

Mateusz Manicki  
Pracownia Biochemii Ewolucyjnej  
Promotor: Prof. dr hab. Jarosław Marszałek

## **„Biochemiczna rekonstrukcja kompleksów białkowych zaangażowanych w mitochondrialną biogenezę centrów żelazo-siarkowych.”**

Centra żelazo-siarkowe FeS są grupami prostetycznymi, kluczowymi dla funkcjonowania wielu białek niezbędnych do przeżycia komórki. We wszystkich komórkach eukariotycznych centra FeS syntetyzowane są w macierzy mitochondrialnej, przez dynamicznie zmieniający się kompleks oddziałujących ze sobą białek. Chociaż zidentyfikowano ponad 20 białek uczestniczących w procesie biogeny FeS, to rdzeń kompleksu syntezy centrów FeS tworzą cztery białka: rusztowanie molekularne Isu1, kompleks desulfurazy cysteinowej Nfs1(Isd11) oraz frataksyna Yfh1. Centrum FeS formowane jest w obrębie Isu1, donorem atomów siarki jest Nfs1(Isd11), a Yfh1 reguluje aktywność desulfurazy oraz jest rozpatrywane jako potencjalny donor żelaza. Pomimo, że wzajemne interakcje tych białek są niezbędne do syntezy centrów FeS, to zaskakująco mało wiadomo na temat molekularnych podstaw tych oddziaływań.

Wykorzystując dostępne dane biochemiczne oraz strukturalne zidentyfikowałem reszty aminokwasowe na powierzchni białek Yfh1, Isu1, Nfs1(Isd11) determinujące ich wzajemne oddziaływanie w obrębie kompleksu syntezy FeS obecnego u *S. cerevisiae*. Swoje przewidywania zweryfikowałem wykorzystując technikę precypitacji kompleksów białkowych, w której stosowałem białka Yfh1 i Isu1 w fuzji z białkiem GST. Zaobserwowałem, że białko GST-Yfh1 wiąże się jedynie do uprzednio uformowanego podwójnego kompleksu Isu1:Nfs1(Isd11), nie oddziałując z żadnym z tych białek z osobna. Następnie wykorzystując zmutowane wersje białek Yfh1<sup>D86K/E89K</sup> i Nfs1<sup>R313E/R316E/R318E</sup> wykazałem, że wymienione aminokwasy determinują wzajemne oddziaływanie Yfh1:Nfs1(Isd11) w obrębie kompleksu syntezy FeS. W podobny sposób pokazałem, że reszta W131 białka Yfh1 oraz motyw P134, V135, K136 (PVK) w obrębie białka Isu1 są kluczowe dla ich wzajemnej interakcji w obrębie kompleksu syntezy FeS. Chcąc zweryfikować funkcjonalne znaczenie tych obserwacji, badałem jak wymiana powyższych reszt wpływa na zdolność niosących je białek do regulacji aktywności

enzymatycznej desulfurazy. W przypadku białek typu dzikiego, aktywność Nfs1(Isd11) była hamowana w obecności Isu1, stymulowana w przypadku jednoczesnej obecności Isu1 i Yfh1 oraz nie zmieniała się w obecności samej frataksyny. Zgodnie z wynikami doświadczeń precypitacji kompleksów białkowych, zmutowane białka nie wpływały na aktywność desulfurazy Nfs1(Isd11). Zaburzenie tych oddziaływań prowadziło również do zhamowania tempa wzrostu komórek drożdżowych, pomimo że zmutowane wersje białek produkowane były w komórce na poziomie podobnym do białek typu dzikiego.

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że frataksyna wiąże się do kompleksu syntezy FeS oddziałując resztami D86 E89 z resztami R313, R316, R318 białka Nfs1(Isd11) oraz resztą W131 z resztami motywu PVK białka Isu1. Wszystkie zidentyfikowane aminokwasy są silnie konserwowane ewolucyjnie u bakterii i eukariontów (w tym ludzi), co sugeruje że zidentyfikowane powierzchnie oddziaływania pomiędzy białkami stanowią element uniwersalnego mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za formowanie kompleksu syntezy centrów żelazo-siarkowych.