

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Buněčná a vývojová biologie

Studijní obor: Fyziologie buňky



Bc. Daniel Kolařík

Dopad downregulace exprese genu pro peptidázovou podjednotku ClpP mitochondriální proteázy ClpXP na strukturu a funkci mitochondrií v lidských buňkách

Impact of downregulation of gene expression of the peptidase subunit ClpP of the mitochondrial protease ClpXP on structure and function of mitochondria in human cells

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Lukáš Stibůrek, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 12. 2018

Podpis

Rád bych poděkoval svému školiteli, RNDr. Lukáši Stibůrkovi, Ph.D., za vedení mé práce a konzultace dané problematiky, a své konzultantce, Mgr. Janě Česnekové, za vysvětlení jednotlivých metod a za kontrolu a revize mé práce po jejím dopsání. Dále bych chtěl poděkovat ostatním členům Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch za přátelskou atmosféru a příležitostné rady.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat panu doc. RNDr. Martinu Kalousovi, CSc, za rychlou a vstřícnou odezvu při vyřizování veškerých formalit spojených s vypracováním diplomové práce mimo fakultní pracoviště.

Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině a svým blízkým, za podporu, kterou mi v průběhu mého studia poskytli.

Abstrakt:

Mitochondrie jsou jedny z nejkompexnějších organel eukaryotické buňky. Mají vlastní genom a transkripční aparát a v buňkách zastávají několik zásadních funkcí. Odehrává se v nich podstatná část energetického metabolismu buňky, dochází zde k tvorbě železosírných komplexů, syntéze některých klíčových molekul a také jsou zásadní organelou pro průběh apoptózy. Pro udržení kvality proteinů i v jejich oxidativním prostředí mají mitochondrie vyvinutý systém proteáz zasahující do všech mitochondriálních kompartmentů, které poškozené proteiny odbourávají a podporují tak obrat mitochondriálních proteinů. Cílem této práce bylo charakterizovat funkci ClpP podjednotky matrixové proteázy ClpXP, jejíž role zatím nebyla v lidských buňkách příliš prozkoumána. Proto jsme v buněčné linii HEK 293 utišili expresi ClpP pomocí RNA interference a následně provedli “rescue“ experiment, během kterého jsme reintrodukovali ClpP v buňce. Z našich výsledků vyplývá, že ClpP podjednotka se aktivně neúčastní apoptotické dráhy, ale zato je zásadní pro složení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce i pro samotnou kvalitu mitochondrií. Zaznamenali jsme změny na úrovni hladiny podjednotek všech komplexů dýchacího řetězce. Také jsme ukázali, že systém mitochondriálních proteáz je značně funkčně provázaný a při vyřazení funkce ClpP dochází k jeho disbalanci. V takovém případě proteázy vnitřní mitochondriální membrány svou hladinou kopírují hladinu aktivního ClpP. Zjistili jsme, že ještě ničivější dopad než absence ClpP má na buňku utišení ClpX podjednotky. Celkově tyto výsledky potvrzují, že ClpXP je důležitou proteázou kontrolující kvalitu mitochondriálních proteinů a zajišťuje udržení dobrého stavu mitochondrií v lidských buňkách.

Klíčová slova:

mitochondrie, mitochondriální proteáza, ClpXP, ClpP, ClpX, apoptóza, energetický metabolismus

Abstract:

Mitochondria are some of the most complex organelles of eukaryotic cell. They have their own genome and transcriptional apparatus and maintain several key cellular functions. A substantial part of cellular energetic metabolism happens in the mitochondria, as well as formation of iron-sulfur complexes, synthesis of several key molecules and they are also the essential organelles for the apoptotic pathway. In order to maintain the quality of proteins in their oxidative environment, mitochondria have developed a complex system of proteases that reaches all the mitochondrial compartments that degrade damaged proteins and thus promote mitochondrial turnover. The aim of this work was to characterise function of ClpP subunit of ClpXP matrix protease, which role was not yet extensively investigated in human cells. Therefore, we used RNA-interference to silence expression of ClpP in HEK 293 cells and then we performed rescue experiment during which we reintroduced ClpP in cells. Our results show that the ClpP subunit does not actively participate in apoptotic pathway, nevertheless it is essential for correct assembly of all the respiratory complexes as well as the quality of mitochondria itself. We have also shown that the system of mitochondrial proteases is highly functional and that a lack of ClpP proteolytic function causes its disbalance when proteases of inner mitochondrial membrane copy the level of active ClpP by their own levels. We found out that absence of ClpX has even more drastic effect on cells then absence of ClpP. Overall these results confirm that ClpXP complex is an important mitochondrial quality control protease that ensures the maintenance of healthy mitochondrion status in human cells.

Key words:

mitochondria, mitochondrial protease, ClpXP, ClpP, ClpX, apoptosis, energetic metabolism

Seznam použitých zkratk:

zkratka	český výklad	z anglického
AFG3L2	AFG3-podobný protein 2	
AK	aminokyselina	
AML	akutní myeloidní leukemie	
ALA	5-aminolevulinová kyselina	
ATP	adenosintrifosfát	
ATP D, 6	podjednotky D a 6 ATP syntázy	(ATP-synthase subunit D, 6)
ATP23	proteáza ATP23	(ATP23 metallopeptidase and ATP synthase assembly factor homolog)
BAX	Bcl-2 asociovaný protein X	
ClpXP	kaseinolýtická peptidáza XP	(Caseinolytic peptidase XP)
COX 2, 4,5a	podjednotky cytochrom oxidázy	
eIF2- α	eukaryotický iniciační faktor α	
GAPDH	glyceraldehyd fosfát dehydrogenáza	
Grp75	glukózou regulovaný protein 75	
HPREP	lidská proteáza štěpící presekvence	(human presequence protease)
HTRA2	proteáza HTRA2	(high temperature requirement A 2)
IAP	protein inhibující apoptózu	(inhibitor of apoptosis protein)
Icp55	peptidáza odštěpující destabilizující N-koncovou AK	(Intermediate cleaving peptidase 55)
IMMP1L, IMMP2L	podjednotky 1 a 2 peptidázy vnitřní mitochondriální membrány	(inner mitochondrial membrane peptidase subunits 1, 2)
KD	umlčení genu	(knock-down)
KO	vyřazení funkce genu	(knock-out)
LACTB	protein podobný β -laktamáze	(β -lactamase-like protein)
LECA	poslední společný předek všech dnes žijících eukaryot	(last eukaryotic common ancestor)
LONP	Lon proteáza	
MEP	mitochondriální oligopeptidáza M	
METAP1D	methionyl aminopeptidáza typu 1D	
MIP	proteáza MIP	(mitochondriální intermediate peptidase)
MPP β	proteáza MPP β	(mitochondrial presequence protease β subunit)

mtND5	podjednotka 5 mitochondriální NADH dehydrogenázy	(mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5)
NDUFB4	podjednotka 4 β -subkomplexu NADH dehydrogenázy	(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4)
NQR	NADH:koenzym Q oxidoreduktáza	
NRF1	nukleární respirační faktor 1	
OMA1	homolog bakteriální proteázy s funkčním překryvem s m-AAA	(overlapping with the m-AAA protease 1 homolog)
OPA1	gen, resp. jeho proteinový produkt, jehož mutace vedla k atrofii optického nervu	(optic atrophy type 1)
OSCP	podjednotka OSCP ATP syntázy	(oligomycin sensitivity conferral protein)
OSGEPL1	proteáza OSGEPL1	(O-sialoglycoprotein endopeptidase-like protein 1)
OXPHOS	oxidativní fosforylace	
PARL	proteáza PARL	(Presenilins-associated rhomboid-like protein)
PARP	poly-(ADP-ribóza)-polymeráza	poly (ADP-ribose) polymerase
PGAM5	fosfoglycerát mutása 5	(phosphoglycerate mutase 5)
PITRM1	pitrilysinová metalopeptidáza 1	(pitrilysin metallopeptidase 1)
PHB 2	prohibitin 2	
PLP	pyridoxal-5-fosfát	
PINK1	kináza PINK1	(PTEN-induced putative kinase 1)
QCCR	koenzym Q - cytochrom c – oxidoreduktáza	
ROS	reaktivní formy kyslíku	(reactive oxygen species)
SDH A, SDH B	podjednotky A, B succinát dehydrogenázy	(succinate dehydrogenase A, B subunits)
SPG7	proteáza, jejíž mutace vede ke spastické paraplegii	(Spastic paraplegia 7)
TFAM	mitochondriální transcripční factor A	
TIM	přenašeč přes vnitřní mitochondriální membránu	(Translocase of the inner membrane)
TNF	tumor nekrotický factor	
TNFR2	TNF receptor 2	
TOM	přenašeč přes vnější mitochondriální membránu	(Translocase of the outer membrane)
TRAP-1	TNFR asociovaný protein-1	

mtUPR	odpověď na špatně sbalené mitochondriální proteiny	(unfolded mitochondrial protein response)
UQCRC1, UQCRC2	“core“ podjednotky 1 a 2 ubichinol-cytochrom c reduktázy	(Ubiquinol-Cytochrome c Reductase Core Protein 1 and 2)
USP30	ubiquitin-specifická proteáza 30	
VDAC1	mitochondriální porin	(Voltage-dependent anion-selective channel 1)
XPNPEP3	X-Pro aminopeptidáza 3	
YME1L1	proteáza YME1L1	(YME1 like 1 ATPase)

Obsah

Abstrakt:	iv
Klíčová slova:	iv
Abstract:	v
Key words:	v
Seznam použitých zkratk:	vi
Obsah	ix
1. Teoretický úvod	1
1.1 - Mitochondrie	1
1.1.1- Původ	1
1.1.2 - Struktura	2
1.1.3 - Funkce	3
1.2 - Lidské mitochondriální proteázy	4
1.2.1 - Lidské proteázy vnější mitochondriální membrány	5
1.2.2 - Lidské proteázy mezimembránového prostoru	5
1.2.3 - Lidské proteázy vnitřní mitochondriální membrány	6
1.2.4 - Lidské proteázy mitochondriálního matrix	8
1.3 - ClpXP	12
1.3.1 - Lidská unfoldáza ClpX	14
1.3.2 - Lidská peptidázová podjednotka ClpP	17
2. Cíle práce	21
3. Materiál a metody	22
3.1 – Materiály	22
3.1.1. Zakoupené chemikálie a komerčně vyrobené směsi	22
3.1.2. Roztoky připravené v laboratoři	24
3.1.3 - Biologický materiál	25
3.1.4 - Přístroje	25
3.2 - Metody	27
3.2.1 - Kultivace E. coli	27
3.2.2 - Izolace a purifikace plazmidů pro transfekci buněk	27
3.2.3 - Měření koncentrace DNA	28
3.2.4. Kultivace buněčné linie HEK 293	28
3.2.5. Opětovné zamražení buněk	29
3.2.6. Stanovení růstové křivky	29
3.2.7. Indukce apoptózy	29
3.2.8. Transientní transfekce buněk expresním plazmidem	30
3.2.9. Izolace mitochondrií	30

