość drogi optycznej 1 mm; szerokość wiązki 1 nm; ilość akumulacji 4; szybkość pomiaru 50 nm/min; interwał 0.1 nm. Uzyskiwane widma wyrażone w milistopniach były przeliczane na eliptyczność molową wyrażoną w 10³*deg*cm²/dmol⁻¹.

Aby określić stabilność preparatów białkowych przeprowadzałam pomiar temperatury topnienia. Pomiary temperatury topnienia zostały przeprowadzone także w aparacie JASCO J-1500, przy następujących parametrach pomiaru: długość fali 220 nm; temperatura 20-90°C; interwał 0,5°C/min; szerokość wiązki 1nm.

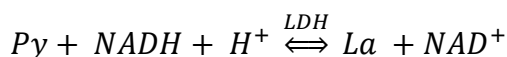
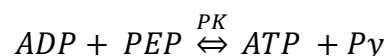
4.7. Pomiar hydrolizy ATP Hsp70

Pomiar hydrolizy ATP przez Ssq1 i Ssq1* w oparciu o system ze sprzężonymi enzymami [70][90] przeprowadzałam w następujący sposób: przygotowywałam dwie mieszaniny reakcyjne w buforze X (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT), gdzie jedna z nich zawierała 3-5 U dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), 2-4 U kinazy pirogronianowej (PK), 4 mM kwas fosfoenolpirogronianowy (PEP), 0.5 mM NADH i 2 mM ATP, zaś drugą mieszaninę analizowanych białek (1 μM Ssq1*; 1 μM Hsc20; 10 μM Isu1; 1 μM Mge1). Obie mieszaniny inkubowałam przez 4 min. w temperaturze 25°C, a następnie inicjowałam reakcję poprzez połączenie obu mieszanin ze sobą w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm i rozpoczynałam rejestrowanie absorbancji w spektrofotometrze JASCO V-660. Spadek stężenia NADH, w miarę jak jest zużywane jako substrat, był rejestrowany jako spadek absorbancji przy λ = 340 nm, co jest wprost proporcjonalne do spadku stężenia ATP w miarę jego hydrolizy. Świadczy to o zachodzeniu dwóch reakcji w tej metodzie:

1. Hydroliza ATP



2. Regeneracja ATP i utlenienia NAD⁺



Gdzie PEP – fosfoenolpirogronian; PK – kinaza pirogronianowa; LDH – dehydrogenaza mleczanowa; Py - pirogronian

W oparciu o tę zależność obliczałam zmiany stężenia ATP w oparciu o poniższy wzór:

$$\Delta C = \frac{\Delta A_{340}}{\epsilon l}$$

gdzie ΔC oznacza zmianę stężenia ATP [M/min]; ΔA₃₄₀ zmianę absorbancji przy długości fali 340nm; ε oznacza molowy współczynnik ekstynkcji dla NADH równy 6440 mol⁻¹*cm⁻¹, l to długość drogi optycznej.

4.8. Przygotowanie złoża agarozowego do precypitacji kompleksów białkowych

Odważyłam 70 mg złoża agarozowego opłaszczanego zredukowanym glutationem (Glutathione reduced, immobilized on Agarose CL-4B, Sigma-Aldrich) w proszku i zawiesiłam w 40 ml buforu Y (40 mM HEPES–KOH, pH 7.5; 5% [v/v] glicerol, 100 mM KCl, 1 mM DTT i 10 mM MgCl₂) i pozostawiłam do inkubacji z rotacją 25 RPM w rotatorze w 4°C przez noc. Pozostałość buforu usuwałam poprzez 3-krotnie wirowanie zawiesiny złoża (1000 g; 2 min; Sigma; rotor 11192; 4°C) za każdym razem usuwając supernatant i zawieszając w świeżym buforze Y w objętości równej 2-krotnej objętości osadu złoża. Następnie złoże inkubowałam w buforze Y z dodatkiem 0.1% Triton X-100 przez 2.5 godz. z rotacją 25 RPM w rotatorze w 4°C. Pozostałość buforu usuwałam poprzez 3-krotnie wirowanie zawiesiny złoża (1000 g; 2 min; Sigma; rotor 11192; 4°C) za każdym razem usuwając supernatant i zawieszając w świeżym buforze Y w objętości równej 3-krotnej objętości osadu złoża. W kolejnym kroku złoże zawiesiłam w buforze Y z dodatkiem 0.1% albuminy surowicy bydlęcej (ang. *Bovine Serum Albumin* – BSA) przez 2.5 godz. z rotacją 25 RPM w rotatorze w 4°C. Po ponownym 3-krotnym płukaniu złoża buforem Y pozostawiłam złoże w świeżej porcji buforu Y przez noc w 4°C bez rotacji. Kolejnego dnia płukałam złoże poprzez 4-krotne wirowanie i zawieszanie osadu złoża w buforze Y. Końcowy osad złoża zawiesiłam w buforze Y w objętości stosunku objętościowym 1:1 (osad złoża:bufor).

4.9. Precypitacja kompleksów białkowych (*ang. pulldown*)

Precypitację kompleksów białkowych przeprowadzałam według wcześniej opublikowanej procedury [91]. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 150 µl i zawierała 2.5 µM stężenie białka ze znacznikiem GST (Isu1^{GST}, GST^{Ssq1*}, Hsc20^{GST}) lub białka GST (jako kontrola wiązań niespecyficznych) oraz – w zależności od zastosowanego białka ze znacznikiem GST - 5 µM Ssq1* (wyszczególnione warianty) i/lub 2.5 µM Hsc20 (natywny lub wyszczególnione warianty) i/lub 2.5 µM Isu1 (natywny lub wyszczególnione warianty) w buforze W (40 mM HEPES–KOH, pH 7.5; 5% [v/v] glicerol, 100 mM KCl, 1 mM DTT i 10 mM MgCl₂) przez 15 min w 25°C w celu utworzenia kompleksów białkowych.

Po inkubacji pobierałam 7.5 µl mieszaniny reakcyjnej i zawieszałam w 7.5 µl 2-krotnie stężonego buforu obciążającego Laemmli, jako kontrola nakładania stanowiąca

5% mieszaniny reakcyjnej. Do pozostałości mieszanin reakcyjnych dodawałam 40 µl zawiesiny złoża agarozowego opłaszczonego zredukowanym glutationem (Glutathione reduced, immobilized on Agarose CL-4B, Sigma-Aldrich) w buforze W w stosunku 1:1 i pozostawiałam do inkubacji z rotacją 25 RPM w rotatorze w 4°C. Następnie mieszaniny reakcyjnie poddawałam wirowaniu (1000 g; 2 min; Sigma; rotor 12134; 4°C), supernatant usuwałam, a do osadu złoża dodawałam 500 µl buforu W i wirowałam w tych samych warunkach. Po usunięciu supernatantu złożo zawieszałam w 200 µl buforu W i ponownie wirowałam w tych samych warunkach. Tę czynność powtarzałam jeszcze 2-krotnie, w celu usunięcia niezwiązanych białek. Osad złoża ze związanymi białkami zawiesiłam w 20 µl 2-krotnie stężonego buforu obciążającego Laemmli i inkubowałam termobloku przez 10 minut w 100°C. Próbkę po inkubacji wirowałam w wirówce (14000 RPM; 5 min; Sigma; rotor 12134). Oddziaływania między białkami oraz kontrolę nakładania analizowałam poprzez rozdział elektroforetyczny przygotowanych próbek przy użyciu komercyjnych gotowych żeli Bolt™ 12%, Bis-Tris, Mini Protein Gels o grubości 1 mm. Rozdział przeprowadzałam przy stałym napięciu 170 V przez około 30 min, a do wizualizacji prążków białek zastosowałam barwienie w roztworze Coomassie Brilliant Blue G 250.

Analizę densytometryczną prążków w żelach wybarwionych Coomassie Brilliant Blue G 250 przeprowadziłam przy użyciu programu ImageJ [92][93]. Wartości uzyskane dla każdego analizowanego białka normalizowałam do poziomów sygnału białka ze znacznikiem GST (np. Isu1^{GST} lub GST) w każdej analizowanej ścieżce. Sygnał tła wiązania niespecyficznego analizowanego białka do GST odjęto od znormalizowanych danych.

4.10. Pomiar interferometrii biowarstwy (BLI)

Pomiary interferometrii biowarstwy przeprowadzałam przy użyciu jednokanałowego instrumentu BLItz (Pall ForteBio) oraz biosensorów anty-GST. Wszystkie pomiary przeprowadzałam w temperaturze pokojowej w buforze Z (40 mM HEPES–KOH, pH 7.5; 5% (v/v) glicerol; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 0.05% (v/v) Triton X-100). Sensogramy rejestrowałam w funkcji czasu. Po początkowym etapie równoważenia (30 s), biosensor zanurzałam w roztworze białka ze znacznikiem GST o stężeniu 10 µM (Isu1^{GST}, IScU^{GST}, HscB^{GST} lub GST) i immobilizowałam do powierzchni biosensorów anty-GST w obecności 0.5 mg/ml BSA przez 10 min, po czym

sensory były zanurzane przez 10 min w buforze Z bez białek, w celu zarejestrowania dysocjacji. W celu rejestrowania sygnału wiązania do białka ze znacznikiem GST, po etapie równoważenia (30 s) biosensory zanurzałam w roztworach zawierających mieszaniny analizowanych białek (10 min) w celu sprawdzenia oddziaływania z wcześniej immobilizowanym białkiem na biosensorze (asocjacja), a następnie zanurzałam w roztworach wolnych od białek w celu zarejestrowania dysocjacji (10 min). Do oceny wiązania tła zastosowałam biosensory z immobilizowanym GST.

Reakcje dwuetapowe przeprowadzałam analogicznie do powyżej opisanej procedury, z tą różnicą, że biosensor z immobilizowanym białkiem Isu1^{GST}, po etapie równoważenia (30 s), zanurzałam w roztworach zawierających 1 μ M stężenie Hsc20 lub Ssq1* (10 min), i kolejno w roztworze zawierającym 1 μ M Hsc20 i 1 μ M Ssq1* (10 min), a następnie w roztworach wolnych od białek w celu zarejestrowania dysocjacji (10 min).

4.11. Proteoliza bakteryjną proteazą Lon

Doświadczenia proteolizy przeprowadzałam według zmodyfikowanej procedury [85] [94]. Mieszaninę reakcyjną, zawierającą 7.5 μ M analizowanego białka (IscU lub kazeina – kontrola pozytywna) oraz 1.25 μ M proteazy Lon w buforze L1 (40 mM HEPES-KOH pH 8.0; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; 0.08 mg/ml BSA; 4% sacharoza; 1 mM DTT; 4 mM ATP; 15 mM (CH₃COO)₂Mg) inkubowała w 30°C w wybranych czasach (zaznaczonych na Rycinach). Reakcje kontrolne przeprowadzałam w buforze L1 bez ATP i jonów magnezowych. W doświadczeniach, w których badałam ochronę białka IscU przed degradacją, analizowane białko o stężeniu 50 μ M (HscB; SBD-HscA; IscS) inkubowałam z IscU przez 10 min w 30°C przed dodaniem proteazy. Następnie dodawałam proteazę Lon i kontynuowałam inkubację w 30°C w wybranych czasach (zaznaczonych na Rycinach). Poziom degradacji IscU analizowałam poprzez rozdział elektroforetyczny przygotowanych próbek przy użyciu komercyjnych gotowych żeli Bolt™ 12%, Bis-Tris, Mini Protein Gels o grubości 1 mm. Rozdział przeprowadzałam przy stałym napięciu 170 V przez około 30 min, a do wizualizacji prążków białek zastosowałam barwienie w roztworze Coomassie Brilliant Blue G 250.

Analizę densytometryczną prążków w żelach wybarwionych Coomassie Brilliant Blue G 250 przeprowadziłam przy użyciu programu ImageJ [92][93]. Uzyskane wartości normalizowałam do poziomów sygnału białka BSA w każdej analizowanej ścieżce.

5. Wyniki

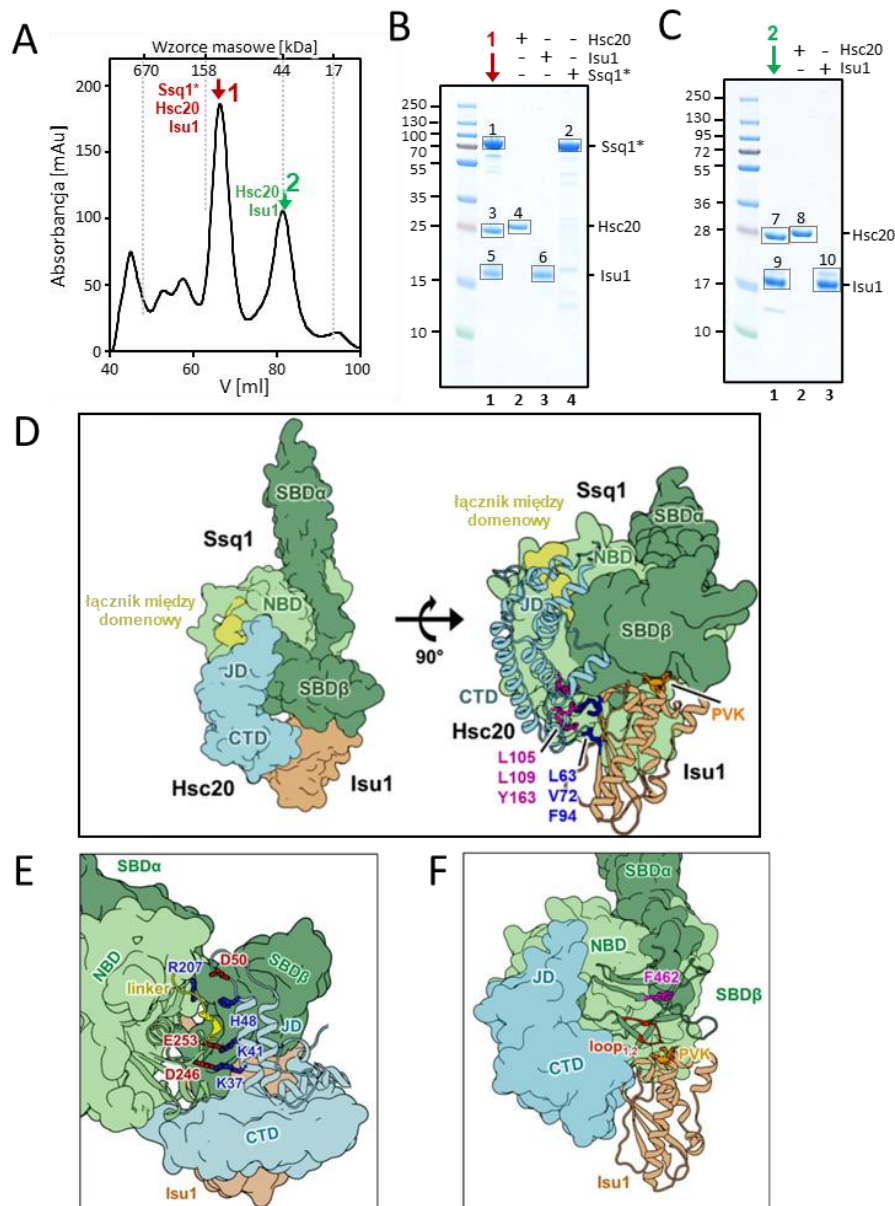
5.1. Wyniki uzyskane przez nasz zespół przed przystąpieniem do badań opisanych w tej rozprawie

Zainteresowania naszego zespołu koncentrują się na mechanizmie działania systemów JDP/Hsp70 w procesie biogenezy centrów FeS mając na uwadze dwa cele: (1) poznanie molekularnej funkcji tych systemów w procesie biogenezy FeS (2) wykorzystanie wyspecjalizowanych systemów Hsp70 zaangażowanych w bakteryjny i mitochondrialny proces biogenezy centrów FeS, jako modelu do poznania molekularnego mechanizmu cyklu wiązania substratu przez systemy JDP/Hsp70.

Zanim przystąpiłam do realizacji badań przedstawionych w tej rozprawie, nasz zespół opracował metody doświadczalne pozwalające na biochemiczną rekonstrukcję kluczowych kompleksów białkowych uczestniczących w cyklu wiązania substratu przez Hsc20/Hsp70. Stosując białko fuzyjne Isu1-GST (Isu^{GST}) precypitowano z roztworu kompleksy Hsc20-Isu^{GST} oraz Ssq1(ADP)-Isu^{GST} [91]. Wykorzystując mutanta Ssq1 niezdolnego do hydrolizy ATP Ssq1(T239A) precypitowano z mieszaniny reakcyjne potrójny kompleks Ssq1(ATP)-Hsc20-Isu^{GST} [95][106]. W dalszej części tej pracy wariant Ssq1 T239A będzie nazywany Ssq1*. Marcin Jeleń wykazał, że precypitacja potrójnego kompleksu nie jest możliwa, gdy jedno z oddziaływań pomiędzy tworzącymi go białkami: Hsc20-Isu1, Hsc20-Ssq1 oraz Isu1-Ssq1 jest zaburzone przez podstawienie kluczowych reszt aminokwasowych biorących udział w danym oddziaływaniu [106]. Dodatkowo potrójny kompleks Ssq1*(ATP)-Hsc20-Isu1 został wyizolowany z komórek *E. coli*, które nadprodukowały jego komponenty (Ryc. 8 A, B, C). Analiza spektrometrii mas w warunkach natywnych wykazała, że w wyizolowanym z bakterii potrójnym kompleksie białka Ssq1(ATP), Hsc20, Isu1 są w stechiometrii 1:1:1 [106]. Warto nadmienić, że jest to pierwszy przykład biochemicznej izolacji tego przejściowego kompleksu, będącego kluczowym etapem pośrednim cyklu wiązania substratu przez większość systemów Hsp70.

Igor Grochowina opracował model strukturalny potrójnego kompleksu opierając się na opublikowanym przez nasz zespół modelu kompleksu Hsc20-Ssq1(ATP) [106]. Stosując dokowanie molekularne oraz symulacje dynamiki molekularnej otrzymał model potrójnego kompleksu zgodny z wynikami doświadczeń biochemicznych. (Rycina 8 D,

E, F). Model ten został zweryfikowany poprzez analizę wymiany deuter-wodór (HDX-MS) przeprowadzoną przez Igora Grochowinę we współpracy z laboratorium spektrometrii mas IBB-PAN kierowanym przez prof. Michała Dadleza [106]. Manuskrypt opisujący przedstawione w tej rozprawie wyniki dotyczące biochemicznej rekonstrukcji potrójnego kompleksu został wysłany do Journal of Molecular Biology, Ref. [106] (Dostępny na SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4484948>).



Rycina 8. Oczyszczenie kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1 z komórek *E. coli*.

A. Wykres absorbancji przy długości fali 280 nm uzyskany podczas sączenia molekularnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1 oczyszczonego z komórek *E. coli* nadprodukujących białka Ssq1*, Hsc20 i Isu1 (szczyt zaznaczony czerwoną strzałką - 1) oraz kompleksu Hsc20-Isu1 (szczyt zaznaczony zieloną strzałką - 2) z zaznaczonymi wzorcami masowymi.

B i C. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) zagęszczonych frakcji z sączenia molekularnego zawierających potrójny kompleks Ssq1*-Hsc20-Isu1 (B - ścieżka zaznaczona czerwoną - 1) oraz frakcji zawierających kompleks Hsc20-Isu1 (C - ścieżka zaznaczona zieloną strzałką - 2). W pozostałych ścieżkach rozdzielono oczyszczone białka Hsc20, Isu1 i Ssq1*, w celu identyfikacji białek w kompleksach. Różnica w pozycji prążka reprezentującego oczyszczone białko Hsc20 w porównaniu z pozycją Hsc20 w kompleksach (prążki 4/3 oraz 7/8) wynika z obecności znacznika zawierającego sześć histydyń w oczyszczonym Hsc20. Białka wybarwione Coomassie Brilliant Blue G 250. Identyfikację białek w potrójnym i podwójnym kompleksie potwierdzono dodatkowo za pomocą spektrometrii mas.

