

Nowe elementy regulatorowe dezagregującego białka opiekuńczego Hsp104 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Liberek

Promotor pomocniczy: dr Szymon Ziętkiewicz

Pochodzące z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* białko Hsp104 jest dezagregazą należącą do rodziny ATP – az AAA+. W strukturze monomeru Hsp104 można wyróżnić dwie domeny wiążące nukleotyd (NBD1 i NBD2) oraz domenę M, kluczową dla aktywności białka. W obecności ATP białko tworzy heksameryczny pierścień z kanałem centralnym oraz domenami M zlokalizowanymi na zewnątrz struktury. Podstawowe funkcje białka Hsp104 obejmują dezagregację agregatów białkowych mogących pojawiać się w komórce w efekcie działania m.in. szoku termicznego oraz udział w propagacji prionów drożdżowych. Dokładny mechanizm aktywności białka nie jest poznany.

Na podstawie analizy wyników modelowania homologicznego monomeru Hsp104 wykonanej przez dra Szymona Ziętkiewicza zasugerowano istnienie sieci oddziaływań jonowych tworzonej przez 3 reszty aminokwasowe – D184, K358, D484 – zlokalizowane na pograniczu NBD1 i domeny M, potencjalnie zaangażowanej w regulację aktywności Hsp104.

Wykorzystując technikę mutagenyzy miejscowo – specyficznej oraz przeprowadzając szereg doświadczeń *in vivo* i *in vitro* pokazano, że brak analizowanych oddziaływań w istotny sposób wpływa na aktywność białka Hsp104. Wprowadzenie mutacji K358E i D484K skutkuje otrzymaniem białka o większej aktywności, częściowo niezależnego od białek systemu Hsp70/40. Jednocześnie obie zmiany są toksyczne dla komórek drożdżowych, wywołują zaburzenia w strukturze cytoszkieletu, co prowadzi do zahamowania wzrostu hodowli oraz lizy komórek. Wyjaśnieniem tego zjawiska okazał się fakt zdolności nadaktywnych wariantów Hsp104 do rozwijania białek natywnych, niebędących ich fizjologicznym substratem.

Mutacje kompensujące, przywracające postulowaną sieć oddziaływań (D184K/K358E, K358E/D484K) znoszą zarówno opisany wyżej toksyczny fenotyp, jak i nadaktywność biochemiczną obserwowaną w doświadczeniach *in vitro*.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że dynamiczna sieć oddziaływań jonowych tworzonych na pograniczu domen NBD1 oraz M jest nowym istotnym elementem regulującym aktywność białka Hsp104.