3.2.10. Měření koncentrace proteinu Bradfordové metodou.....	31
3.2.11. Měření koncentrace proteinu Lowryho metodou	31
3.2.12. Příprava vzorku na SDS-PAGE	31
3.2.13. SDS-PAGE elektroforéza.....	32
3.2.14. Western blot a imunodetekce	32
3.2.15. Barvení gelů	33
3.2.16. Koimunoprecipitace	33
3.2.17. Měření aktivit jednotlivých komplexů dýchacího řetězce	34
4. Výsledky.....	35
4.1 – ClpX a ClpP v ClpP KD buňkách	35
4.2 – Růstové křivky	36
4.3 – Vliv umlčení ClpP na HEK 293 buňky na některé proteiny	37
4.4 – Indukce apoptózy	41
4.5 – Reintrodukce ClpP v buňkách.....	43
4.6 – Příprava vzorků pro hledání interakčních partnerů ClpP	50
4.7 – Vliv puromycinu na náchylnost buněk k apoptóze	51
4.8 – Charakterizace aktivit komplexů dýchacího řetězce	52
5. Diskuze.....	54
6. Závěr.....	57
Reference:.....	58

1. Teoretický úvod

1.1 - Mitochondrie

1.1.1- Původ

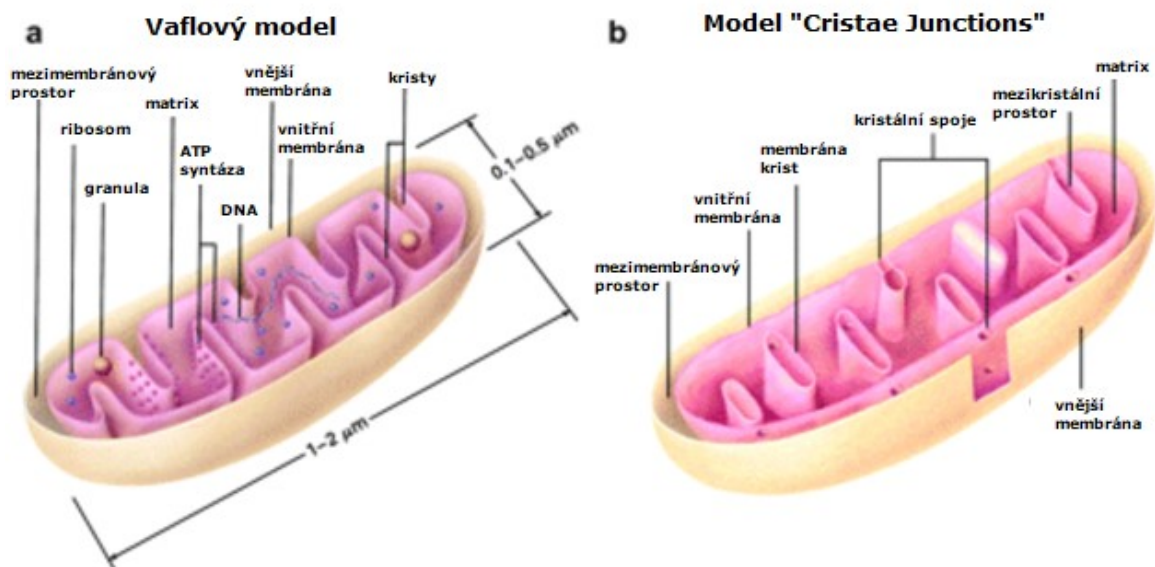
Mitochondrie patří mezi nejkompexnější organely eukaryotických buněk. Byly popsány už v roce 1890 pruským vědcem Richardem Altmannem, který je pojmenoval bioblasty (Altmann, 1890). Vyskytují se téměř u všech eukaryot a předpokládá se, že byly součástí LECA (last eukaryotic common ancestor) - posledního předka všech dnes žijících eukaryot. Už Altmann si všiml určité podobnosti mezi bioblasty a některými bakteriemi. V roce 1967 pak americká biologka Lynn Saganová předložila dodnes uznávanou endosymbiotickou teorii. Podle té jsou některé organely eukaryotických buněk (mitochondrie, plastidy a bazální tělísko) pozůstatky po bakteriích, které byly v minulosti pohlceny preeukaryotickou buňkou pravděpodobně archeálního typu (Sagan, 1967). Vzhledem k symbióze nemusely tyto bakterie uchovávat některé funkce, a postupně došlo k jejich redukci na dnešní tzv. semiautonomní organely.

Za předka mitochondrií dnešních eukaryotických buněk bývá považována α -proteobakterie, pravděpodobně z řádu Rickettsiales, rod *Rickettsia* (Carvalho et al., 2015). Tuto teorii o původu podporuje jak shoda na úrovni DNA, tak to, že stejně jako α -proteobakterie, i mitochondrie má dvě membrány. Ty mají podobnou charakteristiku jako membrány Gram negativních bakterií (Gray et al., 2001). Na základě shody aminokyselinové sekvence několika základních proteinů dýchacího řetězce byly za nejpříbuznější známé v současnosti žijící bakterie označeny právě *Rickettsie* (Carvalho et al., 2015).

V rámci eukaryot ale přesto neplatí, že by každá buňka měla vlastní mitochondrie. U některých organismů, žijících v anaerobních podmínkách, došlo časem k jejich redukci - časté je to především u parazitů. Takto vznikly hydrogenozomy a mitozomy, které často nemají ani vlastní genom (Archibald, 2015). Nedávné poznatky dokonce ukazují na možnou existenci eukaryot bez jakéhokoliv rezidua mitochondrií, kde veškeré mitochondriální funkce byly nepotřebné nebo nahrazeny komplexy v cytosolu. I u nich se ale, vzhledem ke komplexitě a postavení ve fylogenetickém stromu, dá očekávat, že jejich předkové mitochondrie měli a ztratili je až sekundárně (Karnkowska et al., 2016). I lidské buňky, v terminálně diferencovaném stavu mohou ztratit mitochondrie - příkladem takových buněk jsou erytrocyty, které ale krom mitochondrií v rámci diferenciaci ztrácejí i jádro, nejsou schopny dělení a v těle setrvávají krátce (Repsold and Joubert, 2018).

1.1.2 - Struktura

Stejně jako Gram negativní α -proteobakterie, i mitochondrie má dvě membrány. Ty fakticky mitochondriální prostor rozdělují na čtyři kompartmenty - vnější membránu, mezimembránový prostor, vnitřní membránu a mitochondriální matrix. Vnitřní membrána je výrazně zvrásněná a tvoří takzvané tubulární krysty. Ty výrazně zvyšují její funkční povrch (obrázek. č. 1). Někteří autoři uvádějí, že membrána krist a mezikristální prostor se liší dostatečně na to, aby mohly být považovány za další mitochondriální kompartmenty (Logan, 2006).



Obrázek č. 1: Vaflový a "Cristae Junctions" modely mitochondriální struktury

Vlevo (a) je znázorněn původní Palladeho vaflový model předpokládající prosté zvětšení povrchu, vpravo (b) pak novější model krystalních spojů, které by mohli být i uzavíratelné a umožňovat tak větší zakoncentrování meziproduktů v okolí komplexů dýchacího řetězce. (převzato a upraveno podle Logan, 2006).

Stejně jako všechny membránové organely, i mitochondrie musí řešit transport přes membránu. Mitochondrie sice mají vlastní transkripční a translační aparát, ale mnoho genů se v průběhu evoluce přesunulo z mitochondriálního genomu do jaderného. Lidský mitochondriální genom je cirkulární DNA o délce 16 569 párů bazí a obsahuje 37 genů, z nichž 24 genů kóduje sekvence pro mitochondriální transkripční aparát (22 genů pro tRNA, 2 geny pro rRNA) a zbylých 13 jsou geny pro proteiny oxidativní fosforylace (Anderson et al., 1981).

Naprostá většina mitochondriálních proteinů je tak kódována jaderným genomem a pro správnou funkci je nutné je do mitochondrií dopravit. K tomu slouží signální sekvence, která je součástí jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů (Saitoh et al., 2007). Ta je rozpoznána jedním z proteinů ze skupiny TOM (Translocase of outer mitochondrial membrane) a kotranslačně translokována přes membránu. V závislosti na přítomnosti a lokalizaci dalších signálních sekvencí pak protein zůstává ve vnější membráně, pokračuje do mezimembránového prostoru nebo do dalších mitochondriálních kompartmentů (Chacinska et al., 2009). Zároveň s tím mohou, ale nemusí, být některé lokalizační sekvence odštěpeny příslušnou peptidázou (Fukasawa et al., 2015).

1.1.3 - Funkce

Mitochondrie plní v eukaryotické buňce řadu funkcí. Základní a první objevenou je klíčová role mitochondrií v energetickém metabolismu buňky. V mitochondrii probíhající oxidativní fosforylace (OXPHOS) substrátu dává buňce možnost efektivněji využívat živiny, například sacharidy a lipidy. Dochází k jejich rozkladu na oxid uhličitý a molekuly vody, a zároveň se během tohoto procesu buňka zbavuje toxického kyslíku. Živiny přenášené do mitochondrií jsou enzymaticky degradovány uvnitř mitochondriální matrix, během čehož dochází k substrátové fosforylaci a současně k redukci přenašečů elektronů. Ty přenáší elektrony do dýchacího řetězce, lokalizovaného ve vnitřní membráně mitochondrií. Dýchací řetězec je pak zodpovědný za produkci základního přenašeče energie v buňce, molekuly ATP (adenosintrifosfát).

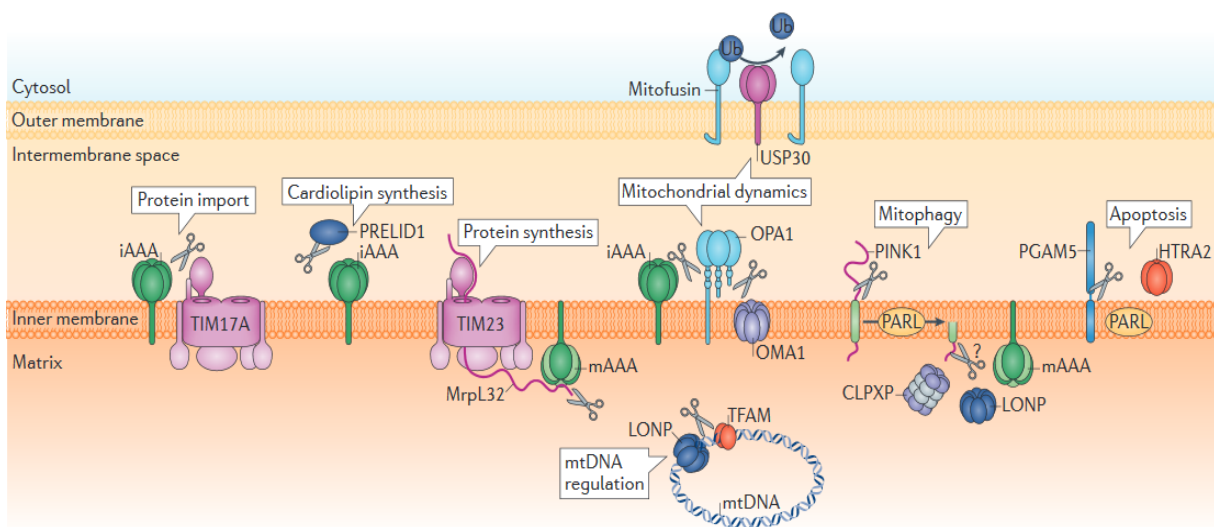
V průběhu přenosu elektronů na dýchacím řetězci dochází i k chybám, vedoucím k produkci ROS (reaktivních forem kyslíku). Za běžných podmínek je v mitochondrii i buňce jejich hladina nízká. Ve stresu ale prudce narůstá a vzhledem k toxicitě ROS může dojít i ke stavu neslučitelnému s životem buňky (Selivanov et al., 2011). Pravděpodobně i proto se mitochondrie staly součástí vnitřní apoptotické dráhy. Během apoptózy dochází k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytoplasmy. Zároveň dochází k přesunu p53 do mitochondrií, kde zvyšuje permeabilitu membrány a vede buňku k apoptóze nebo nekróze (Vaseva et al., 2012). V obou těchto procesech hrají nezanedbatelnou roli mitochondriální proteázy (Jiang et al., 2014; Sung et al., 2018).