D. (Lewa) Model strukturalny Ssq1-Hsc20-Isu1 uzyskany poprzez dokowanie Isu1 do wcześniej opublikowanego modelu kompleksu Ssq1-Hsc20 [74]. Pokazany model reprezentuje dominujący stan konformacyjny po symulacjach dynamiki molekularnej. Reprezentacja powierzchniowa pokazuje ogólną architekturę kompleksu: Ssq1 w konformacji związanej z ATP, subdomeny SBD α i SBD β (ciemnozielony) zadokowane do NBD (jasnozielony) i łącznik międzydomenowy (żółty) znajdujący się wewnątrz struktury NBD. Hsc20 (niebieski) oddziałuje z Ssq1 przez domenę J (JD) wiążącą się do miejsca oddziaływania pomiędzy domenami NBD i SBD β , Isu1 oddziałuje z domeną CTD Hsc20 (CTD). (Prawa) Struktura kompleksu Hsc20-Isu1 w potrójnym kompleksie pokazuje miejsca oddziaływania Hsc20-Isu1 i Ssq1-Isu1; reszty aminokwasowe L63, V72 i F94 białka Isu1 są w kontakcie z resztami LLY białka Hsc20 oraz pętla LPPVK (PVK) białka Isu1 znajduje się w pobliżu kieszeni wiążącej substrat SBD β .

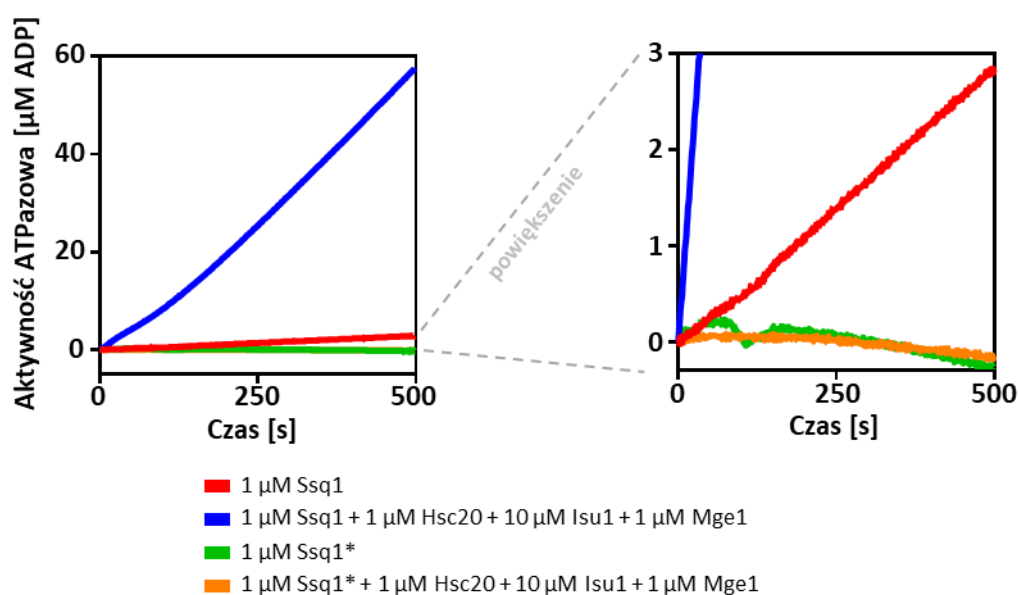
E. Oddziaływania pomiędzy domeną J (JD) a Ssq1. Zaznaczono reszty aminokwasowe JD (K37, K41, H48, D50) oddziałujące z resztami Ssq1 (D246, E253, R207).

F. Oddziaływania między pętlą LPPVK białka Isu1 a SBD β z Ssq1. Pętla LPPVK białka Isu1 znajduje się w pobliżu kieszeni wiążącej substrat SBD β .

5.2. Aktywność ATPazy Ssq1*

Badania prowadzone przez nasz zespół pokazały, że stosując wariant Ssq1*, w którym Thr239 została zastąpiona przez alaninę, można biochemicznie rekonstruować potrójny kompleks Ssq1*-Hsc20-Isu1^{GST} z zastosowaniem techniki precypitacji kompleksów białkowych [106]. Treonina w homologicznej pozycji innych białek Hsp70 jest kluczowa dla mechanizmu hydrolizy ATP [96][97]. Przy czym nie zawsze to podstawienie prowadzi do całkowitego zahamowania aktywności ATPazy - substytucje homologicznej reszty treoniny zarówno w wielofunkcyjnym białku DnaK jak też w wyspecjalizowanym białku HscA spowodowały obniżenie aktywności ATPazowej względem białek typu dzikiego [98][78]. Zaczynając prace nad projektem zmierzyłam aktywność ATPazy Ssq1* (Ryc. 9). Zastosowałam czułą metodę pomiaru hydrolizy ATP poprzez sprzężony system enzymów: kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej. Wykazałam, że oczyszczony wariant Ssq1* nie hydrolizuje ATP (Ryc. 9) w przeciwieństwie do preparatu natywnego białka Ssq1 (0.00015 $\mu\text{mol}/\text{min}$). Ponieważ aktywność ATPazy Ssq1 jest bardzo niska, podobnie jak innych Hsp70 [99][70][10], powtórzyłam pomiary w obecności białka JDP Hsc20, czynnika wymiany nukleotydu

Mge1 oraz substratu białkowego Isu1. Białka te synergicznie stymulują aktywność Ssq1 [71]. W tych warunkach szybkość hydrolizy ATP natywnego Ssq1 wzrosła 22 razy. Jednak w przypadku wariantu Ssq1* nie wykryłam mierzalnej hydrolizy ATP. Otrzymane wyniki pokazują, że wariant Ssq1* nie hydrolizuje ATP nawet w obecności białek pomocniczych i substratu. Ponieważ hydroliza ATP jest niezbędna do zmiany konformacji Hsp70 warunkującej dysocjację potrójnego kompleksu, otrzymany wynik może tłumaczyć stabilność potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1.



Rycina 9. Wpływ substytucji T239A na aktywność ATPazową Ssq1.

Aktywność ATPazowa Ssq1 i Ssq1* zarówno samych, jak i w obecności Hsc20, Isu1 i czynnika wymiany nukleotydów Mge1. Stężenie ATP w reakcji wynosiło 1 mM.

5.3. Oddziaływanie Isu1 z kieszenią wiążącą substrat domeny SBDβ Ssq1 jest niezbędne do formowania potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1^{GST}

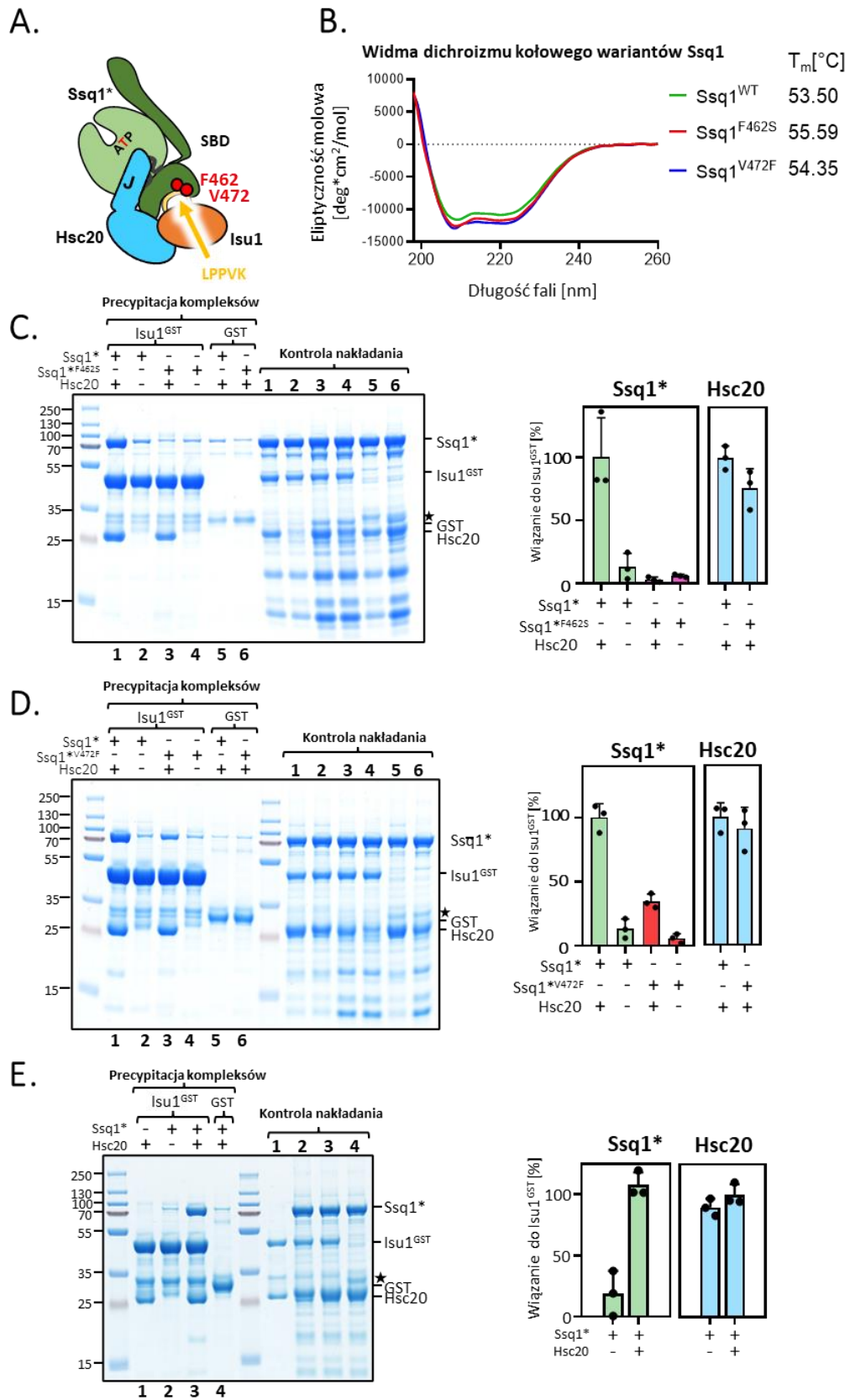
Wcześniejsze badania naszego zespołu pokazały, że sekwencja LPPVK białka Isu1, będąca miejscem jego oddziaływania z Ssq1, jest niezbędna do precypitacji potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1^{GST} [106]. Wymiana reszt PVK na AAA powodowała brak wiązania Ssq1* [106]. Jednak analiza modelu strukturalnego potrójnego kompleksu (Ryc. 8) pokazała, że w tym modelu sekwencja LPPVK znajduje się w pewnym oddaleniu od kieszeni wiążącej substrat. Pojawiło się więc pytanie, czy w czasie formowania potrójnego kompleksu, sekwencja LPPVK Isu1 oddziałuje z resztami aminokwasowymi znajdującymi się w obrębie kieszeni wiążącej substrat SBDβ. Aby na nie odpowiedzieć,

z badałam wpływ podstawienia dwóch reszt aminokwasowych znajdujących się w obrębie kieszeni wiążącej substrat (F462S i V472F, Ryc. 10 A). Homologiczne reszty występują u większości przedstawicieli rodziny Hsp70, a ich substytucje hamują wiązanie substratu [17][77].

Aby wykluczyć możliwość zaburzenia struktury drugorzędowej domeny SBD β -Ssq1 przez substytucje F462S i V472F, oczyściłam oba warianty tego białka i zmierzyłam widma dichroizmu kołowego (CD) (Ryc. 10 B). Pomiary wykonałam razem dr hab. Rafałem Dutkiewiczem, prof. UG. Otrzymane widma nie różniły się od widma kontrolnego natywnego Ssq1 - sugerując, że podstawienia nie wpływają na strukturę drugorzędową białka. Następnie, stosując pomiary CD przy stałej długości fali (220 nm) i wzrastającej temperaturze wyznaczyłam temperaturę topnienia T_m obu preparatów białkowych [Metody 4.6.]. Uzyskane wartości T_m były porównywalne do wartości otrzymanych dla natywnego Ssq1 (Ryc. 10 B). Wyniki te sugerują, że substytucje nie wpłynęły znacząco na strukturę i stabilność wariantów Ssq1.

Aby odpowiedzieć na pytanie, czy oddziaływanie kieszeni wiążącej substrat SBD β z Isu1 jest niezbędne do powstania potrójnego kompleksu, przeprowadziłam doświadczenia precypitacji kompleksów białkowych z wykorzystaniem białka fuzyjnego Isu1^{GST} oraz oczyszczonych wariantów Ssq1^{*F462S} oraz Ssq1^{*V472F} (Ryc. 10 C i D) [Metody 4.9.]. Przygotowałam mieszaniny reakcyjne zawierające Isu1^{GST}, do których dodałam białka Ssq1^{*F462S} oraz Ssq1^{*V472F} jak również Hsc20. Reakcje inicjowałam poprzez dodanie ATP (4 mM), a następnie inkubowałam mieszaniny w temperaturze 25°C przez 15 minut umożliwiając formowanie kompleksów białkowych. Po tym czasie dodawałam żelę agarozowe ze zredukowanym glutationem, w celu precypitacji Isu1^{GST} wraz ze związanymi z nim białkami. Uzyskane kompleksy białkowe analizowałam przy pomocy elektroforezy żelowej w warunkach denaturujących. Żele barwiłam Coomassie Brilliant Blue G 250. W obu przypadkach na żelu obserwowałam wyraźne prążki Isu1^{GST} oraz Hsc20 świadczące o oddziaływaniu obu białek (Ryc. 10 C, ścieżka 3 oraz Ryc. 10 D, ścieżka 3). Intensywność prążka odpowiadającego precypitowanemu Ssq1^{*F462S} nie różniła się od negatywnej reakcji kontrolnej, w której Isu1^{GST} zastąpiłam białkiem GST (Ryc. 10 C, odpowiednio ścieżki 3 i 6). Zaś intensywność prążka odpowiadającego precypitowanemu Ssq1^{*V472F} była obniżona o 70% w porównaniu z pozytywną reakcją kontrolną zawierającą Ssq1* (Ryc. 10 D, odpowiednio ścieżki 3 i 1).

Aby mieć pewność, że stosowane przeze mnie preparaty białkowe są w pełni aktywne przeprowadziłam doświadczenia kontrolne precypitacji potrójnego kompleksu. Inkubacja Ssq1*, Hsc20 oraz Isu1^{GST} skutkowała obecnością trzech wyraźnych prążków świadczących o wydajnej precypitacji potrójnego kompleksu (Ryc. 10 E, ścieżka 3) zgodnie z wynikami otrzymanymi poprzednio [106]. W reakcji kontrolnej zawierającej jedynie Isu1^{GST} i Hsc20 obserwowałam precypitację kompleksu Hsc20-Isu1^{GST} (Ryc. 10 E, ścieżka 1), zaś w mieszaninie zawierającej Isu1^{GST} oraz Ssq1* obserwowałam prążek Ssq1* na poziomie tła (negatywna kontrola z GST - Ryc. 10 E, ścieżka 4) świadczący o braku oddziaływania Ssq1* z Isu1^{GST} (Ryc. 10 E, ścieżka 2). Otrzymane wyniki pokazały, że oczyszczone przeze mnie preparaty białkowe są w pełni aktywne a oddziaływanie sekwencji LPPVK Isu1 w obrębie kieszeni wiążącej substrat Ssq1 jest niezbędne dla formowania potrójnego kompleksu.



Rycina 10.

A. Schemat potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1 z zaznaczonymi resztami aminokwasowymi krytycznymi dla wiązania substratu w obrębie kieszeni wiążącej substrat.

Motyw LPPVK znajdujący się na pętli Isu1 jest niezbędny dla formowania potrójnego kompleksu.

B. Widma dichroizmu kołowego (CD) oraz temperatury topnienia wariantów Ssq1^{F462S} i Ssq1^{V472F}.

Widma CD 5 μ M roztworów białek Ssq1^{WT}, Ssq1^{F462S} i Ssq1^{V472F}. Temperatury topnienia (T_m) wyznaczone na podstawie krzywych denaturacji uzyskanych poprzez pomiar CD przy długości fali 220 nm w zakresie temperatur 20–85°C.

C. Precypitacja potrójnego kompleksu w obecności Ssq1*^{F462S}.

(Lewa) Isu1^{GST} lub GST (2.5 μ M) inkubowano z (5 μ M) Ssq1*^{F462S} lub Ssq1* (kontrola pozytywna) oraz (2.5 μ M) Hsc20 – jak zaznaczono na Rycinie. Złoże opłaszczono zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji Isu1^{GST} oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Brilliant Coomassie Blue G 250. Symbol ★ oznacza produkt degradacji Isu1^{GST}. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej. (Prawa) Densytometryczna analiza ilości Ssq1*, Ssq1*^{F462S} oraz Hsc20 w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST dla trzech niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą Ssq1* lub Hsc20 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędu przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

D. Precypitacja potrójnego kompleksu w obecności Ssq1*^{V472F}.

(Lewa) Isu1^{GST} lub GST (2.5 μ M) inkubowano z (5 μ M) Ssq1*^{V472F} lub Ssq1* (kontrola pozytywna) oraz (2.5 μ M) Hsc20 – jak zaznaczono na Rycinie. Złoże opłaszczono zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji Isu1^{GST} oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Brilliant Coomassie Blue G 250. Symbol ★ oznacza produkt degradacji Isu1^{GST}. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej. (Prawa) Densytometryczna analiza ilości Ssq1*, Ssq1*^{V472F} oraz Hsc20 w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST dla trzech niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą Ssq1* lub Hsc20 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędu przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

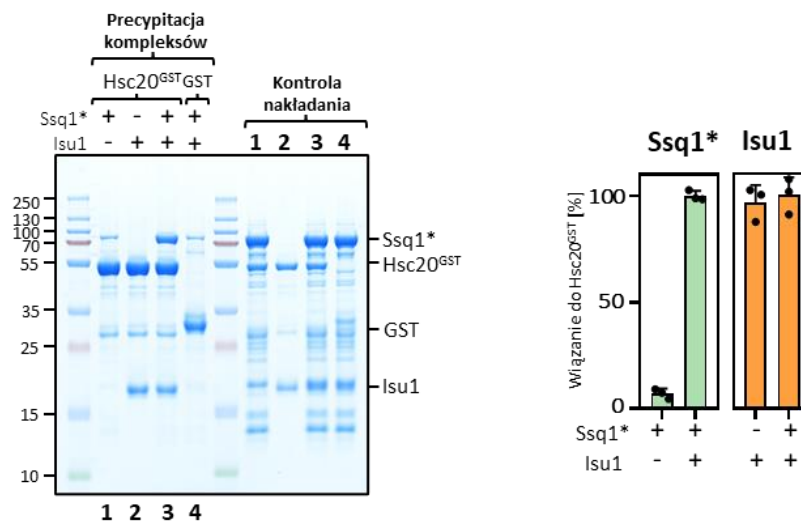
E. Precypitacja potrójnego kompleksu – reakcje kontrolne.

