

## **Wymóg konserwowania czynników fałdowania w funkcjonowaniu wielu niezbędnych białek, procesów metabolicznych i kluczowych czynników wirulencji**

Mechanizm leżący u podstaw fałdowania białek oraz odpowiedź na niepoprawne zwijanie białek mają wspólne szlaki, które są niezbędne dla wszystkich organizmów. Zaburzenia w fałdowaniu białek są związane z wieloma chorobami, w tym z neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimera i choroby ekspansji poliglutaminowych. Tak więc zrozumienie procesów komórkowych, które regulują proces agregacji białek, pomoże w opracowywaniu nowych metod leczenia. Fałdowanie białek *in vivo* często wymaga działania molekularnych chaperonów i białkowych katalizatorów fałdowania. Katalizatory fałdowania białek przyspieszają etapy ograniczające szybkość fałdowania i należą do dwóch rodzin: białkowych izomeraz disiarczkowych i izomeraz *cis/trans* peptydyloprolilowych (PPIaz). PPIazy są uniwersalnie konserwowane, obecne we wszystkich przedziałach komórkowych i należą do trzech odrębnych rodzin: cyklofilin, FKBP i parwulin. W cytoplazmie modelowej bakterii *Escherichia coli* występuje sześć różnych PPIaz. Istnieje jednak znaczny brak wiedzy na temat funkcji *in vivo* większości cytoplazmatycznych PPIaz. Głównym celem naszych badań jest poznanie mechanizmu działania cytoplazmatycznych PPIaz oraz identyfikacja ich substratów. Tak więc skonstruowaliśmy zestawy delecyjne wszystkie genów kodujących PPIazy oraz oczyściliśmy każdą z PPIazy. Wykorzystując doświadczenia typu „pull-down”, zidentyfikowaliśmy niektóre z substratów. Co istotne, odkryliśmy, że substratowe białka-klienci obejmują kilka koniecznych do życia białek, czynniki transkrypcyjne zaangażowane w regulację odpowiedzi stresowej, białka z kluczowych etapów biosyntezy kwasów tłuszczowych, składania/funkcjonowania białek zawierających Fe-S i z procesu podziału komórkowego. W niniejszym projekcie zbadamy, czy powyższe substraty wymagają aktywności PPIazowej specyficznej PPIazy. W tym celu zostało skonstruowanych kilka pojedynczych substytucji aminokwasowych S1pA, Cyp18, Par10 i FklB. W planowanych doświadczeniach oczyścimy zmutowane białka i przeprowadzimy eksperymenty typu „pull-down” w celu potwierdzenia *in vivo* substratów PPIaz. Substraty zostaną zidentyfikowane z użyciem analizy 2-D elektroforezy żelowej. Na podstawie tych badań zostanie zmierzona, za pomocą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, powinowactwo wiązania substrat-PPIaza oraz specyficznych peptydów, uzyskanych z substratu, z jego PPIazą-partnerem. Jednocześnie stwierdzono, że szczepy pozbawione wszystkich 6PPIaz akumulują wiele białek w formie agregatów, co zaobserwowaliśmy poprzez technikę obrazowania fluorescencyjnego i 2-D elektroforezę żelową. Następnie zanalizujemy, z wykorzystaniem żeli 2-D, pełne spektrum białek, które mają tendencję do agregacji przy braku 6 PPIaz w niepermissywnych warunkach wzrostu.

W celu głębszego zrozumienia struktury i funkcji określonych PPIaz zostały skonstruowane szczepy, które posiadają epitop FLAG dołączony do końca C-terminalnego każdego z dzikiego typu genu *ppi* na chromosomie oraz ich pochodne z pojedynczymi substytucjami aminokwasowymi w przypuszczalnym miejscu aktywnym. Otrzymane konstrukty zostaną użyte do identyfikacji kluczowych reszt aminokwasowych, które są istotne dla funkcji PPIaz. Epitop FLAG umożliwi nam przeprowadzenie immunoprecypitacji przy użyciu specyficznych przeciwciał anty-FLAG, a następnie analizę związanych białek za pomocą 2-D elektroforezy żelowej. Ponadto matryce peptydowe z różnych substratów zostaną wykorzystane do identyfikacji specyficzności w rozpoznawaniu przez PPIazy oraz do określenia, który aminokwas białek-klientów jest wymagany do powyższych oddziaływań. Niemożność identyfikacji kompleksów substrat-PPIaza była głównym problemem w zrozumieniu funkcji tych katalizatorów fałdowania. A zatem zamierzamy zastosować zależną-od-bliskości technikę biotynylacji aby obejść wspomniany problem i przechwycić krótkotrwałe oddziaływanie białka.

Ponieważ PPIazy *E. coli* i ich odpowiedniki w komórkach ludzkich wykazują podobieństwa na kilku poziomach, badania rodziny immunofilin są fundamentalne i ważne, gdyż białka te są naturalnym celem poszukiwań nowych inhibitorów, które mogą mieć zastosowanie w leczeniu różnych chorób. Ponadto u wielu patogennych bakterii PPIazy są białkami immunogennymi, które mogą modulować odpowiedź immunologiczną gospodarza i zwiększać przetrwanie patogenu poprzez niwelowanie obronnych procesów stresowych, wytwarzanych przez komórki gospodarza.