Mezi další funkce mitochondrií pak patří především metabolismus železa a tvorba železosírných komplexů (Lill et al., 2012), dále jsou zodpovědné například za netřesovou termogenezi (Nicholls and Lindberg, 1973).

1.2 - Lidské mitochondriální proteázy

Stejně jako v jiných organelách, i v mitochondriích dochází k obratu proteinů. Mitochondrie tak mají své vlastní chaperon proteiny i vlastní proteázy, které zajišťují kontrolu kvality a případnou degradaci mitochondriálních proteinů. Dříve se předpokládalo, že mitochondriální proteázy pouze konstitutivně odbourávají proteiny a zajišťují tak jejich obrat. V posledních letech se ale ukazuje, že mají často vícero nesouvisejících funkcí a účastní se mnoha signálních drah souvisejících s buněčným vývojem, energetikou i s buněčnou smrtí (Quirós et al., 2015). Mitochondriální děje, kterých se proteázy účastní, jsou zobrazeny na obrázku č. 2.

Lidský genom kóduje 20 genů pro mitochondriálně specifické proteázy. Tyto proteázy se liší lokalizací v mitochondriálních kompartmentech, aktivním centrem, substráty i dalšími funkcemi (Quirós et al., 2015). V mitochondriích se mohou transientně vyskytovat i některé proteázy cytosolické, ty však nejsou do uvedených dvaceti zahrnuty a tato práce se jimi dále nezabývá.



Obrázek č. 2: Proteolytická regulace mitochondriálních dějů

Na obrázku jsou uvedeny některé mitochondriální proteázy (iAAA, mAAA, USP30, HTRA2, OMA1, PARL, LONP, ClpXP) a jejich role v různých buněčných funkcích. Proteázy se tak účastní importu proteinů a degradace špatně sbalených proteinů, ale regulují i velké množství dalších mitochondriálních i buněčných dějů. Hned několik proteáz má významnou roli v mitochondriální části apoptotické dráhy (převzato z Quirós et al., 2015).

1.2.1 - Lidské proteázy vnější mitochondriální membrány

Vnější mitochondriální membrána je pórovitá struktura s vysokou propustností pro ionty i malé molekuly. Pravděpodobně se jedná o evoluční zbytek původní vnější membrány gram negativní bakterie. Obsahuje translokátorové proteiny poriny, receptory a další proteiny, které tvoří TOM komplexy. I v ní je tedy potřeba kontrola kvality a obrát proteinů. V lidských mitochondriích byla nalezena jedna mitochondriální proteáza, USP30 (ubiquitin-specific protease 30). Jedná se o jedinou mitochondriální cysteinovou proteázu (Quirós et al., 2015). USP30 má funkci deubiquitinylační. Právě deubiquitinylace prostřednictvím USP30 má roli v mitochondriální dynamice, kde brání fúzi mitochondrií (Yue et al., 2014) a současně inhibuje mitofági (Marcassa et al., 2018).

1.2.2 - Lidské proteázy mezimembránového prostoru

V mezimembránovém prostoru se vyskytují čtyři solubilní mitochondriální proteázy. Jedná se o dvě metaloproteázy, MEP (mitochondrial oligopeptidase M) a ATP23 (ATP23 metallopeptidase and ATP synthase assembly factor homolog), a dvě serinové proteázy, HTRA2 (high temperature requirement A 2) a LACTB (β -lactamase-like protein) (Quirós et al., 2015).

Oligopeptidáza MEP, též uváděna jako neurolysin, odbourává neurotensin, bradykinin a dynorphin A (Barelli et al. 1993), kontroluje kvalitu proteinů (Serizawa et al., 1995) a metabolismus glukózy (Cavalcanti et al., 2014). Na tkáňové úrovni se pak MEP podílí na zotavování po infarktu (Rashid et al., 2013). Jako ostatní oligopeptidázy, i u MEP mezi funkce patří štěpení oligopeptidů na volné aminokyseliny.

Funkce metaloproteázy ATP23 zatím v savčích buňkách nebyla blíže popsána, na rozdíl od jejího kvasinkového homologu, který se podílí například na maturaci a asemblaci (tj. správnému sestavení kvartérní struktury) ATP6 podjednotky mitochondriální ATP syntázy. K tomu ATP23 využívá jak svou proteázovou, tak svou chaperonovou funkci (Zeng et al., 2007). Nicméně kvasinkový ATP23 není schopný maturovat savčí ATP6 (Potting et al., 2010), takže není jasné, jestli savčí má ATP23 tuto funkci zachovanou. V kvasinkách funguje jako procesující peptidáza a zajišťuje kontrolu kvality proteinů (Osman et al., 2007) a lze předpokládat, že v savčích buňkách by tato role mohla být zachována.

HTRA2, též označovaná Omi, je ATP-nezávislá serinová proteáza. Má důležitou roli v apoptóze, kde se uvolňuje do cytosolu a vyvazuje na sebe inhibitory apoptózy. Apoptózu podporuje i svou proteázovou aktivitou (Verhagen et al., 2002). Zároveň brání invazivitě buněk za zvýšeného p53 tím, že ve fosforylované formě v cytoplasmě štěpí filamentární aktin (Yamauchi et al., 2014). V některých tkáních je proapoptotická funkce HTRA2 potlačena naštěpením další mitochondriální proteázou PARL (Chao et al., 2008). HTRA2 dále funguje jako protein kontroly kvality a má úlohu v udržování membránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. V knock-outových (KO) studiích trpěli KO linie nedostatkem ATP a HTRA2 KO myši vykazovali dýchací problémy (Plun-Favreau et al., 2012). Jiná studie ukázala zase na zvýšenou úroveň mutací mitochondriální DNA v HTRA2 deficientních liniích (Goo et al., 2013).

Posledním zástupcem lidských proteáz mezimembránového prostoru je serinová LACTB (β -lactamase-like protein) proteáza. V mitochondriích může polymerovat v uspořádaná filamenta dlouhá přes 100 nm (Polianskyte et al., 2009), její funkce by tedy mohla být částečně strukturní. Dále reguluje metabolismus lipidů, čímž funguje jako tumor supresor. Odbourává totiž fosfatidylserin dekarboxylázu a brání tak syntéze mitochondriálního ethanolaminu (Keckesova et al., 2017).

1.2.3 - Lidské proteázy vnitřní mitochondriální membrány

Ve vnitřní mitochondriální membráně se vyskytují čtyři metaloproteázy: AFG3L2 (AFG3-like protein 2), SPG7 (Spastic paraplegia 7), OMA1 (overlapping with the m-AAA protease 1 homolog) a YME1L1 (YME1 Like 1 ATPase); a tři serinové proteázy: IMMP1L, IMMP2L (inner mitochondrial membrane peptidase subunit 1; 2) a PARL (presenilins-associated rhomboid-like protein). Vedle funkce a substrátů se liší i tím, jestli proteolytická podjednotka míří do matrix nebo do mezimembránového prostoru.

AFG3L2 tvoří homokomplexy nebo heterokomplexy s SPG7, též zvaným paraplegin. Funkce těchto komplexů je závislá na ATP a jejich poměr je tkáňově specifický (Koppen et al., 2007). Tyto komplexy jsou svou proteázovou doménou otočeny do mitochondriální matrix a jsou označovány m-AAA proteázou. Pomáhají tam sestavení ribozomálního komplexu (Nolden et al., 2005), zároveň mají roli v udržení rovnováhy mezi fúzí a dělením

mitochondrií, kde kompetují s další proteázou zvanou OMA1. Mutace SPG7 vede k onemocnění spastická paraplegie (Casari et al., 1998).

OMA1 tvoří homokomplexy, které mají proteázovou doménu natočenou do mezimembránového prostoru (Ehse et al., 2009). Při absenci m-AAA dochází ke štěpení proteinu OPA1 (optic atrophy type 1) pouze proteázou OMA1 a nevznikají tak dlouhé izoformy OPA1. Právě ty jsou zásadní pro fúzi mitochondrií. Naopak krátké izoformy OPA1 v nepřítomnosti dlouhých izoform vedou k mitochondriální fragmentaci (Anand et al., 2014).

I čtvrtá metaloproteáza vnitřní mitochondriální membrány YME1L1 se podílí na sestřihu OPA1 (Anand et al., 2014). YME1L1, též označovaná jako i-AAA, má stejně jako OMA1 aktivní proteolytické místo natočené do mezimembránového prostoru. Tam YME1L1 kompetuje s OMA1, a podobně jako m-AAA vede ke tvorbě dlouhých forem OPA1, a tedy k fúzi mitochondrií (Anand et al., 2014). Aktivita YME1L1 je zvýšena při vysokých hladinách oxidativní fosforylace a spojuje tak OXPHOS a fúzi mitochondrií (Mishra et al., 2014). Také se podílí na odpovědi proti zvýšené koncentraci špatně sbalených mitochondriálních proteinů, tzv. mtUPR (unfolded mitochondrial protein response) (Aldridge et al., 2007).

Kromě vlivu na biogenezi mitochondrií mají metaloproteázy vnitřní mitochondriální membrány také roli v kontrole kvality proteinů v mitochondriích a podílejí se tak na udržení mitochondriální homeostázy (Bohovych et al., 2015; Casari et al., 1998; Stiburek et al., 2012).