(Lewa) Isu1^{GST} lub GST (2.5 μ M) inkubowano z (5 μ M) Ssq1* oraz (2.5 μ M) Hsc20 – jak zaznaczono na Rycinie. Złoże opłaszczono zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji Isu1^{GST} oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250. Symbol ★ oznacza produkt degradacji Isu1^{GST}. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej. (Prawa) Densytometryczna analiza ilości Ssq1* oraz Hsc20 w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST dla trzech niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą Ssq1* lub Hsc20 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędu przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

5.4. Precypitacja potrójnego kompleksu z zastosowaniem białek fuzyjnych Hsc20^{GST} oraz GSTSsq1*

Stabilność potrójnego kompleksu otrzymanego w wyniku precypitacji białka fuzyjnego Isu1^{GST} jest zaskakująca biorąc pod uwagę, że w warunkach fizjologicznych jest to kompleks przejściowy i dotychczas nie udało się go zrekonstruować

biochemicznie. Powstało więc pytanie czy kompleks ten można precypitować stosując białka fuzyjne inne niż Isu1^{GST} - $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ oraz GSTSsq1^* . Oczyszczałam $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ ze znacznikiem GST na C-końcu białka i przeprowadziłam reakcje precypitacji potrójnego kompleksu inkubując to białko z Ssq1^* i Isu1 . Obecność w żelu SDS-PAGE barwionym Coomassie Brilliant Blue G 250 trzech prążków odpowiadających białkom Ssq1^* , $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ oraz Isu1 świadczy o wydajnej precypitacji potrójnego kompleksu (Ryc. 11, ścieżka 3). W reakcji kontrolnej pozbawionej Ssq1^* obserwowałam jedynie prążki $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ oraz Isu1 świadczące o powstaniu kompleksu $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ - Isu1 (Ryc. 11, ścieżka 2). Zaś w reakcji bez Isu1 intensywność prążka Ssq1^* była na poziomie tła, czyli wiązania Ssq1^* do GST (Ryc. 11, odpowiednio ścieżki 1 i 4) co świadczy o braku bezpośredniego wiązania Ssq1^* do $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$. Otrzymane wyniki pokazują, że precypitacja potrójnego kompleksu z zastosowaniem białka $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ jest równie wydajna jak przy zastosowaniu Isu1^{GST} .

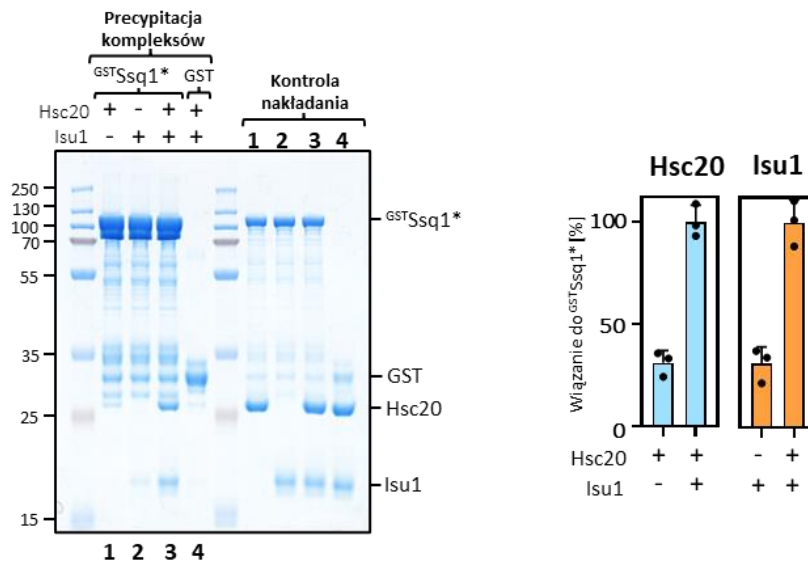


Rycina 11. Precypitacja potrójnego kompleksu z zastosowaniem $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$

(Lewa) $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ lub GST ($2.5 \mu\text{M}$) inkubowano z Ssq1^* ($5 \mu\text{M}$) oraz Isu1 ($5 \mu\text{M}$) – jak zaznaczono na Rycinie. Złóże opłaszczono zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej. (Prawa) Densytometryczna analiza ilości Ssq1^* oraz Isu1 w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST (kontrola negatywna) dla trzech niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą Ssq1^* lub Isu1 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędę przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Również w przypadku zastosowania fuzyjnego białka Ssq1^* ze znacznikiem GST na N-końcu białka (GSTSsq1^*) otrzymałam potrójny kompleks z wydajnością podobną do precypitacji z zastosowaniem Isu1^{GST} oraz $\text{Hsc20}^{\text{GST}}$ (Ryc. 12, ścieżka 3). W reakcjach kontrolnych, w których inkubowałam Hsc20 lub Isu1 z GSTSsq1^* obserwowałam prążek

Hsc20 (Ryc. 12, ścieżka 1), oraz prążek Isu1 (Ryc. 12, ścieżka 2). Jednak w obu przypadkach poziom precypitacji Hsc20 lub Isu1 z GST^{Ssq1*} był obniżony o ok. 75% w porównaniu do precypitacji tych białek w potrójnym kompleksie (Ryc. 12, ścieżka 3). W związku z tym pojawiło się pytanie czy białka Hsc20 i Isu1 wiążą się do GST^{Ssq1*} samodzielnie przy stężeniach wyższych niż stosowane w typowej reakcji precypitacji potrójnego kompleksu.

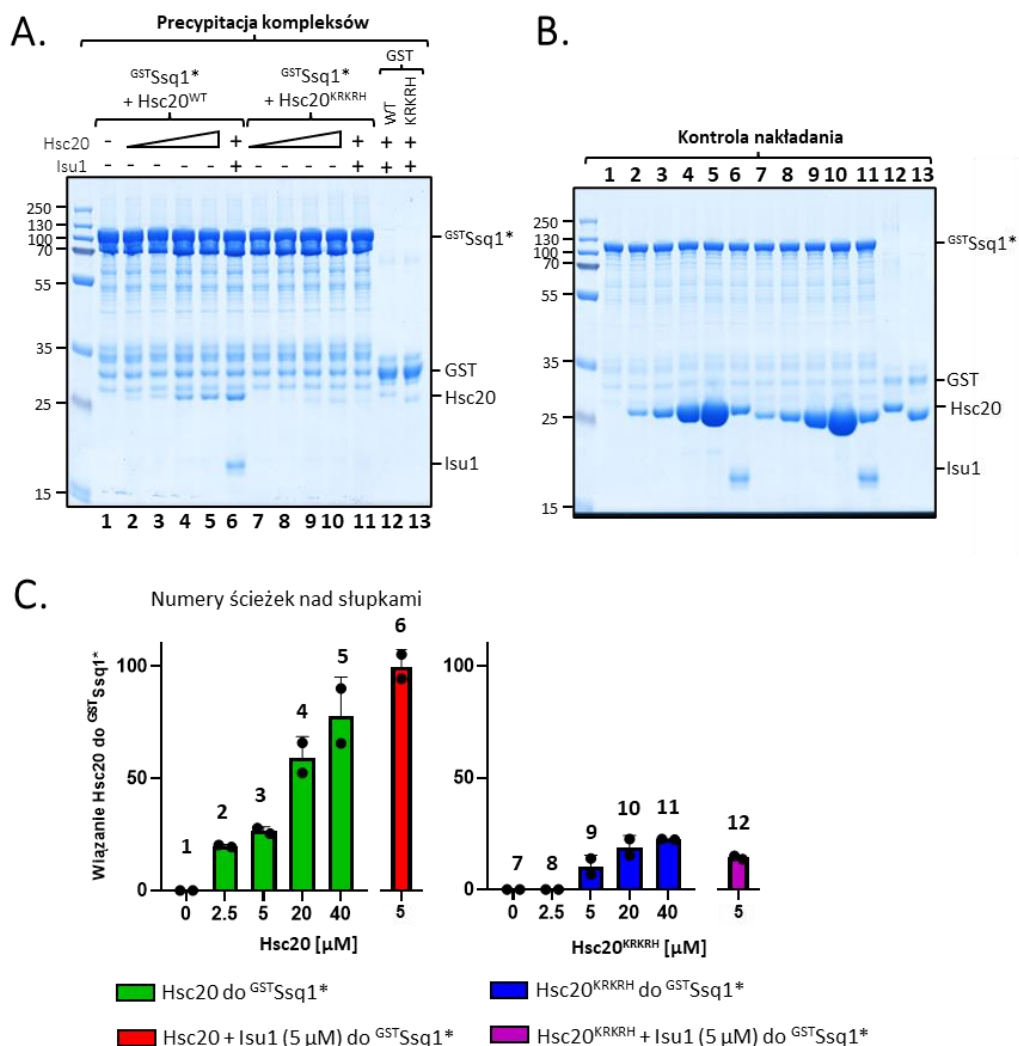


Rycina 12. Precypitacja potrójnego kompleksu z zastosowaniem GST^{Ssq1*} .

(Lewa) GST^{Ssq1*} lub GST (2.5 μM) inkubowano z Hsc20 (5 μM) oraz Isu1 (5 μM) – jak zaznaczono na Rycinie. Złoże opłaszczono zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji GST^{Ssq1*} oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej. (Prawa) Densytometryczna analiza ilości Hsc20 oraz Isu1 w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST (kontrola negatywna) dla trzech niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą Hsc20 lub Isu1 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Miareczkowanie Hsc20 w zakresie stężeń od 2.5 do 40 μM wykazało, że białko to samodzielnie oddziałuje z GST^{Ssq1*} (Ryc. 13, ścieżki 2-5), ale poziom tego oddziaływania jest niższy niż w przypadku obecności Isu1 w mieszaninie reakcyjnej (Ryc. 13, ścieżka 6). Przykładowo przy 40 μM stężeniu Hsc20 poziom wiązania Hsc20 do GST^{Ssq1} jest o 30% niższy niż w stężeniu 5 μM w obecności Isu1 (5 μM). Aby mieć pewność, że obniżony poziom wiązania Hsc20 reprezentuje specyficzne oddziaływanie z GST^{Ssq1*} jako negatywnej kontroli użyłam wariantu Hsc20 z podstawieniami w obrębie domeny J (Hsc20 K20A, R35A, K38A, R41A, H50A - Hsc20^{KRKRH}), które hamują jego oddziaływanie z Ssq1 [74] (Ryc. 13, ścieżki 7-11). Zastosowanie tej kontroli utwierdziło

mnie w przekonaniu, że przy braku Isu1 wiązanie Hsc20 z $^{GST}Ssq1^*$ jest specyficzne. Otrzymane wyniki pokazuje, że przy braku Isu1, Hsc20 wiąże się do $^{GST}Ssq1^*$ jedynie w wysokich, niefizjologicznych stężeniach, zaś w obecności Isu1 wydajne wiązanie zachodzi w fizjologicznych stężeniach Hsc20 (5 μM) [100].



Rycina 13. Precypitacja Hsc20 z $^{GST}Ssq1^*$ bez obecności Isu1.

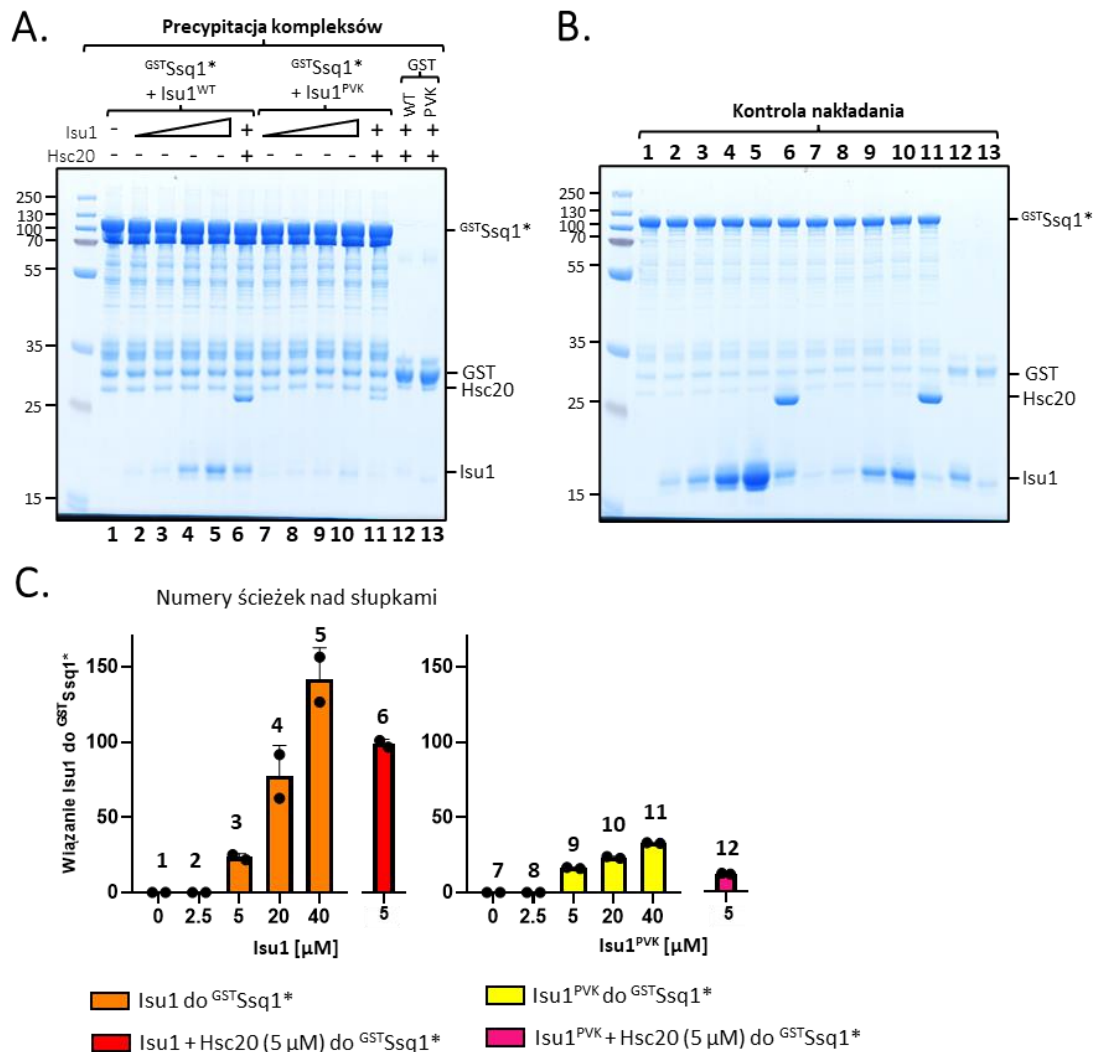
A. $^{GST}Ssq1^*$ lub GST (2.5 μM) inkubowano z wzrastającymi stężeniami Hsc20 lub Hsc20^{KRKRH} (0; 2.5; 5; 20; 40 μM). Złóże opłaszczane zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji $^{GST}Ssq1^*$ oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

B. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej.

C. Densytometryczna analiza ilości Hsc20 lub Hsc20^{KRKRH} w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST (kontrola negatywna) dla dwóch niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą ilość Hsc20 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z dwóch pomiarów.

Również miareczkowanie Isu1 w zakresie stężeń od 5 do 40 μM wykazało samodzielne wiązanie do $^{GST}Ssq1^*$ przy braku Hsc20 (Ryc. 14, ścieżki 3-5). W tym

przypadku przy 20 μM stężeniu Isu1 poziom wiązania był porównywalny do wiązania 5 μM Isu1 w obecności Hsc20 (5 μM). Aby mieć pewność, że obserwowane wiązanie jest specyficzne, jako kontrolę negatywną, zastosowałam wariant Isu1 (Isu1 P134A, V135A, K136A – Isu1^{PVK}), który nie oddziałuje z Ssq1 [76] (Ryc. 14, ścieżki 7-11). Otrzymane wyniki pokazują, że w warunkach doświadczalnych zastosowanych do precypitacji potrójnego kompleksu zarówno Hsc20 jak też Isu1 oddziałują samodzielnie z GST^{Ssq1}*, ale oddziaływania te wymagają wysokich, нефизjologicznych stężeń tych białek.



Rycina 14. Precypitacja Isu1 z GST^{Ssq1}* bez obecności Hsc20.

A. GST^{Ssq1}* lub GST (2.5 μM) inkubowano z wzrastającym stężeniem Isu1 lub Isu1^{PVK} (0; 2.5; 5; 20; 40 μM). Złóże opłaszczone zredukowanym glutationem dodano w celu precypitacji GST^{Ssq1}* oraz związanych z nim białek, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielono techniką SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

B. Kontrola nakładania stanowiła 5% wyjściowej objętości mieszaniny reakcyjnej.

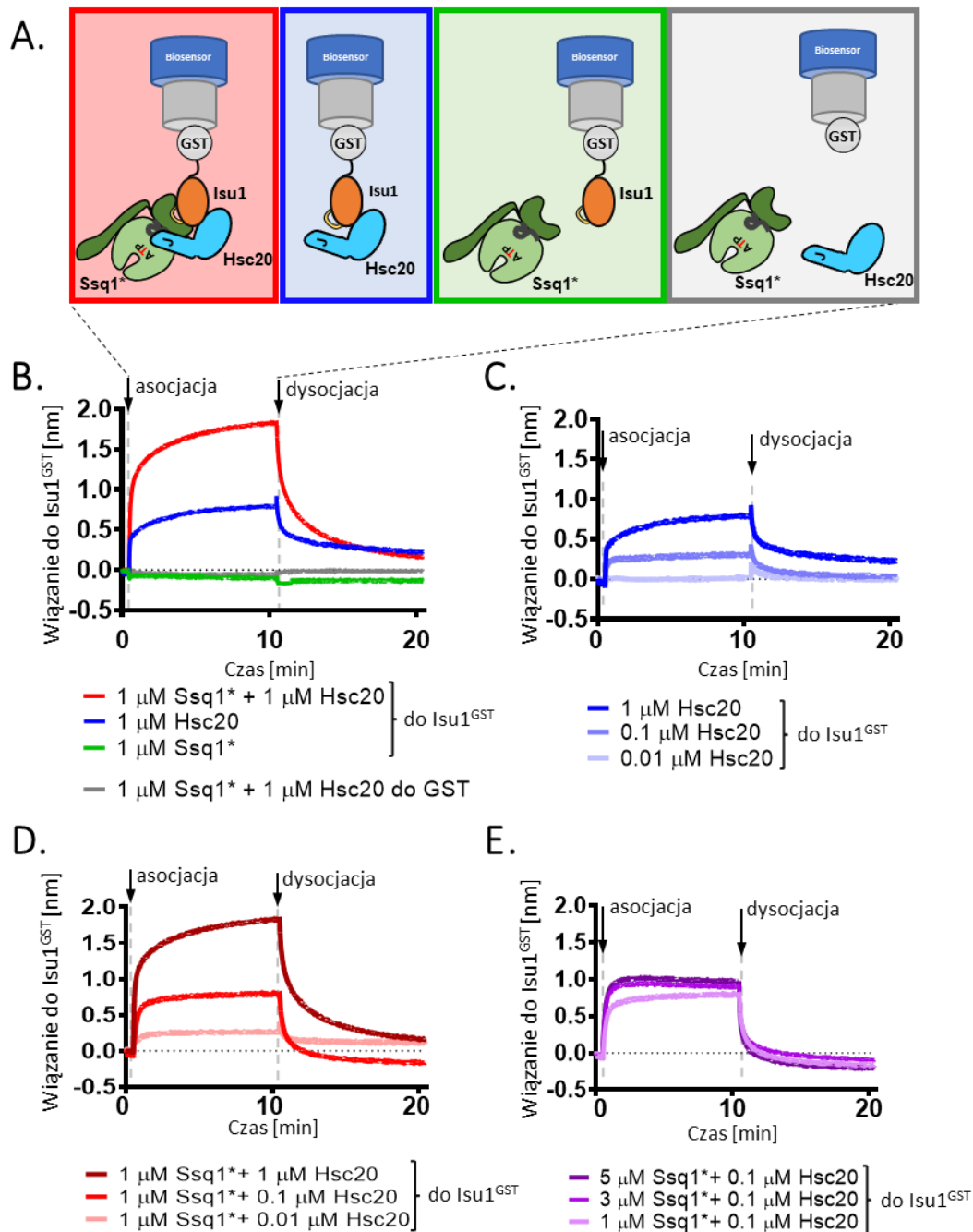
C. Densytometryczna analiza ilości Isu1 lub Isu1^{PVK} w precypitatach skorygowana o wiązanie białek do GST dla dwóch niezależnych doświadczeń. Wartość sygnału reprezentującą ilość Isu1 związanego w potrójnym kompleksie przyjęto jako 100%. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z dwóch pomiarów.

