

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

mgr Małgorzata Kleczewska

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

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

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

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

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