Serinové proteázy vnitřní membrány IMMP1L a IMMP2L jsou proteázovou doménou natočeny do mezimembránového prostoru. IMMP1L a IMMP2L mají roli v maturaci a tvorbě kvartérní struktury TIM23 (Translocase of the inner membrane) komplexu (Ieva et al., 2013). Také se účastní transportu proteinů do mitochondriálních kompartmentů procesováním, tedy odštěpením signálního peptidu (Chen et al., 1999). Mutace v genu IMMP2L jsou spojené s různými patologiemi. Při cílené mutaci myšího IMMP2L docházelo k poruše fertility (Lu et al., 2008). Byla zjištěna korelace mezi delecemi v genu pro IMMP2L a autismem i Gilles de la Touretovým syndromem (Petek et al., 2007; Bertelsen et al., 2014), stejně jako mezi mikrodlecemi a mikroduplicacemi IMMP2L a různými nervově-vývojovými poruchami (Gimelli et al., 2014).

Posledním členem proteáz vnitřní mitochondriální membrány je serinová rhomboidní proteáza PARL. PARL má, podobně jako ostatní rhomboidní proteázy, proteolytickou doménu uvnitř membrány a štěpí pomocí ní transmembránové peptidové řetězce uvnitř lipidové dvojvrstvy (Lemberg et al., 2005). PARL takto štěpí například dříve zmíněný protein OPA1, do mezimembránového prostoru se tak uvolňuje dlouhá antiapoptotická izoforma OPA1 (Sanjuán Szklarz and Scorrano, 2012). Ta vede k remodelaci krist a brání tak uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Cipolat et al., 2006).

Kromě toho může PARL bránit apoptóze i tím, že štěpí proapoptotickou proteázu mezimembránového prostoru HTRA2, čímž brání akumulaci proteinu BAX (Bcl-2-associated X protein) ve vnější mitochondriální membráně (Chao et al., 2008). Také za určitých podmínek štěpí protein PGAM5 (phosphoglycerate mutase 5), který je zodpovědný za vstup do regulované nekrózy (Sekine et al., 2012; Wang et al., 2012). Kromě výše zmíněných je PARL také zodpovědný za správnou lokalizaci proteinu PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1). Mutace v PINK1 je, vedle mutací v genu PARKIN, nejčastější příčinou Parkinsonovy choroby. Bylo zjištěno, že i mutace PARL může vést prostřednictvím chybné lokalizace PINK1 ke stejnému fenotypu, tj. k Parkinsonově chorobě (Shi et al., 2011).

1.2.4 - Lidské proteázy mitochondriálního matrix

V matrix lidských mitochondrií se vyskytuje šest různých metaloproteáz: MIP (mitochondrial intermediate peptidase), PMPCB (mitochondrial presequence protease β), PITRM1 (pitrilysin metallopeptidase 1), OSGEPL1 (O-sialoglycoprotein endopeptidase-like protein 1), METAP1D (methionyl aminopeptidase type 1D) a XPNPEP3 (X-Pro aminopeptidase 3); a dvě serinové proteázy: ClpXP (Caseinolytic peptidase XP) a LONP (Lon protease).

Metaloproteáza MIP je matrixovou oligopeptidázou, která se v některých případech účastní procesování importovaných proteinů tím, že jim po odstřížení signální sekvence běžnou procesující peptidázou odstříhne ještě 8 aminokyselin dlouhou sekvenci na N-konci importovaného proteinu (Isaya et al., 1992). Tento proces je pravděpodobně důležitý pro určení stability proteinů v mitochondriích, protože odstřížený oktapeptid často nese destabilizující aminokyseliny (Vögtle et al., 2011). Bylo zjištěno, že MIP štěpí preferenčně

mezi dvěma nenabitými polárními aminokyselinami (serin, threonin, glutamin) v pozicích 8 a 9 od N-konce (Marcondes et al., 2015).

MIP hraje roli v regulaci signální dráhy Notch-receptoru, který v určitých situacích putuje do mitochondrií a tam je substrátem MIP peptidázy (Lee et al., 2011). Dalším ze substrátů je Sirtuin 3, který reguluje kvalitu mitochondrií a podporuje buněčnou dlouhověkost (Kobayashi et al., 2017). Recesivní mutace v genu pro MIP může způsobit řadu zdravotních problémů, od šedého zákalu, přes nekompakce levé komory, hypotonii, až po smrt novorozence (Eldomery et al., 2016).

Proteáza PMPCB, též označována jako MPP β , je stejně jako YME1L1 aktivována při mtUPR (Aldridge et al., 2007). Jakožto procesující proteáza je PMPCB zodpovědná za maturaci až 70% mitochondriálních jaderně kódovaných proteinů. Dříve se proto předpokládalo, že mutace v PMPCB by byly letální. Nově ale bylo diagnostikováno několik nepříbuzných rodin pacientů s mutací v PMPCB vedoucí k neurodegenerativním onemocněním v dětství, způsobené ukládáním nematurovaných proteinů v mitochondriích (Vögtle et al., 2018).

Metaloproteáza PITRM1, též zvaná HPREP (human presequence protease), patří do pirtilysinové rodiny proteáz (Alikhani et al., 2011). Její významnou funkcí v mitochondriích je rozštěpení odštěpených signálních peptidů. Analogicky štěpí i Amyloid- β peptidy, jejichž zvýšená koncentrace pak v případě Alzheimerovy choroby vede k inhibici degradace ostatních peptidů, jejich usazování a tvorbě amyloidních plaků (Mossmann et al., 2014). Stejně tak mutace v genu pro PITRM1 často vede k rozvoji Alzheimerovy choroby (Boczonadi and Horvath, 2016). Zároveň specifická mutace v PITRM1 vede k rozvoji amyloidogenní neuropatie (Smith-Carpenter and Alper, 2018).

OSGEPL1 je metaloproteáza, která má u nižších eukaryotických organismů (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*) roli v udržování stability genomu (Oberto et al., 2009). Proteiny rodiny YgjD/Kae1, kam OSGEPL1 spadá, se účastní například stabilizace telomer a modifikací tRNA (El Yacoubi et al., 2011). Funkce OSGEPL1 v lidských mitochondriích však zatím nebyla blíže probádána.

Metaloproteáza METAP1D, také označovaná MAP1D je vysoce konzervovaná peptidáza, která odštěpuje methioninový zbytek na N-konci proteinů (Serero et al., 2003). Její

zvýšená exprese byla zaznamenána v rakovinných buňkách u rakovin tlustého střeva, prsu i plic. Zároveň při inhibici exprese METAP1D došlo ke snížení schopnosti rakovinných buněk růst bez vazby k podkladu (Leszczyniecka et al., 2006; Randhawa et al., 2013).

Poslední mitochondriální metaloproteázou je XPNPEP3, která procesuje některé mitochondriální proteiny tím, že jim odštěpí jednu AK (aminokyselinu) na N-konci (Singh et al., 2017). V případě kvasinkového homologa Icp55 (Intermediate cleaving peptidase 55) se u všech 38 objevených substrátů jednalo o hydrofobní AK - fenylalanin, tyrosin nebo leucin, které v kvasinkových systémech působí destabilizačně. Současně po odštěpení AK zůstala téměř pokaždé na N-konci stabilizující AK - serin, alanin nebo threonin (Vögtle et al., 2009). Je zde tedy předpoklad, že XPNPEP3 by mohla kontrolovat mitochondriální proteiny po procesování jinými peptidázami a v případě výskytu destabilizující AK zajistit její odštěpení a tak prodloužit poločas setrvání proteinu v mitochondrii. Kromě toho XPNPEP3 má roli v signalizaci TNF (tumor necrosis factor), kde se XPNPEP3 uvolní z mitochondrie a váže se na TNFR2 (TNF receptor 2) za tvorby nového komplexu (Inoue et al., 2015). Také byla popsána mutace v lidském genu pro XPNPEP3, vedoucí k onemocnění ledvin zvanému nefropatie (O'Toole et al., 2010).

Asi nejvíce prostudovanou lidskou mitochondriální proteázou je solubilní serinová proteáza LONP. LONP patří do rodiny AAA proteáz, skupiny, která pro rozbalení peptidu a jeho přesun do proteolytické domény vyžaduje ATP. LONP je zodpovědná za selektivní degradaci poškozených, špatně asemblovaných proteinů. Současně také regulovaně odbourává některé proteiny, které nejsou zrovna potřeba, a zajišťuje obrat proteinů v mitochondriálním matrix. LONP ale neovlivňuje proteinové složení mitochondrií jen čistou proteolýzou, váže se také na nukleové kyseliny a ovlivňuje tak přímo transkripci a translaci mitochondriálně kódovaných genů (Liu et al., 2004). Jedním ze substrátů LONP je mitochondriální transkripční faktor A (TFAM). Předpokládá se, že právě přes udržování hladiny TFAM LONP reguluje jak translaci v mitochondriích, tak množství kopií mitochondriální DNA (Matsushima et al., 2010). Degradace TFAM prostřednictvím LONP ale podléhá přísné regulaci, LONP například není schopný degradovat TFAM, dokud je TFAM vázaný na DNA (Lu et al., 2013).

LONP má roli v regulaci metabolismu (Kita et al., 2012), funguje jako protein kontroly kvality, a umožňuje tak adaptaci na akutní oxidativní stres. Zvýšená exprese LONP se ale,

podobně jako u jiných proteáz, pojí s různými patologiemi. Jeho stabilně zvýšená hladina byla zaznamenána v případech chronického stresu a v souvislosti s tím se očekává, že vysoká exprese LONP je částečně zodpovědná za stárnutí buněk. Zároveň ale zvýšená exprese LONP koreluje s agresivními fenotypy nádorových buněk, které jsou pak náchylnější k transformaci, projevují větší invazivitu a zvýšenou odolnost k apoptóze. Za tyto jevy je částečně odpovědná vyšší koncentrace Fe-S proteinu NDUFS8 komplexu I dýchacího řetězce, a jím produkovaných ROS (Cheng et al., 2013). Současně bylo prokázáno na buňkách karcinomu děložního hrdla a rakoviny tlustého střeva, že pokud je rakovinným buňkám zpětně downregulována hladina LONP, snižuje se schopnost proliferace těchto rakovinných buněk (Nie et al., 2013; Gibellini et al., 2014). To poukazuje na možné budoucí využití těchto poznatků v diagnostice a případně i léčbě těchto rakovin. Na buňkách lymfomu bylo testováno potenciální terpenové terapeutikum, které má jako jednu z funkcí právě inaktivaci LONP. Jeho aplikace vedla k výraznému zvýšení úmrtnosti rakovinných buněk (Bernstein et al., 2012). Jiná studie provedená na HELA buňkách ale ukázala, že poznatky ohledně funkce LONP nejsou plně zobecnitelné a funkce LONP pravděpodobně bude i tkáňově specifická (Bayot et al., 2014). V rámci výzkumů poslední doby se ukazuje, že antiapoptotická funkce LONP je dána nejen proteolýzou poškozených mitochondriálních proteinů, ale i přímým vyvázáním a inaktivací p53, centrálního kontrolního proteinu buněčného stavu (Sung et al., 2018). Naproti tomu mutace v LONP jsou spojeny s multi-systémovým onemocněním označovaným CODAS (Strauss et al., 2015).