5.5. Kinetyka formowania potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1

Badania z wykorzystaniem techniki precypitacji kompleksów białkowych w warunkach równowagowych, nie informowały o kinetyce formowania potrójnego kompleksu. Tymczasem, jeżeli biochemiczna rekonstrukcja potrójnego kompleksu odzwierciedla proces jego formowania w komórce, to należało spodziewać się szybkiej kinetyki.

Kinetykę formowania potrójnego kompleksu badałam z zastosowaniem techniki interferometrii biowarstwy (ang. *Biolayer interferometry* – BLI). Do biosensora opłaszczanego przeciwciałami anty-GST immobilizowałam białko Isu1^{GST} lub GST (kontrola negatywna). Następnie zanurzałam biosensor w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Ssq1* (1 μ M) lub Hsc20 (1 μ M) lub zawierającej oba białka i rejestrowałam sygnał utworzonej biowarstwy w czasie (sensogram). W przypadku Ssq1* nie zaobserwowałam wzrostu sygnału, zgodnie z wynikami badań precypitacji kompleksów w niskich stężeniach Ssq1* (Ryc. 15 B). W przypadku Hsc20 zaobserwowałam szybki wzrost sygnału (Ryc. 15 B), który był proporcjonalny do stężenia Hsc20 w mieszaninie reakcyjnej (Ryc. 15 C). W przypadku mieszaniny zawierającej oba białka (Ssq1* (1 μ M) oraz Hsc20 (1 μ M)) obserwowałam szybki wzrost sygnału, który osiągał wartości wyższe niż te obserwowane dla samego Hsc20 (Ryc. 15 B). Ten wysoki sygnał interpretowałam jako formowanie potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1^{GST}. W kolejnych doświadczeniach sprawdziłam czy poziom sygnału odpowiadający formowaniu potrójnego kompleksu jest proporcjonalny do stężenia białek w mieszaninie reakcyjnej. W przypadku stałego 1 μ M stężenia Ssq1* oraz wzrastających stężeń Hsc20 (0.01; 0.1; 1 μ M) obserwowałam wzrost sygnału proporcjonalny do stężenia Hsc20 (Ryc. 15 D). Otrzymany wynik jest zgodny ze stechiometrią potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1 (1:1:1) - w tym przypadku czynnikiem limitującym wysokość sygnału było stężenie Hsc20. Następnie mierzyłam poziom sygnału przy 1 μ M stężeniu Hsc20 i wzrastających stężeniach Ssq1* (1; 3; 5 μ M). W każdym przypadku poziom sygnału był podobny – tutaj czynnikiem limitującym było 1 μ M stężenie Hsc20 (Ryc. 15 E). Specyficzność formowania potrójnego kompleksu weryfikowałam immobilizując do biosensora oczyszczone białko GST - nie obserwowałam wzrostu sygnału w obecności mieszaniny białek Hsc20 i Ssq1* (Ryc. 15 B). Otrzymane wyniki są zgodne z formowaniem na

biosensory z immobilizowanym białkiem Isu1^{GST} potrójnego kompleksu o stechiometrii 1:1:1.



Rycina 15.

A. Schemat oddziaływania białek Hsc20 i Ssq1* z Isu1^{GST} lub GST immobilizowanym do biosensora. Kolor ramki odpowiada kolorowi sensogramu (B)

B. Kinetyka formowania potrójnego kompleksu.

Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} lub GST był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Ssq1* (1 μM), Hsc20 (1 μM) lub oba białka Ssq1* i Hsc20 (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

C. Kinetyka wiązania Hsc20 do Isu1^{GST}.

Biosensory z immobilizowanym Isu1^{GST} były zanurzane w roztworach zawierających wzrastające stężenia Hsc20 (0.01; 0.1; 1 μM) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym Hsc20 (dysocjacja).

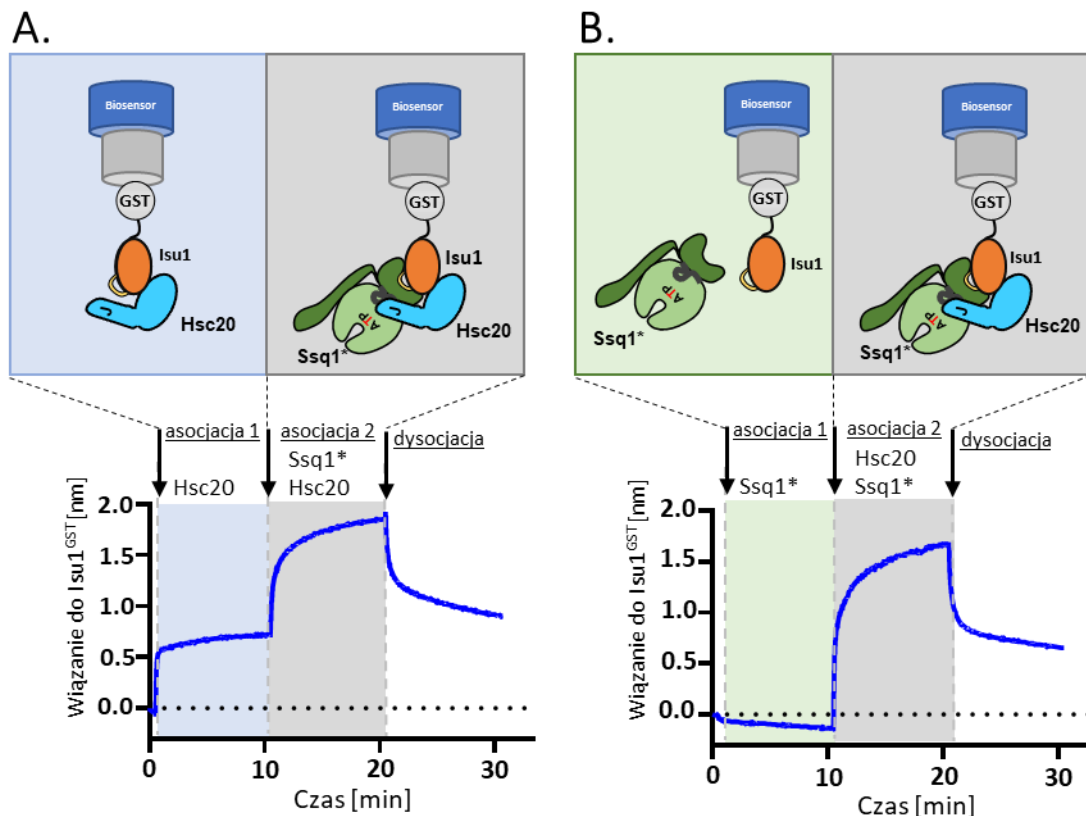
D. Kinetyka wiązania Ssq1* do Isu1^{GST} w obecności wzrastających stężeń Hsc20.

Biosensory z immobilizowanym Isu1^{GST} były zanurzane w roztworach zawierających Ssq1* (1 μ M) oraz wzrastające stężenie Hsc20 (0.01; 0.1; 1 μ M) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze bez białek (dysocjacja).

E. Kinetyka wiązania Hsc20 do Isu1^{GST} w obecności wzrastających stężeń Ssq1*.

Biosensory z immobilizowanym Isu1^{GST} były zanurzane w roztworze zawierającym Hsc20 (1 μ M) oraz wzrastające stężenia Ssq1* (1; 3; 5 μ M) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany do buforu bez białek (dysocjacja).

Analiza otrzymanych sensogramów wskazywała na dwufazową reakcję wiązania – szybkie wiązanie początkowe, po którym następowało wolniejsze wiązanie. Dlatego w kolejnym doświadczeniu podzieliłam fazę asocjacji na dwa etapy, podczas których, biosensor zanurzałam najpierw w roztworze Hsc20 lub Ssq1*, a następnie w roztworze obu białek, aby zapewnić utrzymanie równowagi wiązania z pierwszego etapu asocjacji (Ryc. 16). Gdy biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} umieściłam w roztworze Hsc20 (asocjacja 1), zaobserwowałam szybki wzrost sygnału, a gdy biosensor przeniosłam do roztworu zawierającego również Ssq1* (asocjacja 2) wzrost sygnału był wolniejszy (Ryc. 16 A). Sugeruje to szybkie formowanie kompleksu Hsc20-Isu1 (pierwszy etap), po którym następuje wolniejsze wiązanie Ssq1* do kompleksu Hsc20-Isu1 (drugi etap). Gdy kolejność została odwrócona, nie obserwowałam wiązania Ssq1* w pierwszym etapie, zaś podczas drugiego etapu, gdy obecny w mieszaninie był również Hsc20, zaobserwowałam efektywne formowanie potrójnego kompleksu (Ryc. 16 B). Otrzymane wyniki sugerują, że formowanie potrójnego kompleksu to proces dwuetapowy, zgodny ze schematem przebiegu cyklu wiązania Isu1 przez system Hsc20/Ssq1 zaprezentowanym na Ryc. 7. W pierwszym, bardzo szybkim, etapie Hsc20 wiąże Isu1, następnie kompleks Hsc20-Isu1 rekrutuje Ssq1, którego wiązanie jest wolniejsze.



Rycina 16. Dwuetapowa reakcja formowania potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1.

A. (Góra) Schemat oddziaływania białek Hsc20 i Ssq1* z Isu1^{GST} immobilizowanym do biosensora. (Dół) Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20 (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i Hsc20 (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

B. (Góra) Schemat oddziaływania białek Ssq1* i Hsc20 z immobilizowanym Isu1^{GST}. (Dół) Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Ssq1* (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i Hsc20 (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

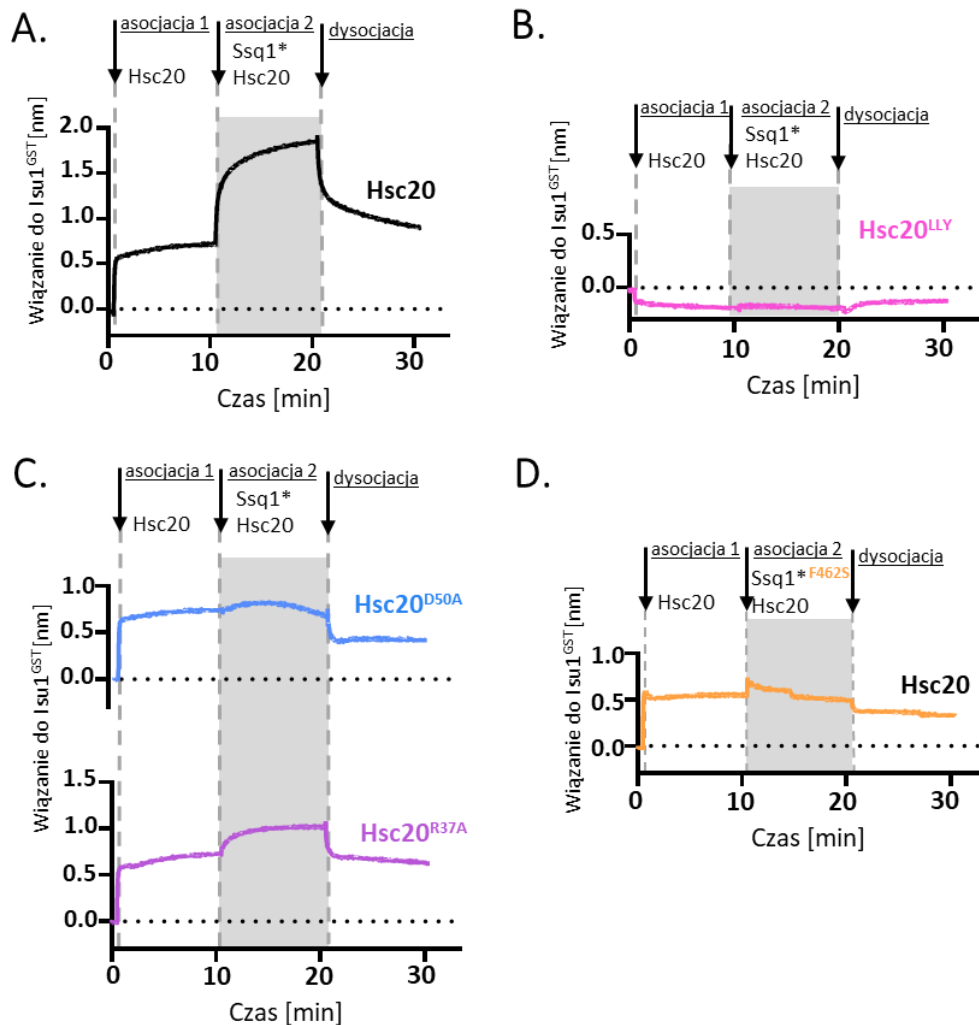
5.6. Zaburzenie oddziaływań pomiędzy komponentami hamuje formowanie potrójnego kompleksu

Badania z wykorzystaniem techniki precypitacji kompleksów białkowych wykazały, że w warunkach równowagowych, zaburzenie poszczególnych oddziaływań pomiędzy komponentami hamuje formowanie potrójnego kompleksu [106]. Dlatego zadałam pytanie, jak zaburzenia oddziaływań białko-białko wpływają na kinetykę formowania kompleksu potrójnego Ssq1*-Hsc20-Isu1. W tym celu wykorzystałam dwuetapowe wiązanie z zastosowaniem techniki BLI.

Znaczenie oddziaływania Hsc20-Isu1^{GST} badałam wykorzystując wariant białka Hsc20 (L105A, L109A, Y163A – Hsc20^{LLY}), którego zdolność oddziaływania z Isu1 jest znacznie osłabiona [61]. Biosensor, z immobilizowanym Isu1^{GST} zanurzyłam najpierw w roztworze zawierającym Hsc20^{LLY} (asocjacja 1), po 10 minutach w roztworze zawierającym Hsc20^{LLY} oraz Ssq1* (asocjacja 2). Na obu etapach sygnał pozostał na poziomie tła, co pokazuje, że wiązanie Hsc20-Isu1 jest niezbędne do formowania potrójnego kompleksu (Ryc. 17 B).

Następnie zbadalam wpływ oddziaływania Hsc20-Ssq1* (Ryc. 17 C). Wykorzystałam dwa warianty białka Hsc20 defektywne w tym oddziaływaniu: Hsc20(D50A) - substytucja w konserwowanym motywie HPD niezbędnym do oddziaływania z Hsp70, oraz wariant Hsc20(R37A) – substytucja pozytywnie naładowanej reszty helisy II domeny J zaangażowanej w oddziaływanie z Ssq1 [74]. Na pierwszym etapie asocjacji biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} zanurzyłam w roztworze zawierającym Hsc20^{D50A} lub Hsc20^{R37A}, na drugim etapie w roztworze zawierającym dodatkowo Ssq1*. Na pierwszym etapie obserwowałam wzrost sygnału typowy dla oddziaływania Hsc20-Isu1^{GST} dla obu wariantów Hsc20 (Ryc. 17 A i C, asocjacja 1) – wprowadzone substytucje nie wpływają na oddziaływanie z Isu1. Na drugim etapie wzrost sygnału był znacznie niższy niż w reakcji kontrolnej z natywnym Hsc20, co pokazuje, że zaburzenie oddziaływania Hsc20-Ssq1* hamuje formowanie potrójnego kompleksu (Ryc. 17 A i C, asocjacja 2).

W doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych wykazałam, że zaburzenie oddziaływania Ssq1*-Isu1 poprzez substytucję F462S w SBDβ białka Ssq1, hamowało formowanie potrójnego kompleksu. Dlatego wykorzystałam wariant Ssq1*^{F462S} do analiz kinetycznych. Na pierwszym etapie asocjacji biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} zanurzyłam w roztworze Hsc20, na drugim etapie w roztworze zawierającym dodatkowo Ssq1*^{F462S}. Wzrost sygnału na pierwszym etapie był typowy dla oddziaływania Hsc20-Isu1 (Ryc. 17 A i D, asocjacja 1). Na drugim etapie nie obserwowałam wzrostu sygnału co pokazuje, że oddziaływanie Ssq1*-Isu1 jest krytyczne dla formowania potrójnego kompleksu (Ryc. 17 D, asocjacja 2).



Rycina 17. Wpływ zaburzenia oddziaływania białko-białko na kinetykę formowania potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1.

A. Reakcja kontrolna dwuetapowego formowania potrójnego kompleksu.

Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20 (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i Hsc20 (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

B. Wpływ zaburzenia oddziaływania Hsc20-Isu1 na kinetykę formowania potrójnego kompleksu.

Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20^{LLY} (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i Hsc20^{LLY} (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

C. Wpływ zaburzenia oddziaływania Hsc20-Ssq1 na kinetykę formowania potrójnego kompleksu.

(Góra) Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20^{D50A} (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i Hsc20^{D50A} (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja). (Dół) Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20^{R37A} (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i Hsc20^{R37A} (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

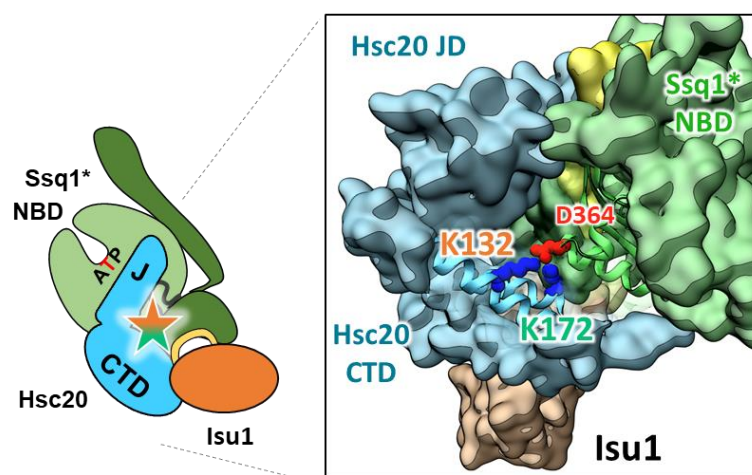
D. Wpływ zaburzenia oddziaływania Ssq1-Isu1 na kinetykę formowania potrójnego kompleksu.

Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20 (1 μ M) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1^{*F462S} (1 μ M) i Hsc20 (1 μ M) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

Otrzymane wyniki pokazały, że zaburzenie oddziaływań białko-białko pomiędzy komponentami potrójnego kompleksu hamuje jego formowanie. Wyniki te są zgodne z otrzymanymi z zastosowaniem techniki precipitacji kompleksów białkowych [106].

