

Białka nie są stabilnymi cząsteczkami. W warunkach stresowych część białek w komórce ulega częściowemu rozfałdowaniu i tworzy agregaty. Białka opiekuńcze należące do trzech rodzin (małe białka szoku termicznego (sHsp), Hsp70 oraz Hsp100) są zdolne do przywracania białkom uwięzionym w agregatach ich natywnej struktury. Ten proces jest istotny dla przeżycia bakterii, grzybów czy też roślin w warunkach stresowych. Białka należące do rodziny sHsp działają jako pierwsze w warunkach stresowych. Oddziałują one z częściowo rozfałdowanymi łańcuchami polipeptydowymi co zmienia proces agregacji tych białek. Tak zmienione agregaty białek są lepszym substratem dla białek Hsp70 i Hsp100 co czyni proces przywracania białkom substratowej właściwej struktury bardziej wydajnym.

W bakterii *Escherichia coli*, która jest modelowym organizmem biologii molekularnej, występują dwa małe białka szoku termicznego, IbpA oraz IbpB. Powstały one w wyniku duplikacji genu kodującego pojedyncze małe Hsp. Proces ten zaszedł podczas powstania *Enterobacterales*. IbpA oraz IbpB funkcjonalnie ze sobą współdziałają, ale pełnione przez nie funkcje są różne. Nie wiadomo co na poziomie sekwencji aminokwasowej tych białek determinuje te funkcje. Nie jest też jasne jakie są zalety utrzymywania dwubiałkowego systemu małych białek szoku termicznego w porównaniu do pojedynczego funkcjonalnego małego białka.

W trakcie realizacji grantu znajdziemy powiązania pomiędzy sekwencją aminokwasową IbpA oraz IbpB a ich właściwościami. Zrekonstruujemy drzewo genealogiczne co pozwoli na wydedukowanie najbardziej prawdopodobnych sekwencji przodków zarówno IbpA jak i IbpB odpowiadającym węzłom na drzewie genealogicznym. Kilka sekwencji białek przodków zostanie zrekonstruowanych zarówno dla IbpA jak i IbpB. Posługując się stworzonym drzewem genealogicznym cofniemy się aż do okresu kiedy występował tylko jeden gen kodujący małe Hsp. Również i ta sekwencja zostanie zrekonstruowana. Zrekonstruowane sekwencje ancestralne posłużą do nadprodukcji i oczyszczenia białek przodków współczesnych białek IbpA oraz IbpB. Przeprowadzimy analizę szeregu właściwości biochemicznych tych białek. Miedzy innymi skupimy się na zdolności przodków IbpA oraz IbpB pochodzących z tego samego węzła na drzewie genealogicznym do funkcjonalnego współdziałania. Zbadamy również jak wygląda fenotyp bakterii niosących geny kodujące ancestralne małe Hsp.

W ramach badań wstępnych zrekonstruowaliśmy wspólnego przodka IbpA oraz IbpB, białko AncAB, które jest najbardziej oddalone ewolucyjnie od białek występujących współcześnie w porównaniu do wszystkich innych białek które będą analizowane w grantie. To białko różni się od współczesnego IbpA w 34 pozycjach a od IbpB w aż 74 pozycjach aminokwasowych. Analiza właściwości biochemicznych białka AncAB jak i fenotypu związanego z genem *ancAB* pokazała, że zrekonstruowaliśmy w pełni funkcjonalne małe Hsp, które zastępuje *in vitro* oraz *in vivo* współczesny dwubiałkowy system małych Hsp.

Badania które zrealizujemy w ramach grantu pozwolą na zrozumienie co determinuje właściwości parterów w dwubiałkowym systemie małych Hsp. Poznamy także jak przebiegały zmiany właściwości małych Hsp w procesie ewolucji. Zrozumiemy na czym polegają różnice w funkcjonowaniu oraz wyższość systemu dwubiałkowego na jednobiałkowym. Prowadzone badania przyczynią się do znacznie lepszego zrozumienia roli małych Hsp w modyfikacji procesu agregacji białek w komórce. Proces ten ma ogromne znaczenie dla późniejszego przywracania białkom uwięzionym w agregatach natywnej struktury co warunkuje przeżycie warunków stresowych.