Druhou serinovou proteázou mitochondriálního matrix je AAA proteáza ClpXP. V centru komplexu ClpXP je 14-ti podjednotkový komplex ClpP, který je zodpovědný za proteolytickou funkci, zatímco na konce ClpP barelu dosedají dva 6-ti podjednotkové prstence ClpX, které mají za úkol mechanicky denaturovat substrátové proteiny a následně je přesunout do proteolytického centra ClpP (Baker and Sauer, 2012). Oba tyto procesy vyžadují hydrolýzu ATP. Funkce komplexu ClpXP jsou prozkoumány výrazně méně, než je tomu u LONP, ví se ale, že obdobně jako LONP i ClpXP je zodpovědný za kontrolu kvality mitochondriálních proteinů a předpokládá se, že se bude účastnit i dalších mitochondriálních dějů (Haynes et al., 2007).

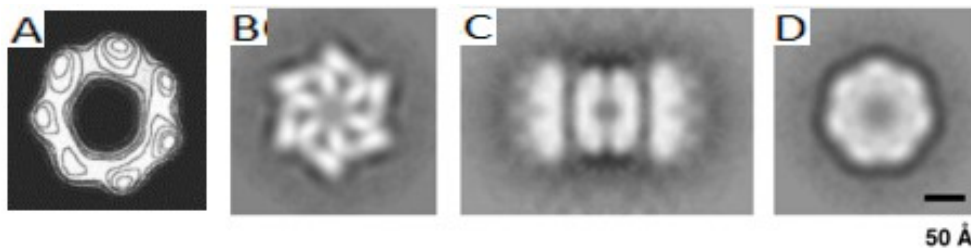
Recesivní mutace ClpP je zodpovědná za Perraultův syndrom, onemocnění, mezi jehož nejvýraznější projevy patří ztráta sluchu a dysfunkce vaječnicků (Jenkinson et al., 2013). Tato práce je zaměřena právě na funkci ClpXP, a proto je této proteáze věnována vlastní kapitola (viz kapitola 1.3 - ClpXP).

1.3 - ClpXP

Komplex ClpXP je evolučně konzervovaný. Vyskytuje se už bakterií, např. u *Escherichia coli*, kde je patrná výhoda modularity tohoto komplexu - na peptidázovou ClpP podjednotku může nasedat několik různých „rozbalovacích“ podjednotek a udávat tak specifitu. U *E. coli* se tak vyskytují dva komplexy využívající peptidázovou podjednotku ClpP - ClpXP a ClpAP, u nichž je proteolytická specifita udávána právě proteiny ClpX, resp. ClpA (Buczec et al., 2016). Obdobně je tomu i u bakterie *Caulobacter crescentus*, kde mají komplexy ClpXP a ClpAP významnou roli při asymetrickém dělení (Williams et al., 2014).

Lidské mitochondrie sice mají s bakteriemi společného předka, ale evolucí postupně došlo k výrazné redukci mitochondriálních genů a tak se v lidských mitochondriích vyskytuje pouze jeden komplex, a to ClpXP. Při pokusech vytvořit hybridní komplex z lidského ClpP a bakteriálního ClpX (z *E. coli*) vznikl funkční komplex hClpP-eClpX rozpoznávající bakteriální substráty (Kang et al., 2002). Tyto výsledky ukazují na evoluční konzervovanost komplexu a současně podporují dogma, že podjednotkou udávající specifitu je právě ClpX.

Jak bylo zmíněno výše, jednotlivé podjednotky ClpP i ClpX se vyskytují v oligomerech. ClpP tvoří 7-mi podjednotkový barel. Na ten může dosednout hexamerický prstenec ClpX (viz obrázek č. 3).

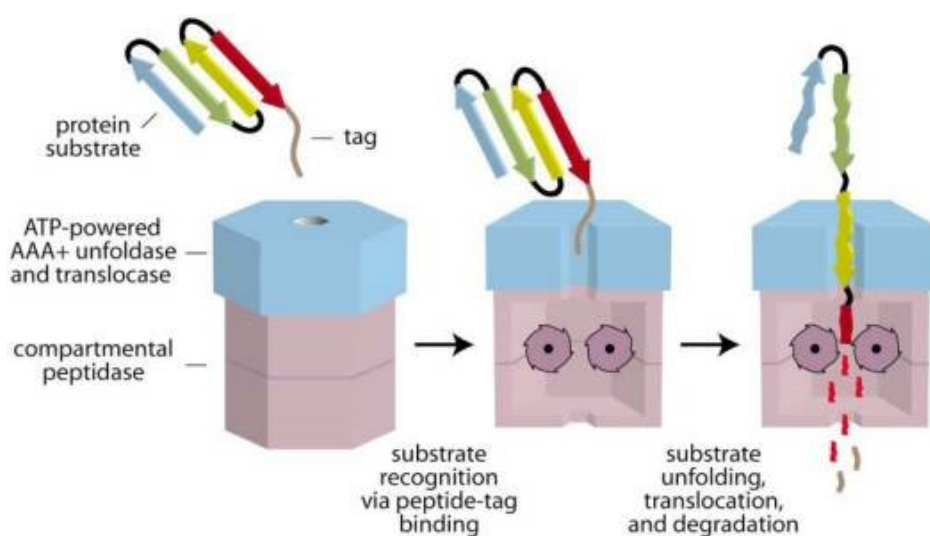


Obrázek č. 3: určení stavby komplexu ClpXP elektronovou mikroskopií

Stavba komplexu ClpXP se zpočátku studovala pomocí elektronové mikroskopie. Na obrázcích A a D jsou fotografie heptameru ClpP, na obrázku B je fotografie hexameru ClpX a na obrázku C je fotografie celého komplexu při pohledu ze strany. Fotografie A vznikla složením 219-ti samostatných fotografií (převzato z de Sagarra et al., 1999). Na fotografii C je dobře patrná stavba dvou barelů ClpP, na které následně z obou stran nasedají prstence ClpX. Dále je z fotografií B, C a D patrné, že heptamer ClpP má průměr okolo 120 Å, hexamer ClpX má průměr okolo 150 Å a celý komplex ClpXP má délku okolo 200 Å (převzato z Kang et al., 2002).

Zatímco u bakteriálních buněk se ClpP běžně vyskytuje v 14-ti podjednotkovém komplexu, v lidských buňkách je ClpP běžně ve formě heptameru. Až nasednutí ClpX je impulzem, který vede heptamerický komplex ClpP v lidských buňkách k dimerizaci za tvorby tetradekamerického dvoj-barelu ClpXP. Teprve tento 26-ti podjednotkový komplex ClpXP je pak plně funkční a je schopen proteolýzy. Zdá se, že vazba ClpX současně ovlivňuje konformaci katalytického místa ClpP (Kang et al., 2005).

Samotná funkce komplexu je založena na několika fázích - prvně ClpX rozpozná substrát a společně s ním nasedne na soudkovitou strukturu heptameru ClpP. Ve druhé fázi je aktivována ATPázová aktivita ClpX a komplex začne mechanicky rozbalovat vlákno substrátového proteinu a přesouvat ho do kanálku uprostřed heptamerického kruhu ClpP, kde se nachází jeho katalytické místo. Stejně jako v mnoha dalších serinových proteázách, i zde má klíčovou roli katalytická triáda (Kang et al., 2002). V katalytickém místě souběžně komplex ClpP svou peptidázovou aktivitou degraduje denaturovaný protein na krátké oligomery (viz obrázek č. 4). U bakteriálního homologu štěpí ClpP své substráty na oligopeptidy o 7-8 AK (Choi and Licht, 2005).



Obrázek č. 4: Schematický model funkce jednotlivých podjednotek ClpXP

Na obrázku je schematicky znázorněna degradace proteinů prostřednictvím komplexu ClpXP. Podjednotka ClpX nejprve musí rozpoznat signální značku (sekvenci, marker poškození apod.) na substrátovém proteinu (obrázek vlevo). Poté ho naváže (prostřední obrázek) a za spotřeby ATP ho začne mechanicky denaturovat a vytahovat z něj peptidové vlákno, které následně podjednotka ClpP degraduje na oligopeptidy (obrázek vpravo). I samotná degradace je závislá na ATP (převzato ze Sauer et al., 2004).

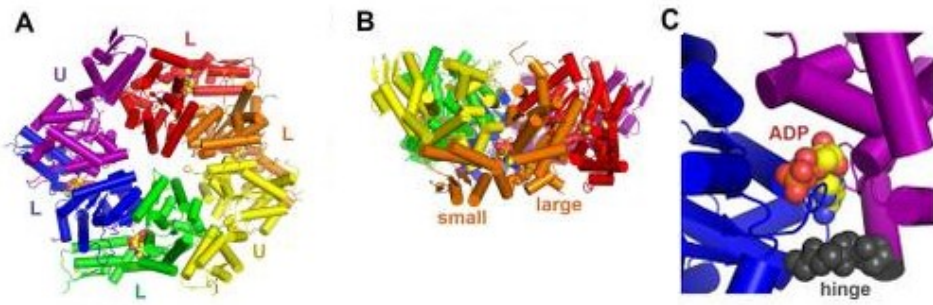
1.3.1 - Lidská unfoldáza ClpX

Gen pro lidský homolog bakteriální ClpX podjednotky proteázy ClpXP se nachází na 15. chromozomu v pozici 22.1–22.32, má 14 exonů a 13 intronů (Corydon et al., 2000). U myšičího modelu měli jednotlivé tkáňově specifické izoformy délku transkriptu mezi 2,6 a 2,9 kb. Vyšší exprese byla zaznamenána v játrech a varlatech, naopak snížená hladina ClpX se vyskytuje v srdečním svalu a v ledvinách (Santagata et al., 1999).

Lidská unfoldáza ClpX (z anglického “unfold“ - rozbalit) je zodpovědná za rozpoznání substrátových proteinů, sestavení funkčního ClpXP komplexu a denaturaci substrátu na samostatné lineární peptidové vlákno. Denaturace je energeticky nevýhodná a proto na ni ClpX spotřebovává ATP. Není přesně dáno, kolik ATP unfoldáza spotřebuje na určitou délku proteinu, množství spotřebovaného ATP je odvozeno od stability substrátu - může se jednat o 10 ATP/molekula málo stabilního substrátu, ale také o více než 500 ATP/molekula substrátu s vysokou stabilitou (Kenniston et al., 2003, 2004).

K vazbě a následné hydrolýze ATP dochází uvnitř ClpX mezi tzv. Walker A a Walker B motivy (Kim et al., 2001). Schopnost ClpX hydrolyzovat ATP ale zjevně není klíčová pro degradaci všech substrátů. Některé málo sbalené, například fluorescenčně značený kasein, jsou degradovány komplexem ClpXP i při inhibici hydrolýzy ATP na podjednotce ClpX mutací ve Walker B motivu. Vazba ATP je však stále klíčová pro tvorbu funkčního ClpXP komplexu a hydrolýza ATP výrazně zvyšuje procesivitu komplexu ClpXP (Lowth et al., 2012). V hexameru není vázáno trvale ATP na všech podjednotkách, ale vždy jsou dvě podjednotky proti sobě volné - došlo na nich k uvolnění ATP při poslední translokaci (Glynn et al., 2009). Stavba lidského hexameru ClpX a vazba ATP je znázorněná na obrázku č. 5.