5.7. Nowe oddziaływanie pomiędzy domeną CTD Hsc20 a domeną NBD Ssq1 wpływa na kinetykę i wydajność formowania potrójnego kompleksu

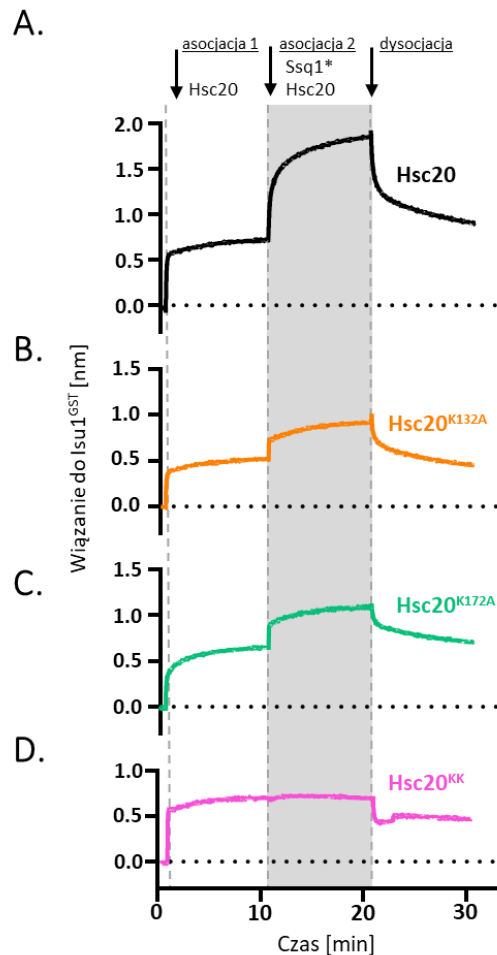
Szczegółowa analiza modelu strukturalnego potrójnego kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1 zasugerowała możliwość istnienia dodatkowego miejsca oddziaływania pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami K132 i K172 domeny CTD białka Hsc20 a ujemnie naładowaną resztą D364 domeny NBD białka Ssq1 (Ryc. 18). Doświadczenia precipitacji kompleksów białkowych z użyciem wariantów białka Hsc20 zawierających pojedyncze substytucje K132A oraz K172A, jak również wariantu z obiema substytucjami pokazały, że hamują one wydajność formowania potrójnego kompleksu [106].



Rycina 18. Fragment modelu strukturalnego potrójnego kompleksu przedstawiający dodatkowe miejsce oddziaływania pomiędzy CTD Hsc20 i NBD Ssq1.

Reszty K132 i K172 znajdujące się w obrębie domeny CTD Hsc20 oddziałują elektrostatycznie z resztą D364 domeny NBD Ssq1.

Aby zbadać wpływ dodatkowego oddziaływania na kinetykę formowania potrójnego kompleksu, wykorzystałam trzy warianty Hsc20: Hsc20^{K132A}, Hsc20^{K172A} oraz Hsc20^{KK} (K132A, K172A). Biosensor z immobilizowanym białkiem Isu1^{GST} zanurzyłam najpierw w mieszaninie zawierającej analizowany wariant Hsc20 (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej dodatkowo Ssq1* (asocjacja 2) (Ryc. 19). Na pierwszym etapie obserwowałam wzrost sygnału typowy dla oddziaływania Hsc20-Isu1 - oddziaływanie to nie było zaburzone w analizowanych wariantach Hsc20 (Ryc. 19, asocjacja 1). Na drugim etapie w przypadku podwójnego mutantu Hsc20^{KK} nie obserwowałam wzrostu sygnału, co świadczy o zahamowaniu wiązania Ssq1* (Ryc. 19 D, asocjacja 2). Zaś w przypadku wariantów z pojedynczymi podstawieniami sygnał był obniżony o 70% w porównaniu do reakcji kontrolnej z Hsc20 (Ryc. 19 B i C, asocjacja 2).



Rycina 19. Wpływ oddziaływania między CTD Hsc20 i NBD Ssq1 na kinetykę formowania potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1.

Biosensor z immobilizowanym Isu1^{GST} był zanurzany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej Hsc20, Hsc20^{K132A}, Hsc20^{K172A} lub Hsc20^{KK} (1 μM) (asocjacja 1), a następnie w mieszaninie zawierającej Ssq1* (1 μM) i analizowany wariant Hsc20 (1 μM) (asocjacja 2). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja).

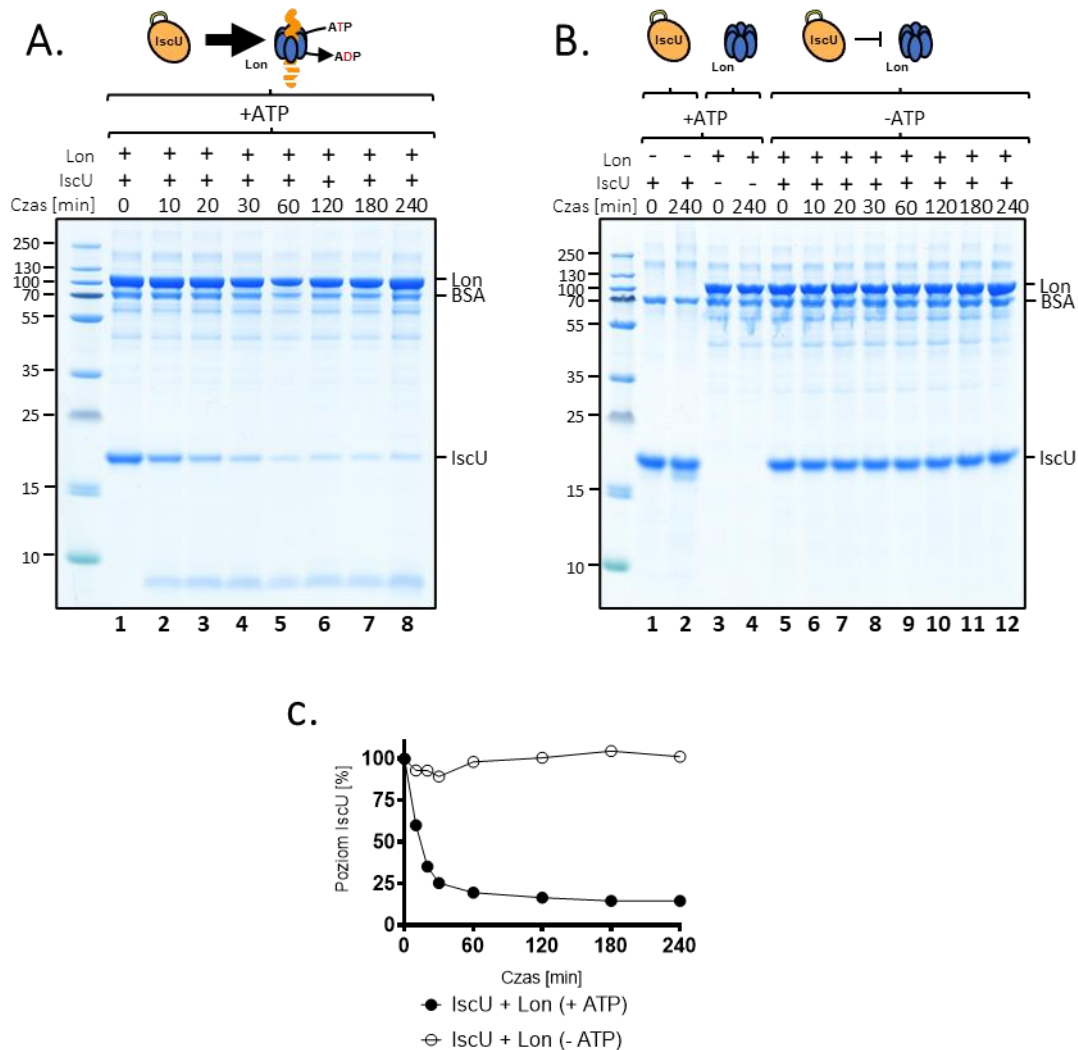
Uzyskane wyniki pokazują, że dodatkowe oddziaływanie pomiędzy Hsc20 i Ssq1 jest niezbędne dla formowania potrójnego kompleksu. Analizy ewolucyjne przeprowadzone przez nasz zespół pokazały, że reszty (K132 i K172) zaangażowane w dodatkowe oddziaływanie Hsc20-Ssq1* nie są obecne w białkach Hsc20, które w procesie biogenezy FeS współpracują z wielofunkcyjnym mitochondrialnym mtHsp70. Podobnie, reszta homologiczna do D364 Ssq1* nie występuje w mtHsp70. Tak więc dodatkowe oddziaływanie jest cechą specyficzną dla wyspecjalizowanego systemu Hsc20/Ssq1 i może tłumaczyć jego niezwykłą stabilność w porównaniu z innymi systemami JDP/Hsp70.

5.8. Proteaza Lon degraduje bakteryjne IscU

W mitochondriach drożdży rola systemu Hsc20/Ssq1 w procesie biogenezy FeS nie ogranicza się do udziału w przenoszeniu centrów z białka rusztowania Isu1 na białka docelowe. Badania biochemiczne pokazały, że wiązanie Isu1 do Hsc20 chroni białko rusztowanie przed degradacją katalizowaną przez ATP zależną proteazę Pim1 będącą ortologiem bakteryjnej proteazy Lon [101]. Isu1 ma krótki okres półtrwania w komórce, wynoszący ok. 30 minut, który wynika z degradacji Isu1 przez proteazę Pim1 [83]. Dotychczas nie wiadomo, czy podatność Isu1 na proteolizę oraz zdolność Hsc20 do ochrony Isu1 przed degradacją to cechy jedynie drożdżowego systemu biogenezy FeS. Biorąc pod uwagę zależności filogenetyczne pomiędzy drożdżami a innymi organizmami, u których funkcjonuje homologiczny system biogenezy FeS, można rozpatrywać dwa scenariusze ewolucyjne: (1) proteoliza Isu1 oraz ochrona przed degradacją są unikatową cechą systemu drożdżowego (2) właściwości te pojawiły się u bakterii i zostały odziedziczone przez pochodzące od nich mitochondria. Aby zweryfikować te hipotezy oczyściłam bakteryjne białka Hsp70 HscA, JDP HscB oraz białko rusztowanie IscU. Preparat bakteryjnej proteazy Lon otrzymałam od dr Katarzyny Węgrzyn z laboratorium prof. Igora Koniecznego, które od wielu lat bada rolę proteazy Lon w komórkach *E. coli* zarówno w warunkach fizjologicznych jak też w stresie [94][102].

Inkubacja oczyszczonej proteazy Lon (1.25 μM) z IscU (7.5 μM) w obecności ATP (4 mM) prowadziła do szybkiej degradacji IscU (Ryc. 20). Po 30 min poziom IscU był niższy o ok. 75% (Ryc. 20 A, ścieżka 4), a po 2 godzinach poziom niezdegradowanego

IscU wynosił ok. 16% (Ryc. 20 A, ścieżka 6) i nie uległ zmianie przez kolejne 2 godziny (Ryc. 20 A, ścieżki 7 i 8). W kontrolnych reakcjach, w których inkubowałam IscU bez proteazy Lon (Ryc. 20 B, ścieżki 1 i 2), oraz w obecności proteazy, ale bez ATP poziom IscU nie uległ zmianie (Ryc. 20 B, ścieżki 5-12). Uzyskane wyniki sugerują, że IscU jest wydajnie degradowane przez proteazę Lon w ATP zależnej reakcji.



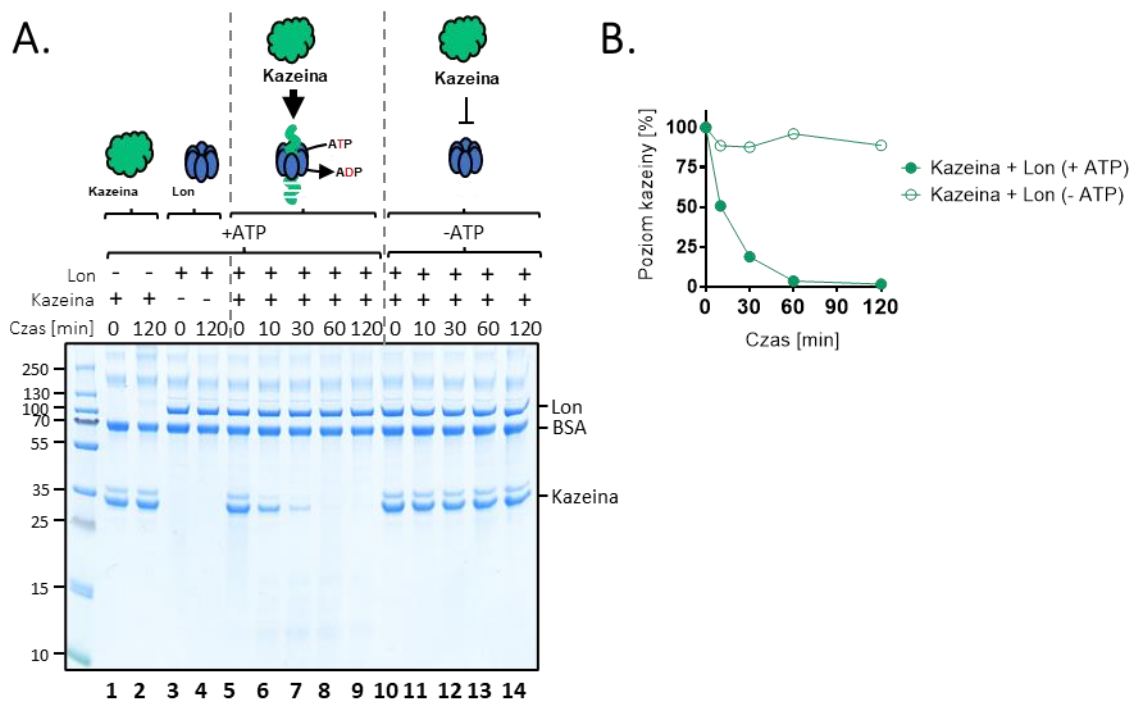
Rycina 20. Proteoliza IscU przez proteazę Lon.

A i B. IscU (7.5 μ M) inkubowano samo lub w obecności Lon (1.25 μ M) z 4 mM ATP (+ATP) (A) lub bez (-ATP) (B). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję mieszaniny reakcyjnej, rozdzielano w żelu akrylamidowym (SDS-PAGE) i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

C. Densytometryczna analiza ilości IscU w mieszaninie reakcyjnej skorygowana o intensywność prążka odpowiadającego BSA, który służył jako kontrola nakładania próby na żel. Poziom IscU w czasie 0 przyjęto jako 100%.

Aby porównać szybkość proteolizy IscU do proteolizy modelowego substratu jakim dla proteazy Lon jest kazeina, przeprowadziłam reakcje degradacji kazeiny. Już po 10 minutach poziom kazeiny w reakcji spadł o ok. 50% (Ryc. 21 A, ścieżka 6), a po

dwóch godzinach kazeina uległa całkowitej degradacji. W reakcjach kontrolnych (1) bez obecności Lon (Ryc. 21 A, ścieżki 1 i 2) oraz (2) w obecności Lon, ale bez ATP (Ryc. 21 A, ścieżki 10-14) poziom kazeiny nie uległ zmianie. Otrzymane wyniki pokazały, że zastosowane przez mnie warunki reakcji są optymalne dla proteazy Lon, o czym świadczy kompletna degradacja kazeiny. Pokazały również, że IscU nie jest „idealnym” substratem dla proteazy Lon, ponieważ nawet po 4-godzinnej inkubacji w mieszaninie reakcyjnej pozostaje niezdegradowane białko (Ryc. 20 A, ścieżka 8).

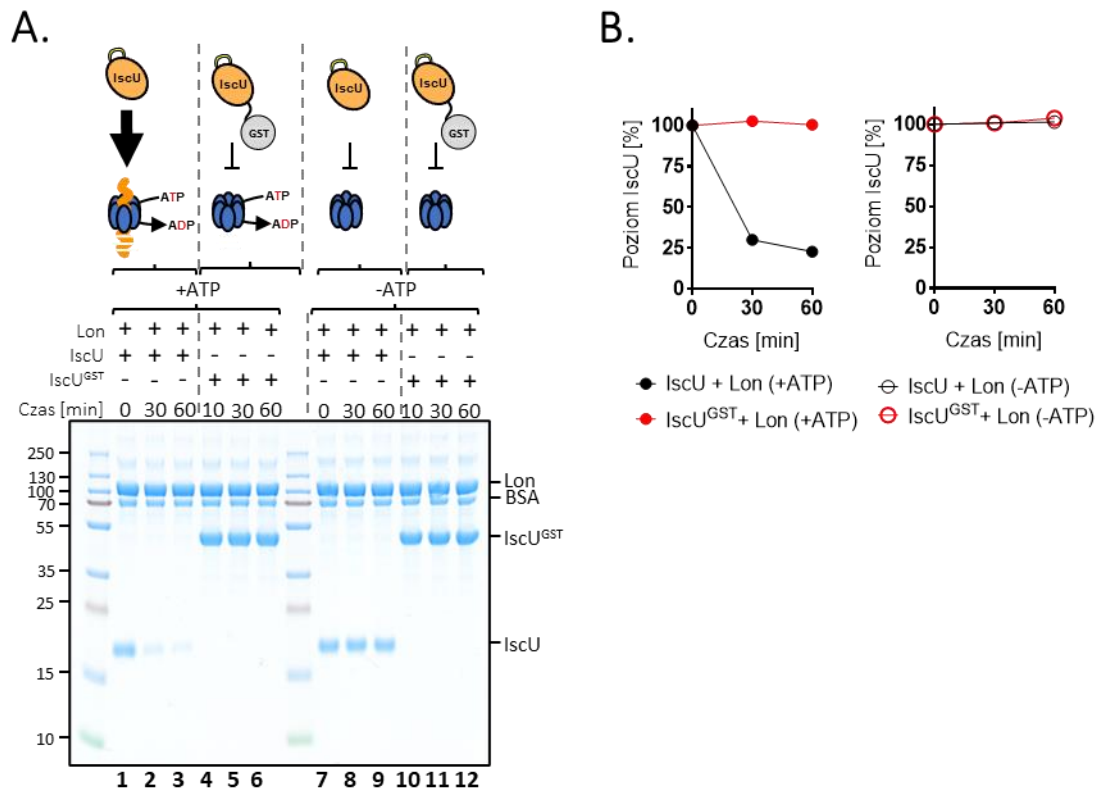


Rycina 21. Proteoliza kazeiny przez Lon.

A. Kazeinę (7.5 μM) inkubowano w obecności Lon (1.25 μM) z 4 mM ATP (+ATP) lub bez (-ATP). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano za pomocą SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

B. Densytometryczna analiza ilości kazeiny. Poziom kazeiny w czasie 0 przyjęto jako 100%.

Następnie zadałam pytanie, czy proteaza Lon degraduje IscU w fuzji z GST (IscU^{GST}), które zamierzałam stosować w doświadczeniach mających na celu biochemiczną rekonstrukcję kompleksów IscU z białkami opiekuńczymi HscB i HscA. Inkubacja IscU^{GST} z proteazą Lon i ATP wykazała, że białko fuzyjne nie jest degradowane (Ryc. 22 A, ścieżki 4-6).



Rycina 22. IscU^{GST} nie jest degradowane przez Lon.