Vlákno, které ClpX rozbalí, je současně translokováno do katalytického jádra ClpXP komplexu, kde dochází k jeho degradaci. Substrát se tak nikdy nevyskytuje rozbalený celý, výjimkou mohou být pouze velmi krátké peptidové substráty nebo substráty bez globulární terciární struktury. Signální peptidická sekvence, kterou ClpX rozpoznává, se vyskytuje na C-konci. Rozbalení, translokace i následná degradace tedy probíhá od C-konce k N-konci. Během jedné translokace dochází běžně k posunu vlákna o 5-8 AK (Aubin-Tam et al., 2011).



Obrázek č. 5: Hexamer ClpX a jeho vazba ATP

Na obrázku A a B jsou modely hexameru ClpX se znázorněnými sekundárními strukturami (alfa helixy), včetně navázaných ATP. Barvami jsou rozlišeny jednotlivé podjednotky. Na obrázku A je prstenec ClpX z pohledu ze směru, odkud vstupuje do komplexu peptidové vlákno substrátu. Podjednotky označené L mají navázané ATP (loaded), podjednotky označené U navázané ATP nemají (unloaded). Obrázek B je tentýž komplex při pohledu ze strany. Jsou na něm vyznačeny malá a velká doména podjednotky ClpX. Na obrázku C je znázorněná vazba ATP v ATP-vazebném místě (převato z Baker and Sauer, 2012).

Podobně jako LONP, i ClpXP má vedle proteolytické funkce také funkci chaperonu. Předpokládá se, že napomáhá komplexu udržovat mitochondriální homeostázu a fungovat jako významný protein kontroly kvality (Santagata et al., 1999).

Současně bylo ukázáno, že při KD (knockdownu) genu pro ClpX dochází ke zvětšení mitochondriálních nukleoidů. Obdobně se tomu děje i při KD hlavního nukleoidového proteinu TFAM, naproti tomu KD podjednotky ClpP nemá na velikost nukleoidu vliv. Současně ani dvojitý KD TFAM a ClpX zároveň nevedl ke znásobení efektu, z čehož lze usuzovat, že ClpX a TFAM leží sériově za sebou v jedné dráze. Předpokládá se tedy, že ClpX svou chaperonovou aktivitou samostatně a bez přítomnosti ClpP zvyšuje afinitu TFAM k mitochondriální DNA a reguluje tak množství kopií mitochondriální DNA. Tuto teorii podporuje i pokus, ve kterém byla v buňkách s KD ClpP experimentálně zvýšena exprese TFAM a došlo k supresi dopadu KD na velikost nukleoidu (Kasashima et al., 2012). Lze tedy očekávat, že zde působí mitochondriální matrixové proteázy protichůdně - podjednotka ClpX podporuje vazbu TFAM k DNA, zatímco pro LONP je TFAM substrátem určeným k degradaci (Kasashima et al., 2012; Lu et al., 2013).

Dále má chaperonová aktivita ClpX roli například v biosyntéze hemu. Tu stimuluje tím, že interaguje s enzymem ALAS, který syntetizuje 5-aminolevulinovou kyselinu (dále ALA). ALA je prvním z prekurzorů v biosyntetické dráze hemu. ClpX pomůže sestavení ALAS tak, že zprostředkuje vazbu holoenzymu na jeho kofaktor, pyridoxal-5-fosfát (dále PLP), aktivní formu vitamínu B6. ClpX rozbálí holoenzym ALAS v přítomnosti PLP, aniž by ALAS byl komplexem naváděn k degradaci. V rámci opětovného skládání dochází k vazbě PLP (Kardon et al., 2015). Zároveň by se ale měl ClpX komplex podílet i na negativní zpětné vazbě, tj. při dostatečné zásobě hemu degradovat ALAS. ALAS je při dostatku hemu oxidován a následně degradován, není však zatím přesně znám mechanismus, jak k tomu dochází (Kubota et al., 2016).

Jako jedna z proteáz, která oxidovaný ALAS odbourává, se jeví LONP (Tian et al., 2011). S těmito poznatky souvisí i fakt, že mutace genu pro ClpX vede k narušení dráhy biosyntézy hemu. To vede k patologickému stavu, kdy se v důsledku zvýšené stability ALAS v buňce hromadí meziprodukt syntézy hemu, protoporfirin IX. Jeho vysoká koncentrace je jednou z příčin rozvoje erytropoetické protoporfýrie, třetího nejčastějšího druhu porfýrie (Yien et al., 2017).

ClpX má schopnost vázat i proteiny ze skupiny IAP (inhibitor of apoptosis protein). Tyto proteiny jsou zodpovědné za inhibici některých kaspáz a cysteinových proteáz (Verhagen et al., 2001). Zde zatím však není známo, jestli tato vazba opravdu je dokladem role ClpX v apoptotické dráze, nebo jestli jde jen o vazbu rozpoznávající chybnou lokalizace ClpX a následně vedoucí k proteazomální degradaci chybně lokalizovaného proteinu (Verhagen et al., 2007).

Bylo ukázáno, že ClpX má roli v mtUPR, ta je ale závislá na ClpP. Jedná se tedy o doklad toho, že komplex ClpXP je významným členem dráhy kontrolující kvalitu proteinů mitochondriální matrix (Al-Furoukh et al., 2015). Roli savčího komplexu ClpXP v mtUPR zaznamenal Zhao už na začátku tohoto tisíciletí na opičích buňkách (Zhao et al., 2002). Jiný výzkumný tým však zase ukázal, že samotná ClpP podjednotka mtUPR nereguluje, ani pro mtUPR není vyžadována (Seiferling et al., 2016). Pro vyjasnění role ClpXP v mtUPR bude tedy pravděpodobně potřeba dalšího bádání.

Další dráhou, která je komplexem ClpXP přímo ovlivněna je samotná mitochondriální translace. ClpX totiž rozpoznává a vede k degradaci protein ERAL1, který slouží jako chaperon pro 28S podjednotku mitochondriálního ribozomu. ERAL1 ale váže 28S podjednotku s vysokou afinitou. Pokusy na ClpP KD myších ukázaly, že v nepřítomnosti ClpP je 28S vyvázána proteinem ERAL1. To snižuje množství plně sestavených a tedy funkčních ribozomů a tím i míru mitochondriální translace. Následně bylo i ukázáno, že pokud je ClpP KD buňkám současně experimentálně snížena exprese také ERAL1, navrátí se původní míra translace mitochondriálně kódovaných genů (Szczepanowska et al., 2016).

1.3.2 - Lidská peptidázová podjednotka ClpP

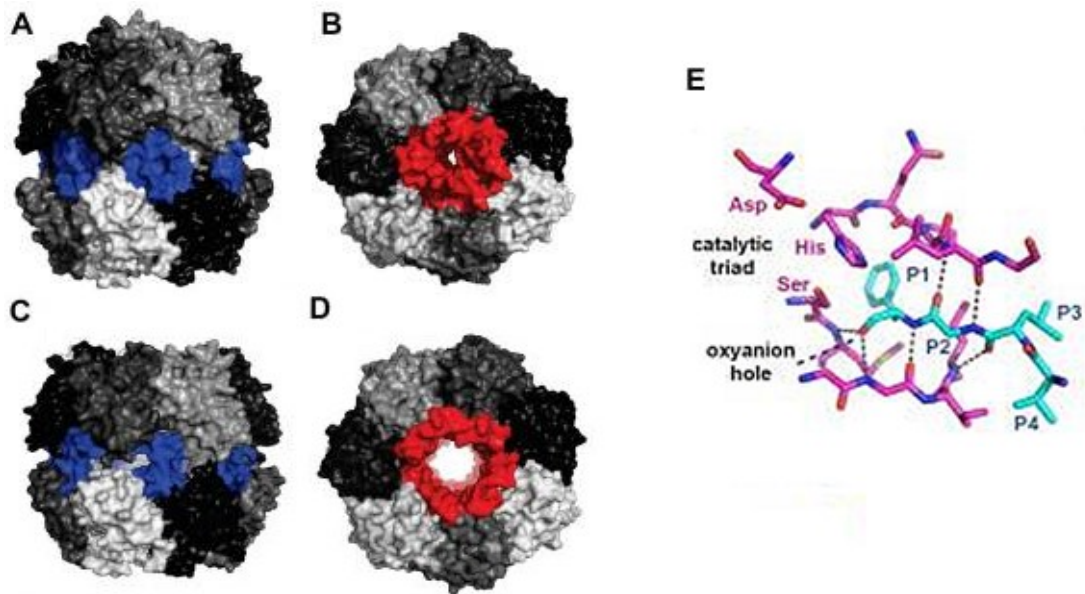
Gen pro lidskou ClpP se nachází na 19. chromosomu. Primární produkt translace má délku 277 AK a několik míst blízko N-konce, kde lze předpokládat štěpení v průběhu procesování proteinu při transportu do mitochondriální matrix (Bross et al., 1995).

ClpP je peptidázová podjednotka proteázy ClpXP. Pro svou proteolytickou funkci vyžaduje vazbu hexameru ClpX, v jeho nepřítomnosti nejsou schopny ClpP heptamery dimerizovat. Zároveň je konformace heptameru v nepřítomnosti ClpX taková, že kanál, ve kterém se nachází aktivní místo, je příliš úzký a peptidové vlákno do něj nemůže vstoupit, (viz obrázek 6A-6D).

Vlastní aktivní místo obsahuje, stejně jako většina ostatních serinových proteáz, kompletní katalytickou triádu obsahující Ser-97, His-122, a Asp-171 (viz obrázek 6E). Bylo dokázáno, že při nahrazení katalytického serinu 97 v pozici 153 alaninem nebo cysteinem ztratil komplex ClpP schopnost proteolýzy všech testovaných substrátů, což ukazuje, že v Ser-153 v lidském ClpP je opravdu homologem bakteriálního Ser-97 a je klíčovou aminokyselinou pro proteolytickou funkci ClpXP (Kang et al., 2002).

Na rozdíl od bakteriální ClpP, lidská ClpP je rezistentní vůči většině agens inhibujícím široké spektrum serinových proteáz, jako je například diizopropylfluorofosfát, benzylsulfonylfluorid, 4-(2-aminoethyl) benzensulfonylfluorid, (chlormethyl) (N-tosyl-L-fenylalanyl)keton, (chlormethyl)(N-tosyl-L-lysyl)keton, a 3,4-dichloroisokumarin. Tyto látky nebyly schopné inhibice proteolytické aktivity ClpP, ale zároveň u nich nebyla zaznamenána ani schopnost vazby na komplex ClpP. Jiný inhibitor, *N*-carbobenzoxy-Leu-Tyr chloromethylketon byl schopen se na ClpP navázat, ani zde ale nedošlo k inhibici komplexů ClpP ani ClpXP (Kang et al., 2002).

ClpXP funguje jako protein kontroly kvality, avšak stejně jako LONP má určitou specifitu. Specifity jednotlivých proteáz degradujících špatně sbalené proteiny v matrix se částečně překrývají. Jedním z proteinů, který může být degradován jak ClpP, tak LONP je MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase) (Hansen et al., 2005). Dále LONP a ClpP společně degradují periferální raménko komplexu I dýchacího řetězce za zvýšeného oxidativního stresu, čímž snižují produkci ROS v mitochondriích (Pryde et al., 2016).



Obrázek č. 6: Stavba tetradekameru ClpP

Na obrázcích A-D jsou modely bakteriálního homologu lidského peptidázové podjednotky ClpP. A-B zobrazuje stav, kdy na ClpP barel není navázáno ClpX ani částice, která by vazebný motiv ClpX imitovala. Na obrázcích C-D je zobrazen 14-ti podjednotkový komplex v případě, že je na něj navázána částice ADEP (acyldepsipeptide), která imituje ClpX vazebný motiv a vede ke konstitutivní a nespecifické proteolýze. Modely A a C zobrazují pohled ze strany, modely B a D pohled ze směru nasednutí ClpX prstence a tedy i vstupu peptidového vlákna substrátu. E znázorňuje schéma aktivního místa - katalytické triády a štěpeného substrátu (převzato z Baker and Sauer, 2012).

Narozdíl od LONP, lidský ClpP byl zatím prostudován poměrně málo (Matsushima and Kaguni, 2012). O jeho funkci můžeme zkusit usuzovat z funkcí již popsaných homologů ClpP v jiných eukaryotických organismech. U kvasinky *Podospora anserina* je lidská ClpP kompatibilní s kvasinkovou ClpX a funkce komplexu ClpXP je spojena s buněčným stárnutím

(Fischer et al., 2013). Zatím však není známo, jestli se podobný jev vyskytuje i u člověka. Vzhledem k evoluční vzdálenosti a tomu, že specifitu udává ClpX podjednotka, to není příliš pravděpodobné.

Člověku mnohem bližšími modelovými organismy, na nichž byla studována ClpP, je myš *Mus musculus*, stejně jako opičí COS-7 buňky (Gispert et al., 2013; Zhao et al., 2002). Na COS-7 buňkách bylo ukázáno, že ClpP je protein účastnící se stresových reakcí, například mtUPR (Zhao et al., 2002).

Další stresovou reakcí, kterou ClpXP kontroluje je oxidativní stres. Jedním ze způsobů, jak ClpP chrání buňku před oxidativním stresem je interakce mezi ClpP a SDH B (succinate dehydrogenase B subunit) podjednotkou komplexu II dýchacího řetězce. ClpP interaguje jak s SDH B, tak s antiapoptotickým proteinem ze skupiny IAP, survivinem, který pomáhá stabilizaci SDH B (Rivadeneira et al., 2015). ClpP i survivin současně interagují i s molekulárním chaperonem TRAP-1 (TNFR-associated protein-1), homologem mtHSP90, který je zodpovědný za správné sestavení terciární struktury SDH B. Umlčení ClpX nebo ClpP v buňce tak vede ke snížení efektivity buněčného dýchání a současně zvýšení oxidativního stresu v buňce (Seo et al., 2016).

Je známo, že v rakovinných buňkách probíhá rychlá evoluce způsobená silnou selekcí. Ochrana před oxidativním stresem, zvýšená efektivita metabolismu a vyšší odolnost vůči apoptóze jsou jedněmi z základních směrů, kterými se rakovinné buňky ubírají. Pravděpodobně právě proto byla u rakovinných buněk zaznamenána zvýšená exprese ClpP podjednotky ClpXP. Zvýšená exprese ClpP byla pozorována na většině vzorků rakovinných buněk s původem napříč celým organismem - prsu, tlustého střeva, plic, žaludku i mnohých dalších (Seo et al., 2016). Stejný trend byl pozorován i u AML (akutní myeloidní leukemie) (Cole et al., 2015). Naopak když byla v rakovinných buňkách exprese ClpP nebo ClpX experimentálně utlumena, došlo u většiny rakovinných buněk k zastavení buněčného cyklu, výraznému zpomalení bioenergetiky a ztrátě schopnosti metastázovat (Seo et al., 2016). U buněk AML způsobil KD ClpP zpomalení růstu a snížení jejich životnosti.

Při pokusech s KO ClpP u myši byl pozorován menší vzrůst, KO neměl dopad na jejich krevtvorbu, byly však pozorovány poruchy sluchu a plodnosti. Obdobně jako ClpP KD byl pro buňky AML toxický i (3RS,4RS)-3-(non-8-en-1-yl)-4-(2-(pyridin-3-yl)ethyl)oxetan-2-on, inhibitor enzymatické aktivity ClpP, a to jak pro myši buňky, tak pro lidské buňky xenotransplantované do myši (Cole et al., 2015). Tyto výsledky společně ukazují, že

specificky zacílená inhibice ClpP by v případě některých nádorových onemocnění, například u AML mohla sloužit jako nová forma terapie.

Jiné týmy sledovaly podobné dopady downregulace ClpP u myši. Ukazuje se, že nízká hladina ClpP vede k akumulaci ClpX a zánětlivých faktorů. Akumulace ClpX současně vede i ke zvýšenému poměru mitochondriální DNA. Právě tyto změny jsou u myši zodpovědné za patologické stavy, jako je neplodnost, ztráta sluchu a růstové poruchy (Gispert et al., 2013). V jiném experimentu bylo u ClpP KO myši, vedle výše zmíněných změn, zaznamenáno také snížení množství proteinů komplexu I dýchacího řetězce vedoucí k respiračním problémům (Szczepanowska et al., 2016).

Podobné problémy se vyskytují i u člověka s mutací v genu pro ClpP a jsou souhrnně označovány Perraultův syndrom (Jenkinson et al., 2013). Mutace ClpP je vedle mutací několika dalších mitochondriálních jaderně kódovaných genů jednou z příčin Perraultova syndromu. Dalšími mitochondriálními jaderně kódovanými geny, jejichž recesivní mutace může vést k Perraultovu syndromu, jsou TWNK, HARS2, LARS2 a HSD17B4 (Ołdak et al., 2017; Pierce et al., 2010, 2011; Soldà et al., 2016).

Perraultův syndrom se projevuje sensorineurální ztrátou sluchu a poruchami plodnosti, k čemuž mohou být přidruženy cerebelární ataxie, poruchy učení, periferní neuropatie nebo spastická paraplegie, v závislosti na konkrétní mutaci a dalších faktorech (Dursun et al., 2016; Gottschalk et al., 1996; Jenkinson et al., 2013). Zrovna spastická paraplegie je zajímavá ukázka důležitosti procesu kontroly kvality proteinu, kdy mutace dvou různých mitochondriálních ATP-dependentních proteáz s aktivitou v mitochondriální matrix vede ke stejnému fenotypu (Casari et al., 1998; Jenkinson et al., 2013).

Vzhledem k tomu, že u myšního modelu byla většina projevů KO ClpP shodná s lidským fenotypem Perraultova syndromu, mohla by právě ClpP KO myš být vhodným modelem pro další výzkum problematiky Perraultova syndromu (Gispert et al., 2013). V současnosti je známo několik různých mutací ClpP vedoucích k Perraultovu syndromu (Ahmed et al., 2015; Dursun et al., 2016; Jenkinson et al., 2013).

2. Cíle práce

- Shrnutí současných poznatků o lidských mitochondriálních proteázách s důrazem na podjednotky proteázy ClpXP
- Funkční charakterizace dopadu knockdownu ClpP a dopad jeho následné reintrodukce na úrovni buněčné biologie a biochemie
- Určení role ClpP v mitochondriální apoptotické dráze
- Transfekce buněk expresním plazmidem s ClpP-FLAG a ClpP^{S153A}-FLAG
- Izolace mitochondrií a následná kopurifikace ClpP-FLAG a ClpP^{S153A}-FLAG pro izolaci substrátových a jinak s ClpP interagujících proteinů

3. Materiál a metody

3.1 – Materiály

3.1.1. Zakoupené chemikálie a komerčně vyrobené směsi

- akrylamid, Sigma-Aldrich (USA)
- antibiotický a antimykotický roztok (100x koncentrovaný) Biosera (Francie)
- bisakrylamid, Sigma-Aldrich (USA)
- Bradfordové reagens, BioRad (USA)
- bromfenolová modř, Sigma-Aldrich (USA)
- Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma-Aldrich (USA)
- deoxycholát sodný, Sigma-Aldrich (USA)
- dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (USA)
- dodecylsírán sodný (SDS), Sigma-Aldrich (USA)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PAN Biotech (Německo)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Biochrom (Velká Británie)
- EndoFree® Plasmid Purification (velikost Maxi), QIAGEN (Německo)
 - obsahovalo pufrů: P1, P2, P3, ER, QBT, QC, QN
- ethanol (96%), Penta (ČR)
- fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), Sigma-Aldrich (USA)
- fetální bovinní sérum (FBS), Sigma-Aldrich (USA)
- Folin-Ciocalteau, Penta (ČR)
- fosfátový pufr (PBS) (koncentrovaný 10x), Lonza (Švýcarsko)
- glycerol (bezvodý), Penta (ČR)
- glycin, Sigma-Aldrich (USA)
- chlorid sodný, Sigma-Aldrich (USA)
- Hydroxid sodný (NaOH) Penta (ČR)
- hovězí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich (USA)
- interferon γ (INF- γ), Sigma-Aldrich (USA)
- isopropanol, Penta (ČR)
- koktejl inhibitorů proteáz (PIC), Sigma-Aldrich (USA)
- kvasinkový extrakt (Yeast extract bacteriological), Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina octová (99%), Penta (ČR)

- luminiscenční substrát SuperSignal WestFemto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoScientific (USA)
- luminiscenční substrát SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific (USA)
- luminiscenční substrát Western Bright Sirius, Advansta (USA)
- marker molekulových hmotností SeeBlue Plus2 Prestained Standard, Invitrogen (USA)
- methanol (99,8%), Penta (ČR)
- redukované sérové médium (Opti-MEM™), Life Technologies (USA)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Sigma-Aldrich (USA)
- persíran amonný (APS), Sigma-Aldrich (USA)
- primární protilátky (Abcam, Velká Británie; Cell Signaling, USA; MitoScience, Velká Británie) - α -tubulin, β -aktin, AFG3L2, ATP D, citrát syntáza, ClpP, ClpX, cl. PARP, COX 2, COX 4, COX 5a, eIF2- α , fosfo-p53, GAPDH, Grp 75, LONP, mitofusin 2, MRPS 31, mt-ND5, NDUF B4, NRF 1, OMA1, OSCP, p21, p53, Parkin, PHB 2, SDH A, SDH B, survivin, TFAM, TRAP 1, UQCRC1, UQCRC2, VDAC1, YME1L1
- puromycin, Sigma-Aldrich (USA)
- sacharóza, Penta (ČR)
- sekundární anti-rabbit protilátka, Sigma-Aldrich (USA)
- sekundární anti-mouse protilátka, Sigma-Aldrich (USA)
- síran měďnatý x 1 H₂O (CuSO₄ x 1 H₂O) Lachema (ČR)
- staurosporin, Sigma-Aldrich (USA)
- superdestilovaná voda Milli-Q, MilliPore (USA)
- transfekční kit Lipofectamine 3000, Invitrogen (USA)
 - obsahovalo reagenty Lipofectamine 3000 a P 3000
- tricín, Sigma-Aldrich (USA)
- tris, Sigma-Aldrich (USA)
- Triton X-100 Sigma-Aldrich (USA)
- Tropix I-Block, Applied Biosystems (USA)
- trypsin, Sigma-Aldrich (USA)
- trypton, Sigma-Aldrich (USA)
- Tumor Necrosis Factor - α lidský (TNF- α), Sigma-Aldrich (USA)
- Tween 20, Sigma-Aldrich (USA)