A. IscU lub IscU^{GST} (7.5 μ M) inkubowano w obecności Lon (1.25 μ M) z 4 mM ATP (+ATP) lub bez (-ATP). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano w żelu akrylamidowym (SDS-PAGE) i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

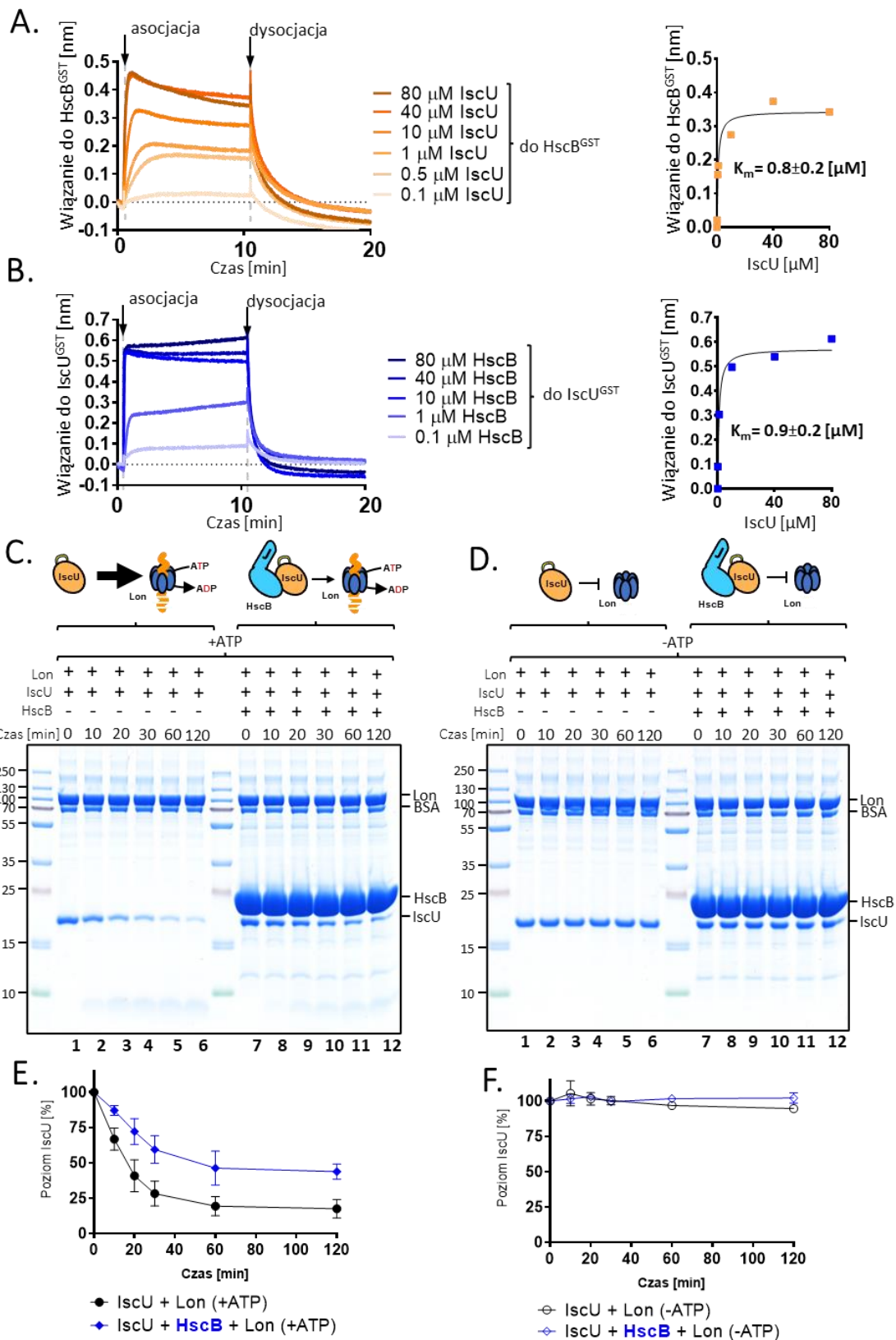
B. Densytometryczna analiza ilości IscU i IscU^{GST} w reakcji z ATP (lewa) lub bez (prawa), po korekcie na poziom BSA w mieszaninie, który służył jak kontrola nanoszenia próby. Poziom IscU w czasie 0 przyjęto jako 100%.

5.9. Białka opiekuńcze HscB/HscA chronią IscU przed proteolizą

Moim kolejnym celem było sprawdzenie czy oddziaływanie IscU z HscB i HscA chroni to białko przed degradacją przez proteazę Lon. Przed przystąpieniem do badania wpływu oddziaływania HscB z IscU na degradację IscU przez proteazę Lon, określiłam powinowactwo HscB do IscU stosując technikę BLI. Do biosensora opłaszczonego przeciwciałami anti-GST immobilizowałam białko HscB^{GST}. (Ryc. 23 A) lub IscU^{GST} (Ryc. 23 B). Następnie zanurzałam sensor z w mieszaninie reakcyjnej zawierającej wzrastające stężenia (10-80 mM) odpowiednio IscU lub HscB i rejestrowałam poziom utworzonej biowarstwy. W obu przypadkach obserwowałam szybki wzrost sygnału proporcjonalny do stężenia białka w roztworze. Na podstawie wartości sygnału w ostatnim punkcie pomiarowym asocjacji (10 min), wyznaczyłam stałą K_m na podstawie

równania Michaelisa-Menten $Y=V_m*X/(K_m+X)$ dopasowanego do punktów pomiarowych (Ryc. 23 A i B, po prawej). Wartości K_m , będące miarą powinowactwa pomiędzy oddziałującymi białkami wniosły odpowiednio: 0.9 μM dla HscB oddziałującego z IscU^{GST} oraz 0.8 μM dla IscU oddziałującego z HscB^{GST}. Otrzymane wartości K_m pokazały, że powinowactwo pomiędzy IscU i HscB nie jest wysokie. Co oznaczało, że w doświadczeniach mających na celu określenie roli tego oddziaływania w ochronie IscU przed degradacją proteolityczną należy zastosować znaczny nadmiar HscB tak aby większość IscU była w kompleksie z HscB.

Badając wpływ HscB na degradację IscU przez Lon, białko IscU inkubowałam z nadmiarem HscB (50 μM) przez 10 min, a następnie dodałam proteazę Lon i inkubowałam w obecności ATP (Ryc. 23 C). W porównaniu do degradacji IscU bez HscB, poziom IscU w reakcji z HscB spadł do 50% po godzinie inkubacji z Lon (Ryc. 23 C, ścieżka 11) i utrzymywał stałą wartość przez kolejną godzinę (Ryc. 23 C, ścieżka 12), podczas gdy w reakcji kontrolnej bez HscB, poziom IscU spadł do 15 % (Ryc. 23 C, ścieżki 5 i 6). W kontrolnej reakcji bez ATP poziom IscU nie uległ zmianie zarówno w reakcji bez HscB (Ryc. 23 D, ścieżki 1-6), jak i w obecności HscB (Ryc. 23 D, ścieżki 7-12). Warto podkreślić, że obecność Lon nie wpływała na poziom HscB w reakcji, co pokazuje, że białko to nie jest substratem proteazy.



Rycina 23. HscB chroni IscU przed degradacją przez proteazę Lon.

A. Kinetyka wiązania IscU do HscB^{GST}.

(Lewa) Biosensory z immobilizowanym HscB^{GST} były zanurzone w roztworach zawierających wzrastające stężenia IscU (0.1; 0.5; 1; 10; 40; 80 μM) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był

zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja). (Prawa) Sygnał wiązania IscU do HscB^{GST} w ostatnim punkcie pomiarowym asocjacji od stężenia IscU.

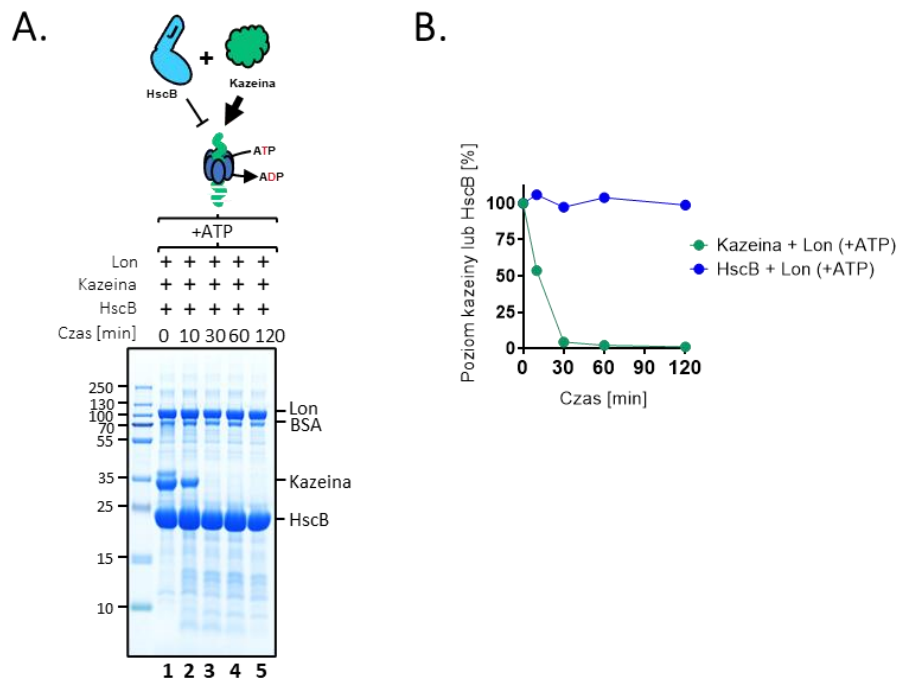
B. Kinetyka wiązania HscB do IscU^{GST}.

(Lewa) Biosensory z immobilizowanym IscU^{GST} były zanurzane w roztworach zawierających wzrastające stężenia HscB (0.1; 1; 10; 40; 80 μM) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja). (Prawa) Sygnał wiązania HscB do IscU^{GST} w ostatnim punkcie pomiarowym asocjacji od stężenia HscB.

C i D. IscU (7.5 μM) inkubowano w obecności Lon (1.25 μM) samo lub w obecności HscB (50 μM) z 4 mM ATP (+ATP) (C) lub bez (-ATP) (D). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano za pomocą SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

E. i F. Densytometryczna analiza ilości IscU w reakcji z ATP (E) lub bez ATP (F). Poziom IscU w czasie 0 przyjęto jako 100%. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Następnie przeprowadziłam doświadczenie kontrolne, które miało na celu sprawdzenie czy obecność wysokiego stężenia HscB w mieszaninie reakcyjnej nie hamuje proteazy Lon. Kazeinę inkubowałam z HscB (50 μM) przez 10 min, a następnie dodałam proteazę Lon i inkubowałam w obecności ATP (Ryc. 23 C). W obecności HscB kazeina ulegała degradacji (Ryc. 24, ścieżki 1-5), tak jak w reakcji bez HscB (Ryc. 21 A, ścieżki 5-8). Białko HscB nie ulegało degradacji (Ryc. 24 A, ścieżki 1-5). Otrzymany wynik pokazał, że HscB nie hamuje proteazy Lon oraz nie jest substratem tej proteazy.



Rycina 24. Proteoliza kazeiny przez Lon w obecności HscB.

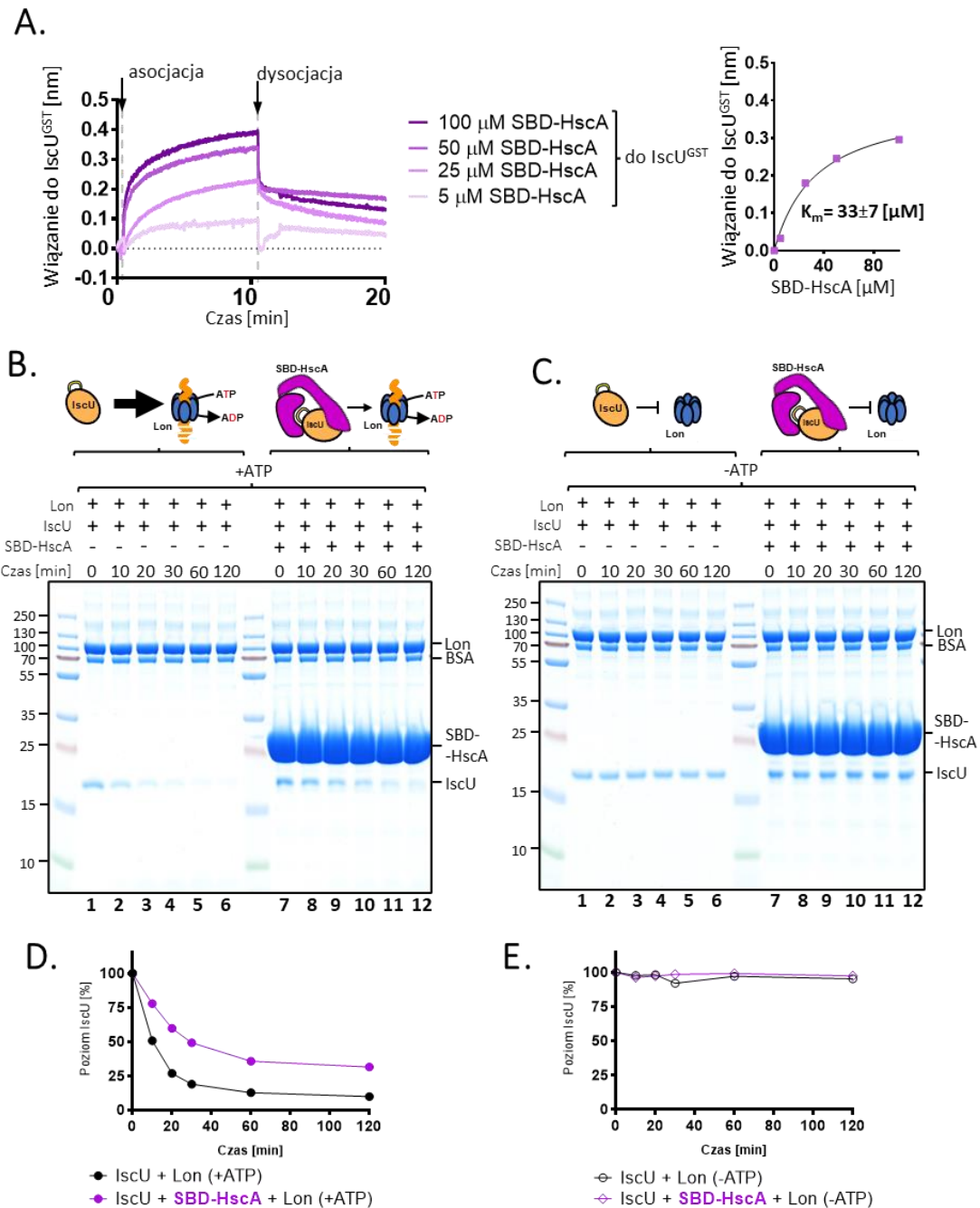
A. Kazeinę (7.5 μM) oraz HscB (50 μM) inkubowano w obecności Lon (1.25 μM) z 4 mM ATP (+ATP) lub bez (-ATP). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano za pomocą SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

B. Densytometryczna analiza ilości kazeiny i HscB. Poziom kazeiny lub HscB w czasie 0 przyjęto jako 100%.

Moim następnym celem była odpowiedź na pytanie czy kompleks HscA(ADP)-IscU, który jest końcowym produktem cyklu wiązania IscU przez system HscB/HscA, chroni IscU przed degradacją przez Lon. Aby na nie odpowiedzieć nie mogłam inkubować kompleksu HscA(ADP)-IscU z proteazą Lon, ponieważ w obecności ATP niezbędnego dla aktywności proteolitycznej, kompleks ten uległby dysocjacji. W związku z tym w doświadczeniach, w których badałam wpływ HscA na degradację IscU zastosowałam oczyszczoną domenę wiążącą substrat białka HscA (SBD-HscA).

Aby określić powinowactwo domeny SBD-HscA do IscU do biosensora opłaszczonego przeciwciałami anti-GST immobilizowałam białko IscU^{GST}. Następnie zanurzałam sensor w mieszaninie reakcyjnej zawierającej SBD-HscA we wzrastających stężeniach i rejestrowałam poziom biowarstwy. W przypadku tego oddziaływania wyznaczona wartość K_m wynosiła 33 μM , tak więc powinowactwo SBD-HscA do IscU było ok. 40 razy niższe niż powinowactwo HscB. Przy czym szybkość wiązania SBD-HscA do IscU^{GST} była niższa niż w przypadku HscB i w czasie 10 minut sygnał wiązania nie uległ wysyceniu. Z przyczyn technicznych nie mogłam wykonać tych doświadczeń dla dłuższych czasów wiązania. W związku z tym uznałam, że wyznaczona wartość K_m jest zgrubną miarą powinowactwa obu białek (Ryc. 25 A).

Badając wpływ SBD-HscA na degradację IscU przez Lon zastosowałam 50 μM stężenie, to samo, które zastosowałam w przypadku HscB (Ryc. 25 B). W obecności SBD-HscA poziom IscU spadł o ok. 60% po godzinie inkubacji z Lon (Ryc. 25 B, ścieżka 11) i utrzymywał stałą wartość przez kolejną godzinę (Ryc. 25 B, ścieżka 12), podczas gdy poziom IscU bez SBD-HscA w reakcji spadł po godzinie do 10% (Ryc. 25 B, ścieżki 5 i 6). W kontrolnej reakcji bez ATP i jonów magnezowych poziom IscU nie uległ zmianie zarówno w reakcji bez jak też w obecności SBD-HscA (Ryc. 25 C, ścieżki 1-6 oraz Ryc. 25 C, ścieżki 7-12).



Rycina 25. SBD-HscA chroni IscU przed degradacją przez proteazę Lon.

A. Kinetyka wiązania SBD-HscA do IscU^{GST}.

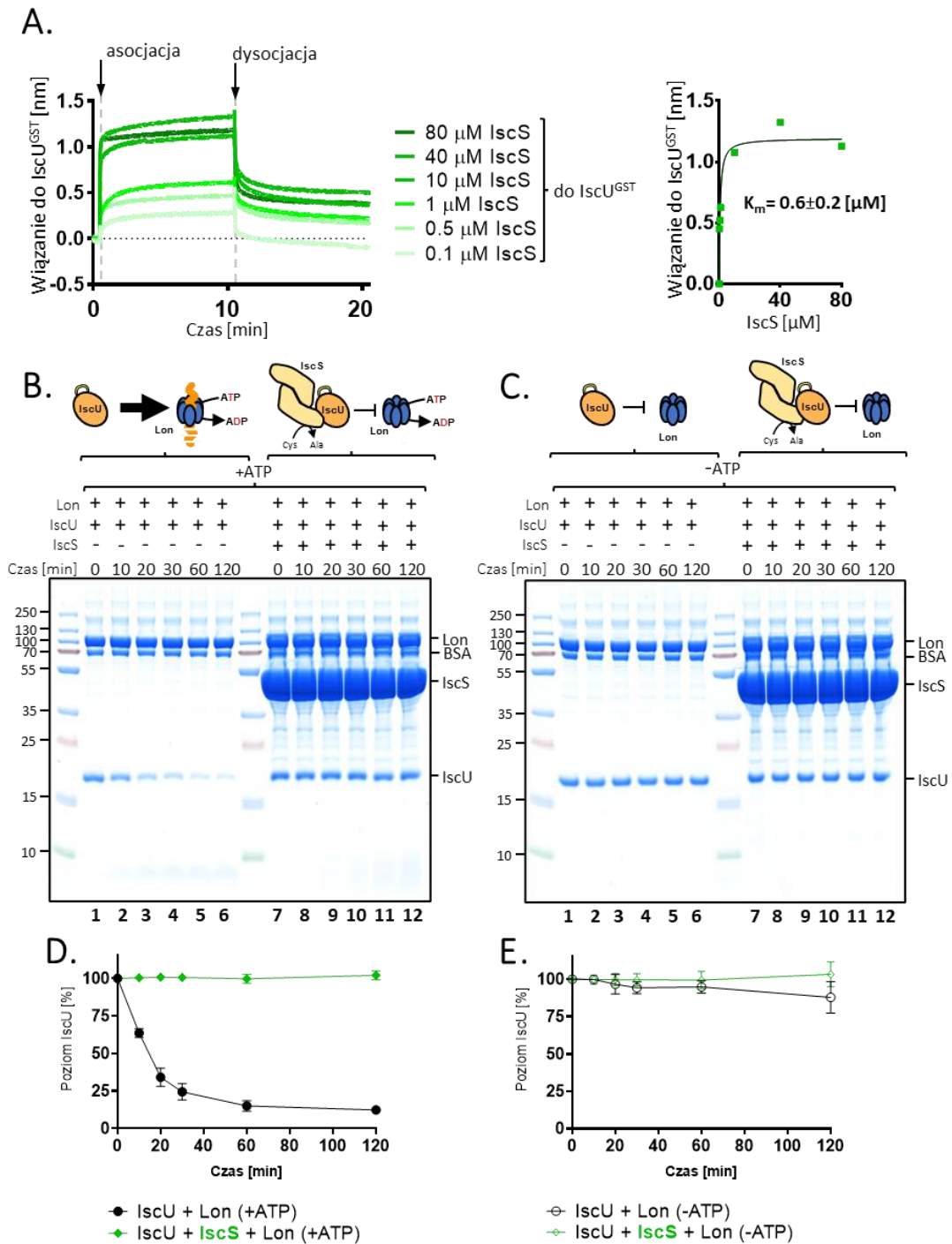
(Lewa) Biosensory z immobilizowanym IscU^{GST} były zanurzane w roztworach zawierających wzrastające stężenia SBD-HscA (5; 25; 50; 100 μM) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja). (Prawa) Sygnał wiązania SBD-HscA do IscU^{GST} w ostatnim punkcie pomiarowym asocjacji od stężenia SBD-HscA.

B i C. IscU (7.5 μM) inkubowano z Lon (1.25 μM) samo lub w obecności SBD-HscA (50 μM) z ATP (B) lub bez ATP (C). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano za pomocą SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

D. i E. Densytometryczna analiza ilości IscU w reakcji z ATP (D) lub bez ATP (E). Poziom IscU w czasie 0 przyjęto jako 100%. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Badania nad drożdżowym systemem biogenezy FeS pokazały, że kompleks desulfurazy cysteinowej, do którego Isu1 wiąże się na etapie syntezy centrów FeS, bardzo wydajnie chroni Isu1 przed proteolizą. Ten wynik zainspirował mnie do sprawdzenia czy bakteryjna desulfuraza cysteinowa IscS chroni IscU przed proteolizą. W pierwszej kolejności wyznaczyłam powinowactwo IscS do IscU^{GST} stosując technikę BLI. Biosensor z immobilizowanym IscU^{GST} zanurzałam w mieszaninie reakcyjnej zawierającej wzrastające stężenia IscS. W oparciu o maksymalną wysokość sygnału dla poszczególnych stężeń IscS wyznaczyłam K_m (0.6 μ M) tego oddziaływania. Wynik ten pokazuje, że IscS oddziałuje z IscU z powinowactwem podobnym do HscB (Ryc. 26 A i B).

Następnie sprawdziłam, wpływ oddziaływania IscS-IscU na poziom degradacji IscU przez proteazę Lon. W tym celu białko IscU (7.5 μ M) inkubowałam z nadmiarem IscS (50 μ M) przez 10 min w celu utworzenia kompleksu, a następnie dodawałam Lon i inkubowałam w obecności ATP (Ryc. 26 B). Nadmiar IscS miał na celu wysycenie kompleksu IscS-IscU, tak aby większość białka IscU w reakcji znajdowała się w kompleksie z IscS. Poziom IscU w obecności IscS nie uległ zmianie w czasie reakcji (Ryc. 26 B, ścieżki 7-12), podczas gdy w reakcji kontrolnej bez obecności IscS poziom IscU spadł do 25% po 30 min (Ryc. 25 B, ścieżka 4), a po godzinie do 15% (Ryc. 26 B, ścieżka 5) i utrzymywał stałą wartość przez kolejną godzinę (Ryc. 26 B, ścieżka 6). W kontrolnej reakcji bez ATP i jonów magnezowych poziom IscU nie uległ zmianie zarówno w reakcji bez IscS (Ryc. 26 C, ścieżki 1-6), jak i w obecności IscS (Ryc. 26 C, ścieżki 7-12).



Rycina 26. IscS chroni IscU przed degradacją przez proteazę Lon.

A. Kinetyka wiązania IscS do IscU^{GST}.

(Lewa) Biosensory z immobilizowanym IscU^{GST} były zanurzane w roztworach zawierających wzrastające stężenia IscS (0.1; 0.5; 1; 10; 40; 80 μM) (asocjacja). Po 10 minutach biosensor był zanurzany w roztworze nie zawierającym białek (dysocjacja). (Prawa) Sygnał wiązania IscS do IscU^{GST} w ostatnim punkcie pomiarowym asocjacji od stężenia IscS.

B i C. IscU (7.5 μM) inkubowano z Lon (1.25 μM) samo lub w obecności IscS (50 μM z 4 mM ATP (+ATP) (D) lub bez (-ATP) (C). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano za pomocą SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

C. IscU (7.5 μM) inkubowano z Lon (1.25 μM) samo lub w obecności IscS (50 μM) bez ATP i jonów (-ATP/Mg²⁺). W zaznaczonych na Rycinie czasach reakcji, pobierano porcję z mieszaniny reakcyjnej i rozdzielano za pomocą SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue G 250.

D. i E. Densytometryczna analiza ilości IscU w reakcji z ATP (D) lub bez ATP (E). Poziom IscU w czasie 0 przyjęto jako 100%. Słupki błędu przedstawiają odchylenie standardowe z trzech pomiarów.

Uzyskane przeze mnie wyniki z zastosowaniem bakteryjnych białek HscB, HscA oraz IscS pokazały, że oddziaływanie IscU z tymi białkami chroni IscU przed degradacją zależną od proteazy Lon. Przy czym, podobnie jak to ma miejsce w przypadku białek drożdżowych najbardziej wydajną ochronę obserwowałam w przypadku IscS. HscB chronił IscU w stopniu porównywalnym do ochrony obserwowanej dla drożdżowego Hsc20. Zaś wyniki uzyskane dla SBD-HscA nie mają odpowiednika w systemie drożdżowym, gdzie nie badano czy domena SBD-Ssq1 chroni Isu1 przed proteolizą. Uzyskane wyniki sugerują, że poprzez wpływ na szybkość degradacji IscU białka opiekuńcze HscB/HscA mogą kontrolować poziom IscU w komórce i w ten sposób dodatkowo kontrolować transfer centrów na białka docelowe. Jednak weryfikacja tej hipotezy wymaga dalszych badań *in vivo*.

6. Dyskusja

6.1. Potrójny kompleks Ssq1(ATP)-Hsc20-Isu1

W niniejszej rozprawie przedstawiłam biochemiczną rekonstrukcję potrójnego kompleksu składającego się z białka opiekuńczego Hsp70(Ssq1), białka pomocniczego JDP(Hsc20) i substratu białkowego Isu1. Formowanie tego kompleksu o stechiometrii 1:1:1 wymaga trzech oddziaływań pomiędzy tworzącymi go białkami: Hsc20 wiąże substrat Isu1, Hsc20 oddziałuje z Ssq1(ATP), sekwencja LPPVK Isu1 wiązana jest przez kieszeń wiążącą peptyd Ssq1. Potrójny kompleks reprezentuje kluczowy etap pośredni w cyklu wiązania substratu nie tylko przez badany tutaj wyspecjalizowany system Hsc20/Ssq1, ale również przez inne systemy JDP/Hsp70. Izolacja i biochemiczna charakterystyka tego kompleksu przybliżyła nas do odpowiedzi na dwa kluczowe pytania: (1) w jaki sposób białko pomocnicze JDP rekrutuje partnerskie Hsp70 do wiązania substratu? (2) jaki jest mechanizm synergicznej stymulacji aktywności ATPazowej Hsp70 przez białko JDP i substrat?

Wyniki analiz kinetyki formowania potrójnego kompleksu pokazały, że jest to proces dwuetapowy. Na pierwszym etapie tworzy się kompleks Hsc20-Isu1, na drugim etapie, kompleks ten oddziałuje z Ssq1*(ATP). Przy czym wiązanie kompleksu Hsc20-Isu1 do Ssq1*(ATP) zachodzi znacznie wydajniej niż wiązanie pojedynczych białek Hsc20 i Isu1. Sugeruje to, że za formowanie potrójnego kompleksu może odpowiadać zjawisko awidności (*ang. avidity*) - kilka miejsc oddziaływania zwiększa powinowactwo pomiędzy białkami w stopniu większym niż wskazywałaby prosta suma tych oddziaływań. W tym przypadku za awidność odpowiadają oddziaływania pomiędzy Hsc20 i Ssq1*(ATP) oraz Isu1 i Ssq1*(ATP). Zaburzenie każdego z tych oddziaływań, poprzez podstawienie kluczowych reszt aminokwasowych, hamuje formowanie potrójnego kompleksu. Ponadto kompleks ten nie jest formowany, gdy zaburzone jest oddziaływanie pomiędzy Hsc20 i Isu1, co jest zgodne z dwuetapowym mechanizmem jego formowania opartym na zjawisku awidności.

W przypadku potrójnego kompleksu awidność może tłumaczyć zarówno architektura kompleksu Hsc20-Isu1 jak też mechanizm jego oddziaływania z Ssq1*(ATP). Można przypuszczać, że oddziaływanie to inicjowane jest przez domenę J Hsc20, która poprzez długo-dystansowe oddziaływania elektrostatyczne wiąże się do

Ssq1*(ATP) [74]. Dzięki sztywnej architekturze kompleksu Hsc20-Isu1, wiązanie domeny J pozycjonuje Isu1 w taki sposób, że sekwencja LPPVK znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie kieszeni wiążącej substrat. W wyniku takiego pozycjonowania lokalne stężenie LPPVK jest bardzo wysokie co prowadzi do wysokiego powinowactwa, czyli awidności. Na awidność wpływa również dodatkowe elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy domeną CTD Hsc20 a domeną NBD Ssq1 – zaburzenie tego oddziaływania hamuje formowanie potrójnego kompleksu zarówno w doświadczeniach kinetycznych prezentowanych w tej rozprawie jak też w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych [106]. Analiza ewolucyjna przeprowadzona przez Igora Grochowinę pokazała, że reszty aminokwasowe zaangażowane w to dodatkowe oddziaływanie występują jedynie w wyspecjalizowanych systemach Hsc20/Ssq1 a brakuje ich w systemach Hsc20/mtHsp70. Sądzymy, że wzrost awidności wynikający z nowego miejsca oddziaływania umożliwił systemowi Hsc20/Ssq1 funkcjonowanie w niskich stężeniach. Podczas gdy mtHsp70 jest jednym z najbardziej stężonych białek mitochondrialnych – do 2% całkowitej zawartości białka, Ssq1 funkcjonuje w stężeniu 1000-krotnie niższym [103].

Architektura potrójnego kompleksu tłumaczy nie tylko jego szybkie i wydajne formowanie, ale również może wyjaśnić zjawisko synergicznej stymulacji aktywności ATPazowej Ssq1. Od lat wiadomo, że niska aktywność ATPazowa charakteryzująca białka Hsp70 jest stymulowana allosterycznie poprzez wiązanie domeny J oraz wiązanie substrat. Przy czym domena J i substrat działają synergicznie – łącznie stymulują ATPazę wielokrotnie silniej niż w pojedynkę. W przypadku Ssq1 dwudziestokrotna stymulacja ATPazy obserwowana jest w obecności Hsc20 i Isu1, pod warunkiem, że białka te tworzą kompleks Hsc20-Isu1, co jest zgodne z proponowanym tutaj mechanizmem formowania potrójnego kompleksu. Gdy oddziaływanie pomiędzy Hsc20 i Isu1 jest zaburzone albo gdy białka dodawane są do reakcji pojedynczo obserwuje się jedynie kilku krotny wzrost aktywności ATPazowej. Architektura potrójnego kompleksu umożliwiająca nieomal jednoczesne oddziaływanie domeny J i LPPVK z Ssq1 może tłumaczyć synergiczną stymulację ATPazy Ssq1 [79]. Podobnie można wyjaśnić synergiczną stymulację ATPazy HscA przez kompleks HscB-IscU [99].

Uważam, że oparty o awidność mechanizm rekrutacji Hsp70 może być wykorzystywany przez inne, mniej wyspecjalizowane, systemy Hsp70. Systemy te mogą osiągać awidność poprzez zwiększenie lokalnego stężenia domeny J i substratu

wykorzystując mniej precyzyjne pozycjonowanie. Przykładowo elastyczny, ale ograniczony dystans pomiędzy domeną J a substratem w obrębie kompleksu JDP-substrat może podwyższać ich lokalne stężenie w stopniu wystraszającym do osiągnięcia awidności. Zaś w przypadku białek JDP, które nie wiążą substratu samodzielnie, awidność może być osiągnięta dzięki dodatkowemu białku „adaptorowemu” pośredniczącemu w oddziaływaniu JDP-Hsp70, albo też dzięki precyzyjnej lokalizacji JDP w bezpośrednim sąsiedztwie zarówno Hsp70 jak też substratu. Takie mechanizmy funkcjonują w przypadku systemów JDP/Hsp70 zaangażowanych w procesach importu białek do macierzy mitochondrialnej lub opuszczaniu kanału rybosomalnego przez nowo syntetyzowany polipeptyd [19].

Podsumowując, izolacja i biochemiczna charakterystyka potrójnego kompleksu Ssq1*(ATP)-Hsc20-Isu1 wyjaśniła mechanistyczne podstawy jego formowania oraz synergiczny efekt domeny J i substratu na stymulację ATPazy Ssq1. Ponad to zaproponowany mechanizm wiązania Ssq1*(ATP) przez Hsc20-Isu1 sugeruje rolę awidności w cyklu wiązania substratu przez inne, mniej wyspecjalizowane, systemy JDP/Hsp70.

6.2. Wpływ HscB/HscA na Lon zależną degradację białka rusztowania IscU

W niniejszej rozprawie wykazałam, że bakteryjna proteaza Lon wydajnie degradowuje białko rusztowanie IscU z *E. coli*. Wykazałam również, że oddziaływanie białka JDP HscB, wyspecjalizowanego w biogenezie FeS, hamuje Lon zależną degradację IscU. Podobnie, jak oddziaływanie domeny wiążącej substrat SBD wyspecjalizowanego Hsp70 HscA. Zaś, wiązanie IscU przez desulfurazę cysteinową IscS całkowicie blokuje Lon-zależną proteolizę.

Otrzymane wyniki są zgodne z poprzednio publikowanymi dla białka rusztowania Isu1 drożdży *S. cerevisiae*. Dotychczasowe badania pokazują, że poziom Isu1 w komórkach drożdżowy jest precyzyjnie kontrolowany [82][83]. W warunkach fizjologicznych Isu1 wykazuje krótki okres półtrwania (30 minut) wynikający z proteolitycznej degradacji z udziałem ATP zależnej proteazy Pim1 (homolog proteazy Lon). Proteoliza Isu1 jest zahamowana a jego poziom w komórce wzrasta, gdy proces biogenezy FeS jest zahamowany poprzez delekcje lub unieczynnienie uczestniczących w nim białek. W tych warunkach wysoki poziom Isu1 jest kluczowy dla przeżycia komórki.

Z drugiej strony, wysoki poziom Isu1 w warunkach fizjologicznych jest dla komórki szkodliwy. Dotychczas nie było wiadomo, czy podobna regulacja poziomu białka rusztowanie ma również miejsce u bakterii lub innych organizmów eukariotycznych. Wyniki przedstawione w tej rozprawie sugerują, że proteoliza Isu1 oraz jego ochrona przed degradacją nie jest unikatową cechą drożdżowego procesu biogenezy FeS, a właściwości te pojawiły się u bakterii i zostały odziedziczone przez pochodzące od nich mitochondria.

Wyniki zaprezentowane w tej rozprawie potwierdziły, że IscU jest substratem proteazy Lon. Wydajna proteoliza IscU może wynikać ze strukturalnej dynamiki tego białka. Doświadczenia z wykorzystaniem techniki NMR wykazały, że IscU występuje w dwóch stanach strukturalnych: w konformacji ustrukturyzowanej (S) oraz z konformacji nieustrukturyzowanej (D) przy czym synteza centrum FeS przesuwają równowagę od stanu D do S [60][104][105]. W komórce oddziaływanie IscU z desulfurazą cysteinową IscS jest niezbędne do syntezy FeS. Warto podkreślić, że wyniki przedstawione w tej rozprawie pokazały, że wiązanie IscS całkowicie chroni IscU przed degradacją przez Lon podobnie jak ma to miejsce w przypadku Isu1 w obecności drożdżowego kompleksu desulfurazy cysteinowej.

Ochronne działanie oddziaływania HscB z IscU jest zgodne z wynikami uzyskanymi dla Isu1, którego proteoliza była hamowana w obecności Hsc20. Również w tym przypadku wydajność proteolizy zależy od obecności liganda przyłączonego do Isu1. Tylko w obecności jonów cynku, naśladujących obecność centrum FeS, wiązanie Hsc20 wydajnie chroni Isu1 przed proteolizą. Ponad to badania *in vivo* pokazały, że nadprodukcja Hsc20 powoduje wzrost poziomu Isu1 w komórkach drożdżowych. W przypadku IscU badania biochemiczne i NMR wykazały, że HscB ma wyższe powinowactwo do ustrukturyzowanej formy białka [104]. Można więc przypuszczać, że w warunkach *in vivo* HscB wydajnie chroni IscU przed proteolizą.

Nową obserwacją zaprezentowaną w tej rozprawie jest ochronne działanie domeny wiążącej substrat SBD HscA na Lon zależną proteolizę IscU. Wynik ten pokazuje, że oddziaływanie IscU z białkami opiekuńczymi zaangażowanymi w proces biogenezy FeS chroni białko rusztowanie przed proteolizą.

Wyniki zaprezentowane w tej rozprawie ograniczają się do badania proteolizy IscU w warunkach *in vitro* z użyciem oczyszczonych białek. Same w sobie byłyby trudne do

interpretacji fizjologicznej jednak w połączeniu z wynikami opublikowanymi poprzednio dla drożdżowego systemu biogenezy centrów FeS pozwalają na zaproponowanie hipotezy, że jedną z funkcji białek opiekuńczych uczestniczących w tym procesie jest kontrola poziomu białka rusztowania w komórce. Tym samym białka opiekuńcze nie tylko kontrolowałyby transfer centrów FeS z białka rusztowania na białka docelowe, ale również, poprzez ochronę białka rusztowania przed proteolityczną degradacją, kontrolowałyby „przepływ” centrów FeS w procesie ich biogenezy. Weryfikacja tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań zarówno *in vivo* jak też *in vitro* z wykorzystaniem modelowych systemów biogenezy FeS bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae*.

7. Bibliografia

- [1] F. Ritossa, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila, *Experientia*, 18 (1962) 571–573.
- [2] R. Burdon, Heat shock and the heat shock proteins, *Biochem.*, 240 (1986) 313–324.
- [3] J.C.A. Bardwell, E.A. Craig, Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (1984) 848–852.
- [4] S. Lindquist, E.A. Craig, THE HEAT-SHOCK PROTEINS, *Annu. Rev. Genet.*, 22 (1988) 631–677.
- [5] M.G. Usman, M.Y. Rafii, M.Y. Martini, O.A. Yusuff, M.R. Ismail, G. Miah, Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 33 (2017) 26–39.
- [6] Q. Liu, C. Liang, L. Zhou, Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system, *Protein Science*, 29 (2020) 378–390.
- [7] M.P. Mayer, L.M. Gierasch, Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones, *J. Biol. Chem.*, 294 (2019) 2085–2097.
- [8] A. Wawrzynow, B. Banecki, D. Wall, K. Liberek, C. Georgopoulos, M. Zylicz, ATP hydrolysis is required for the DnaJ-dependent activation of DnaK chaperone for binding to both native and denatured protein substrates, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 19307–19311.
- [9] K. Liberek, J. Marszalek, D. Angt, C. Georgopoulos, M. Zylicz, *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88 (1991) 2874–2878.

- [10] R. Rosenzweig, N.B. Nillegoda, M.P. Mayer, B. Bukau, The Hsp70 chaperone network, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 20 (2019) 665–680.
- [11] H.H. Kampinga, E.A. Craig, The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11 (2010) 579–592.
- [12] M.P. Mayer, The Hsp70-Chaperone Machines in Bacteria, *Front. Mol. Biosci.*, 8 (2021) 694012.
- [13] E.M. Clerico, W. Meng, A. Pozhidaeva, K. Bhasne, C. Petridis, L.M. Gierasch, Hsp70 molecular chaperones: Multifunctional allosteric holding and unfolding machines, *Biochemistry*, 476 (2019) 1653–1677.
- [14] S. Rüdiger, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries, *EMBO Journal*, 16 (1997) 1501–1507.
- [15] M.P. Mayer, R. Kityk, Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s, *Front. Mol. Biosci.*, 2 (2015) 58.
- [16] R. Kityk, J. Kopp, I. Sinning, M.P. Mayer, Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones, *Mol. Cell*, 48 (2012) 863–874.
- [17] X. Zhu, X. Zhao, W.F. Burkholder, A. Gragerov, C.M. Ogata, M.E. Gottesman, W.A. Hendrickson, Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK, *Science*, 272 (1996) 1606-1614.
- [18] J. Marszalek, E.A. Craig, Interaction of client—the scaffold on which FeS clusters are build—with J-domain protein Hsc20 and its evolving Hsp70 partners, *Front. Mol. Biosci.*, 9 (2022) 1034453
- [19] E.A. Craig, Hsp70 at the membrane: Driving protein translocation, *BMC Biol.*, 16 (2018) 1-11.
- [20] M.P. Mayer, B. Bukau, Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism, *Cell Mol. Life Sci.*, 62 (2005) 670–684.
- [21] P. D’Silva, B. Schilke, W. Walter, A. Andrew, E.A. Craig, J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (2003) 13839-13844.
- [22] B. Schilke, B. Williams, H. Knieszner, S. Puksza, P. D’Silva, E. A. Craig, J. Marszalek, Evolution of Mitochondrial Chaperones in FeS cluster biogenesis, *Curr. Biol.*, 16 (2006) 1660-1665.
- [23] S. Polier, Z. Dragovic, F.U. Hartl, A. Bracher, Structural Basis for the Cooperation of Hsp70 and Hsp110 Chaperones in Protein Folding, *Cell*, 133 (2008) 1068–1079.
- [24] J.P. Schuermann, J. Jiang, J. Cuellar, O. Llorca, L. Wang, L.E. Gimenez, S. Jin, A.B. Taylor, B. Demeler, K.A. Morano, P.J. Hart, J.M. Valpuesta, E.M. Lafer, R. Sousa, Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine, *Mol. Cell*, 31 (2008) 232–243.
- [25] N.B. Nillegoda, A.S. Wentink, B. Bukau, Protein Disaggregation in Multicellular Organisms, *Trends Biochem. Sci.*, 43 (2018) 285–300.

- [26] D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F.U. Hartl, In vivo aspects of protein folding and quality control, *Science*, 353 (2016) aac4354.
- [27] B. Hu, M.P. Mayer, M. Tomita, Modeling Hsp70-mediated protein folding, *Biophys. J.*, 91 (2006) 496–507.
- [28] J. Jiang, E.G. Maes, A.B. Taylor, L. Wang, A.P. Hinck, E.M. Lafer, R. Sousa, Structural Basis of J Cochaperone Binding and Regulation of Hsp70, *Mol. Cell*, 28 (2007) 422–433.
- [29] F. Hennessy, W.S. Nicoll, R. Zimmermann, M.E. Cheetham, G.L. Blatch, Not all J domains are created equal: Implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions, *Protein Science*, 14 (2005) 1697–1709.
- [30] R. Zhang, D. Malinverni, D.M. Cyr, P.D.L. Rios, N.B. Nillegoda, J-domain protein chaperone circuits in proteostasis and disease, *Trends Cell Biol.*, 33 (2023) 30–47.
- [31] E.A. Craig, P. Huang, R. Aron, A. Andrew, The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 156 (2006) 1-21.
- [32] K. Nakatsukasa, G. Huyer, S. Michaelis, J.L. Brodsky, Dissecting the ER-Associated Degradation of a Misfolded Polytropic Membrane Protein, *Cell*, 132 (2008) 101–112.
- [33] Y. Xing, T. Böcking, M. Wolf, N. Grigorieff, T. Kirchhausen, S.C. Harrison, Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: Mechanism of Hsc70-facilitated disassembly, *EMBO J.*, 29 (2010) 655–665.
- [34] D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F.U. Hartl, Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones, *FEBS Lett.*, 594 (2020) 2770–2781.
- [35] A. Bracher, J. Verghese, The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones, *Front. Mol. Biosci.*, 2 (2015) 10.
- [36] Y. Liu, L.M. Gierasch, I. Bahar, Role of Hsp70 ATPase domain intrinsic dynamics and sequence evolution in enabling its functional interactions with NEFs, *PLoS Comput. Biol.*, 6 (2010) e1000931.
- [38] H. Beinert, R.H. Holm, E. Münck, Iron-Sulfur Clusters: Nature’s Modular, Multipurpose Structures, *Science*, 277 (1997) 653-659.
- [39] O. Stehling, R. Lill, The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: Mechanisms, connected processes, and diseases, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5.8 (2013) a011312
- [40] T.A. Rouault, W.H. Tong, Iron–sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6 (2005) 345-351.
- [41] R. Lill, Function and biogenesis of iron-sulphur proteins, *Nature*, 460 (2009) 831–838.
- [42] J.J. Braymer, S.A. Freibert, M. Rakwalska-Bange, R. Lill, Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 1868 (2021) 118863.
- [43] H. Beinert, R.H. Holm, E. Münck, Iron-sulfur clusters: Nature’s modular, multipurpose structures, *Science* (1979), 277 (1997) 653–659.

- [44] T.A. Rouault, R.D. Klausner, Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron, *Trends Biochem. Sci.*, 21 (1996) 174–177.
- [45] H. Beinert, M.C. Kennedy, D. Stout, Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein, *Chem. Rev.*, 96 (1996) 2335–2374.
- [46] R. Lill, Function and biogenesis of iron-sulphur proteins, *Nature*, 460 (2009) 831–838.
- [47] M.R. Jacobson, K.E. Brigle, L.T. Bennett, R.A. Setterquist, M.S. Wilson, V.L. Cash, J. Beynon, W.E. Newton, D.R. Dean, Physical and Genetic Map of the Major *nif* Gene Cluster from *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.*, 171 (1989) 1017–1027.
- [48] M.R. Jacobson, V.L. Cash, M.C. Weiss, N.F. Laird, W.E. Newton, D.R. Dean, Biochemical and genetic analysis of the *nit1JSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*, *Mol. Genet. Genom.*, 219 (1989) 49–57.
- [49] M. Fontecave, S.O. De Choudens, B. Py, F. Barras, Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: The *SUF* machinery, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10 (2005) 713–721.
- [50] L. Zheng, V.L. Cash, D.H. Flint, D.R. Dean, Assembly of iron-sulfur clusters Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 13264–13272.
- [51] J. Balk, M. Pilon, Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in plants, *Trends Plant. Sci.*, 16 (2011) 218–226.
- [52] R. Lill, R. Dutkiewicz, S.A. Freibert, T. Heidenreich, J. Mascarenhas, D.J. Netz, V.D. Paul, A.J. Pierik, N. Richter, M. Stümpfig, V. Srinivasan, O. Stehling, U. Mühlhoff, The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins, *Eur. J. Cell. Biol.*, 94 (2015) 280–291.
- [53] B. Schilke, C. Voisine, H. Beinert, E. Craig, Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 (1999) 10206–10211.
- [54] S.A. Garland, K. Hoff, L.E. Vickery, V.C. Culotta, *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: Members of a Well-conserved Gene Family for Iron-Sulfur Cluster Assembly, *J. Mol. Biol.*, 294 (1999) 897–907.
- [55] A.C. Adam, C. Bornhövd, H. Prokisch, W. Neupert, K. Hell, The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria, *EMBO J.*, 25 (2006) 174–183.
- [56] B. Srour, S. Gervason, B. Monfort, B. D’auréaux, Mechanism of iron–sulfur cluster assembly: In the intimacy of iron and sulfur encounter, *Inorganics*, 8 (2020) 1–38.
- [57] B. Srour, S. Gervason, M.H. Hoock, B. Monfort, K. Want, D. Larkem, N. Trabelsi, G. Landrot, A. Zitolo, E. Fonda, E. Etienne, G. Gerbaud, C.S. Müller, J. Oltmanns, J.B. Gordon, V. Yadav, M. Kleczewska, M. Jelen, M.B. Toledano, R. Dutkiewicz, et al., Iron Insertion at the Assembly Site of the ISCU Scaffold Protein Is a Conserved Process Initiating Fe-S Cluster Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 144 (2022) 17496–17515.
- [58] M. Manicki, J. Majewska, S. Ciesielski, B. Schilke, A. Blenska, J. Kominek, J. Marszalek, E.A. Craig, R. Dutkiewicz, Overlapping binding sites of the frataxin homologue assembly

- factor and the heat shock protein 70 transfer factor on the Isu iron-sulfur cluster scaffold protein, *J. Biol. Chem.*, 289 (2014) 30268–30278.
- [59] H.K. Jin, A.K. Füzéry, M. Tonelli, D.T. Ta, W.M. Westler, L.E. Vickery, J.L. Markley, Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB, *Biochemistry*, 48 (2009) 6062–6071.
- [60] J. Hae Kim, M. Tonelli, T. Kim, J.L. Markley, Three-dimensional structure and determinants of stability of the iron-sulfur cluster scaffold protein IscU from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 51 (2012) 5557–5563.
- [61] S.J. Ciesielski, B.A. Schilke, J. Osipiuk, L. Bigelow, R. Mulligan, J. Majewska, A. Joachimiak, J. Marszalek, E.A. Craig, R. Dutkiewicz, Interaction of J-protein Cochaperone Jac1 with Fe-S scaffold Isu is indispensable in vivo and conserved in evolution, *J. Mol. Biol.*, 417 (2012) 1–12.
- [62] A.K. Füzéry, J.J. Oh, D.T. Ta, L.E. Vickery, J.L. Markley, Three hydrophobic amino acids in *Escherichia coli* HscB make the greatest contribution to the stability of the HscB-IscU complex, *Biochemistry*, 12 (2011) 1-9.
- [63] T.L. Tapley, L.E. Vickery, Preferential substrate binding orientation by the molecular chaperone HscA, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 28435–28442.
- [64] M.P. Mayer, The Hsp70-Chaperone Machines in Bacteria, *Front. Mol. Biosci.*, 8 (2021) 694012.
- [65] L.E. Vickery, J.J. Silberg, D.T. Ta, Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*, *Protein Science*, 6 (1997) 1047-1056.
- [66] J.R. Cupp-Vickery, L.E. Vickery, Crystal structure of Hsc20, a J-type co-chaperone from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 304 (2000) 835–845.
- [67] R. Barriot, J. Latour, M.P. Castanié-Cornet, G. Fichant, P. Genevaux, J-Domain Proteins in Bacteria and Their Viruses, *J. Mol. Biol.*, 432 (2020) 3771–3789.
- [68] S. Pukszta, B. Schilke, R. Dutkiewicz, J. Kominek, K. Moczulska, B. Stepien, K.G. Reitenga, J.M. Bujnicki, B. Williams, E.A. Craig, J. Marszalek, Co-evolution-driven switch of J-protein specificity towards an Hsp70 partner, *EMBO Rep.*, 11 (2010) 360–365.
- [69] M.A. Huynen, B. Snel, P. Bork, T.J. Gibson, The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly, *Hum. Mol. Genet.*, 10 (2001) 2463-2468.
- [70] M. Kleczewska, A. Grabinska, M. Jelen, M. Stolarska, B. Schilke, J. Marszalek, E.A. Craig, R. Dutkiewicz, Biochemical convergence of mitochondrial HSP70 system specialized in iron–sulfur cluster biogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2020) 3326.
- [71] R. Dutkiewicz, B. Schilke, H. Knieszner, W. Walter, E.A. Craig, J. Marszalek, Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis: Similarities to and differences from its bacterial counterpart, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 29719–29727.
- [72] L.E. Vickery, J.R. Cupp-Vickery, Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 42 (2007) 95–111.

- [73] J.J. Silberg, L.E. Vickery, Kinetic characterization of the ATPase cycle of the molecular chaperone Hsc66 from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 7779–7786.
- [74] B. Tomiczek, W. Delewski, L. Nierzwicki, M. Stolarska, I. Grochowina, B. Schilke, R. Dutkiewicz, M.A. Uzarska, S.J. Ciesielski, J. Czub, E.A. Craig, J. Marszalek, Two-step mechanism of j-domain action in driving hsp70 function, *PLoS Comput. Biol.*, 16 (2020) e1007913.
- [75] K.G. Hoff, J.R. Cupp-Vickery, L.E. Vickery, Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 37582–37589.
- [76] R. Dutkiewicz, B. Schilke, S. Cheng, H. Knieszner, E.A. Craig, J. Marszalek, Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 29167–29174.
- [77] H. Knieszner, B. Schilke, R. Dutkiewicz, P. D’Silvah, S. Cheng, M. Ohlson, E.A. Craig, J. Marszalek, Compensation for a defective interaction of the Hsp70 Ssq1 with the mitochondrial Fe-S cluster scaffold Isu, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 28966–28972.
- [78] F. Bonomi, S. Iametti, A. Morleo, D. Ta, L.E. Vickery, Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones, *Biochemistry*, 47 (2008) 12795–12801.
- [79] R. Dutkiewicz, M. Nowak, Molecular chaperones involved in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 23 (2018) 569–579.
- [80] U. Mühlenhoff, J. Gerber, N. Richhardt, R. Lill, Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p, *EMBO J.*, 22 (2003) 4815–4825.
- [81] M.A. Uzarska, R. Dutkiewicz, S.A. Freibert, R. Lill, U. Mühlenhoff, The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation, *Mol. Biol. Cell*, 24 (2013) 1830–1841.
- [82] A.J. Andrew, J.-Y. Song, B. Schilke, E.A. Craig, Posttranslational Regulation of the Scaffold for Fe-S Cluster Biogenesis, *Isu*, *Mol. Biol. Cell*, 19 (2008) 5259–5266.
- [83] J.Y. Song, J. Marszalek, E.A. Craig, Cysteine desulfurase Nfs1 and Pim1 protease control levels of Isu, the Fe-S cluster biogenesis scaffold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (2012) 10370–10375.
- [84] H. Stahlberg, E. Kutejova, K. Suda, B. Wolpensinger, A. Lustig, G. Schatz, A. Engel, C.K. Suzuki, M.E. Müller, Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 (1999) 6787–6790.
- [85] S.J. Ciesielski, B. Schilke, J. Marszalek, E.A. Craig, Protection of scaffold protein Isu from degradation by the Lon protease Pim 1 as a component of Fe-S cluster biogenesis regulation, *Mol. Biol. Cell*, 27 (2016) 1060–1068.
- [86] C. Iannuzzi, M. Adrover, R. Puglisi, R. Yan, P.A. Temussi, A. Pastore, The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein, *Protein Science*, 23 (2014) 1208–1219.

- [87] M. Sichtung, D. Mokranjac, A. Azem, W. Neupert, K. Hell, Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1, *EMBO J.*, 24 (2005) 1046–1056.
- [88] W. Delewski, B. Paterkiewicz, M. Manicki, B. Schilke, B. Tomiczek, S.J. Ciesielski, L. Nierzwicki, J. Czub, R. Dutkiewicz, E.A. Craig, J. Marszalek, Iron-sulfur cluster biogenesis chaperones: Evidence for emergence of mutational robustness of a highly specific protein-protein interaction, *Mol. Biol. Evol.*, 33 (2016) 643–656.
- [89] K.G. Hoff, J.J. Silberg, L.E. Vickery, Interaction of the iron–sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (2000) 7790–7795.
- [90] J.G. Norby, Coupled Assay of Na⁺,K⁺-ATPase Activity, *Meth. Enzymol.*, 156 (1988) 116–119.
- [91] R. Dutkiewicz, M. Nowak, E.A. Craig, J. Marszalek, Fe–S Cluster Hsp70 Chaperones: The ATPase Cycle and Protein Interactions, *Meth. Enzymol.*, 595 (2017) 161–184.
- [92] M.A. Uzarska, I. Grochowina, J. Soldek, M. Jelen, B. Schilke, J. Marszalek, E.A. Craig, R. Dutkiewicz, During FeS cluster biogenesis, ferredoxin and frataxin use overlapping binding sites on yeast cysteine desulfurase Nfs1, *J. Biol. Chem.*, 298 (2022).
- [93] C.T. Rueden, J. Schindelin, M.C. Hiner, B.E. DeZonia, A.E. Walter, E.T. Arena, K.W. Eliceiri, ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data, *BMC Bioinformatics*, 18 (2017) 1–26.
- [94] A. Karłowicz, K. Wegrzyn, M. Gross, D. Kaczynska, M. Ropelewska, M. Siemiakowska, J.M. Bujnicki, I. Konieczny, Defining the crucial domain and amino acid residues in bacterial Lon protease for DNA binding and processing of DNA-interacting substrates, *J. Biol. Chem.*, 292 (2017) 7507–7518.
- [95] Marcin Jeleń, Rozprawa doktorska, Charakterystyka oddziaływania mitochondrialnego systemu białek opiekuńczych Ssq1/Hsc20 z białkiem Isu1 uczestniczącym w biogenezie centrów żelazosiarkowych, 2023, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
- [96] J. Wei, J.R. Gaut, L.M. Hendershot, In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 26677–26682.
- [97] M.C. Sousa, D.B. McKay, The hydroxyl of threonine 13 of the bovine 70-kDa heat shock cognate protein is essential for transducing the ATP-induced conformational change, *Biochemistry*, 37 (1998) 15392–15399.
- [98] J.S. McCarty, G. Walker, DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88 (1991) 9513–9517.
- [99] J.J. Silberg, T.L. Tapley, K.G. Hoff, L.E. Vickery, Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron-sulfur cluster assembly protein IscU, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 53924–53931.

- [100] C. Voisine, Y.C. Cheng, M. Ohlson, B. Schilke, K. Hoff, H. Beinert, J. Marszalek, E.A. Craig, Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of FeS clusters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98 (2001) 1483-1488.
- [101] U. Teichmann, L. Van Dyck, B. Guiard, H. Fischer, R. Glockshuber, W. Neupert, T. Langer, Substitution of PIM1 protease in mitochondria by *Escherichia coli* Lon protease, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 10137–10142.
- [102] M.H. Gross, I. Konieczny, Polyphosphate induces the proteolysis of ADP-bound fraction of initiator to inhibit DNA replication initiation upon stress in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, 48 (2021) 5457–5466.
- [103] C. Voisine, B. Schilke, M. Ohlson, H. Beinert, J. Marszalek, E.A. Craig, Role of the Mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the Maturation of Yfh1, *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000) 3677-3684.
- [104] J.H. Kim, M. Tonelli, R.O. Frederick, D.C.F. Chow, J.L. Markley, Specialized Hsp70 chaperone (HscA) binds preferentially to the disordered form, whereas J-protein (HscB) binds preferentially to the structured form of the iron-sulfur cluster scaffold protein (IscU), *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 31406–31413.
- [105] T.A. Ramelot, J.R. Cort, S. Goldsmith-Fischman, G.J. Kornhaber, R. Xiao, R. Shastry, T.B. Acton, B. Honig, G.T. Montelione, M.A. Kennedy, Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site, *J. Mol. Biol.*, 344 (2004) 567–583.
- [106] M. Jelen, I Grochowina, A. Grabinska-Rogala, S.J. Ciesielski, Szymon, K. Dabrowska, B. Tomiczek, L. Nierzwicki, W Delewski, B. Schilke, J. Czub, M. Dadlez, R. Dutkiewicz, E.A. Craig, J. Marszalek, Analysis of Reconstituted Tripartite Complex Supports Avidity-Based Recruitment of Hsp70 by Substrate Bound J-Domain Protein. Dostęp na SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4484948> lub <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4484948>