- Uhličitan sodný ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$), Lach-Ner (ČR)
- Vinan sodno-draselný ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$) Lachema (ČR)
- Whatman® filtrační papír, Whatman (Německo)
- β -merkaptoethanol, Sigma-Aldrich (USA)

3.1.2. Roztoky připravené v laboratoři

- 30,8% akrylamid/bisakrylamid – 30% (v/v) akrylamid; 0,8% (v/v) bisakrylamid
- anodový pufr (SDS-PAGE) – 100mM Tris-HCl, pH 8,9
- barvicí roztok na gely – 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) octová kyselina
- gelový pufr na SDS (koncentrovaný 3x) – 3 M Tris-Cl, pH 8,45; 0,3 % (w/v) SDS
- katodový pufr (SDS-PAGE) – 100 mM Tris-Cl, pH 8,9; 100mM tricin; 0,1% (w/v) SDS
- LB roztok média s nižším obsahem soli (LB-LS) – 1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt; 0,5% (w/v) NaCl
- Lowry roztok A – 0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na_2CO_3
- Lowry roztok B – 0,5% (w/v) CuSO_4
- Lowry roztok C – 1% (w/v) vinan sodno-draselný 1%
- odbarvovací roztok – 25% (v/v) methanol; 10% (v/v) octová kyselina
- RIPA pufr – 50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 1% (w/v) Triton X-100; 1% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) PIC
- STE izolační roztok – 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 250 mM sacharóza; 1 mM EDTA; 1% (v/v) PIC
- TBS pufr (koncentrovaný 10x) – 20mM Tris-Cl; 130mM NaCl; pH 7,6
- transferový pufr pro PVDF membrány – 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10% (v/v) methanol; 0,02% (w/v) SDS
- vzorkový pufr (SDS-PAGE) (koncentrovaný 4x) – 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 12% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) bromfenolová modř; 2% β -merkapto-ethanol (přidat před použitím)

3.1.3 - *Biologický materiál*

HEK 293 buňky

- čistý HEK 293, A.A.T.C, Manassas (USA)
- HEK 293 v laboratoři transfekované umlčujícími shRNA (pGIPZ shRNA mir konstrukt cílící jednotlivé proteázy, viz níže) a jejich kontroly (pGIPZ mir konstrukt - zkrácený). shRNA byly získány od Open Biosystems, Dharmacon (USA)

- ClpP KD a kontrola
- ClpX KD a kontrola
- AFG3L2 KD a kontrola

E. coli s expresním plasmidem

- ClpP^{WT} - C-fúzní Myc-FLAG-tagged ORFexpresní konstrukt pCMV6-CLPP obsahující lidskou CLPP cDNA ORF sekvenci (GenBank[®])
- ClpP^{S153A} - C-fúzní Myc-FLAG-tagged ORFexpresní konstrukt pCMV6-CLPP obsahující lidskou CLPP cDNA ORF sekvenci (GenBank[®]) se zavedenou mutací 457A>G

3.1.4 - *Přístroje*

- GBOX imaging system, Syngene (Indie)
- „vortex“ Gilson GVLab Vortex Mixer, Gilson (Česká republika)
- analytické váhy KERN (Česká republika)
- aparatura na vertikální elektroforézu MiniPROTEAN 3 Cell, Bio-Rad (USA)
- automatické pipety Eppendorf (Německo); Gilson (USA);
- automatický autokláv MAC-235EX, Schoeller (Česká republika)
- blotovací aparatura Fastblot B64, Biometra (Německo)
- centrifugy Biofuge 28RS, Heraeus (Německo); Mikro 200, Hettich Zentrifugen (Německo); Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen (Německo); UNIVERSAL 16R, Hettich Zentrifugen (Německo); UNIVERSAL 32R, Hettich Zentrifugen (Německo)
- elektroforetické zdroje PowerPac 1000, PowerPac Basic, PowerPac HC, Bio-Rad (USA)
- chladicí a mrazicí boxy Liebherr (Švýcarsko); Sanyo (Japonsko); Zanussi (Itálie)
- inkubátor MCO-18 AIC, Sanyo (Japonsko)
- kryokontejner Thermolyne Liquid Nitrogen Cryo Storage Tank s monitorem tekutého dusíku, Thermo Scientific (USA)
- laminární box Clean Air, Schoeller (Česká republika)
- ledovač, Brema Ice Makers (Itálie)

- magnetické míchadlo AREX, P-Lab (ČR)
- mikroskop DIAPHOT 200, NIKON (Japonsko)
- pH-metr 913, Metrohm (Švýcarsko)
- Dounceho sklo-sklo homogenizátor, Bellco, (USA)
- rotátor (rotating mixer), Torrey pines scientific, INC (USA)
- Scepter Handheld Automated Cell Counter, Millipore (USA)
- spektrofotometr NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop Technologies (USA) Scepter Handheld Automated Cell Counter, Millipore (USA)
- spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu (Japonsko)
- sušička gelů GD 4534, Biometra (Německo)
- termostat AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet (USA)
- třepačka Polymax 1040, Heidolph (Německo)
- ultrasonikační homogenizér 4710, Cole-Parmer instrument (USA)

Pro experimenty jsem používal laboratorní sklo (Simax, sklárny Kavalier, ČR), plastové kyvety (BRAND GmbH, Německo) a plast (Axygen, USA; Eppendorf, Německo; Gilson, USA; TPP, Švýcarsko; Verkon, ČR; Schoeller, ČR).

3.2 - Metody

3.2.1 - Kultivace *E. coli*

250 ml autoklávovaného 1x LB média jsem ošetřil přidáním selekčního antibiotika kanamycinu (30 µg/ml) a přelil do autoklávované 500ml Erlenmeyerovy baňky. Následně jsem do média přidal 100 µl buněčné suspenze *E. coli* obsahující plasmid našeho zájmu. Baňku jsem nechal třepat 15 hodin ve 37°C, 220 RPM.

3.2.2 - Izolace a purifikace plazmidů pro transfekci buněk

Využíval jsem EndoFree Plasmid Maxi Kit od německé firmy Quiagen. Postupoval jsem podle příručky od výrobce EndoFree® Plasmid Purification Handbook.

Průběh experimentu jsem sledoval pomocí změn barvy a konzistence přidané reagensie LyseBlue (Quiagen, Německo) do pufru P1 (Quiagen, Německo).

Abych buňky sklídl, centrifugoval jsem je 15 minut při 4°C a 5525 RCF. Peletu jsem následně resuspendoval v 10 ml pufru P1. Poté jsem buňky lyzoval přidáním 10 ml lyzačního pufru P2 (Quiagen, Německo). Po šetrném promíchání jsem nechal pufr působit 5 minut. Následně jsem přidal 10 ml precipitačního pufru P3 (Quiagen, Německo), několikrát otočil falkonku a nalil směs do QIAfilter cartridge (Quiagen, Německo). Po 10-ti minutách inkubace jsem odšrouboval spodek cartridge, nasadil píst a pomocí něj přefiltroval vzorek pro odstranění sraženiny. Ke směsi jsem přidal 2,5 ml ER pufru (Quiagen, Německo) pro odstranění endotoxinů. Následně jsem inkuboval směs na ledu 30 minut. V mezičase jsem připravil QUIAGEN-tip a promyl jí pomocí 10 ml QBT pufru (Quiagen, Německo). Po inkubaci na ledu jsem vzorek nalil do QUIAGEN-tip a nechal působit gravitační tok. Po vyprázdnění QUIAGEN-tip jsem QUIAGEN-tip ještě 2x promyl 30 ml QC pufru (Quiagen, Německo). Poté jsem eluoval DNA do sterilní falkonky pomocí 15 ml QC pufru (Quiagen, Německo). Plasmidy jsem následně precipitoval přidáním 10,5 ml isopropanolu a směs jsem centrifugoval 30 minut při 15 000 g a 4°C. Po vylití supernatantu jsem peletu opláchl pomocí 70% ethanolu a centrifugoval 10 minut při 15 000 g a 4°C. Opět jsem slil supernatant a peletu jsem nechal sušit 10 minut v RT. Poté jsem DNA rozpustil ve 100 µl MilliQ H₂O, přenesl do 200µl ependorfky a dále skladoval v -20 °C.

3.2.3 - Měření koncentrace DNA

Koncentraci DNA obou vzorků jsem měřil na přístroji NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Jako kontrolní vzorek byla použita čistá MilliQ H₂O.

3.2.4. Kultivace buněčné linie HEK 293

Pokusy jsem prováděl na buňkách odvozených od buněčné linie HEK 293. Tato linie je odvozená od lidských ledvinných embryonálních buněk. Buňky jsem pěstoval v suplementovaném médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, PAN Biotech; Německo). Médium bylo připraveno tak, že do 500 ml média jsem přidal 50 ml iFBS (Sigma-Aldrich; USA) a 5 ml antibiotického a antimykotického roztoku (koncentrovaný 100x; PAA, Rakousko).

Do dvou láhví T75 jsem nalil po 25 ml takového média a dal láhve temperovat a saturovat CO₂ do inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Do těchto lahví jsem po saturaci přidal po 900 µl rozmražené buněčné suspenze a nechal 8 hodin v inkubátoru, aby buňky dosedly na dno. Poté jsem buňkám odsál médium, opláchl je sterilním PBS a přidal nové médium. Médium jsem měnil ob den. Když měli buňky konfluenci nad 90%, provedl jsem pásážování.

Buňkám jsem odsál médium, opláchl je RT PBS a přidal 1,5 ml 1x TE (trypsin-EDTA)/láhev vytemperované na 37 °C. S lahví jsem opatrně klepal, abych urychlil uvolnění buněk, které jsem průběžně kontroloval pod mikroskopem. Když se buňky uvolnily, zastavil jsem trypsinizaci přidáním 10 ml média. Buňky jsem pipetou resuspendoval a suspenzi buněk jsem následně rovnoměrně rozpipetoval do nových láhví T75, doplnil vytemperovaným suplementovaným médiem do 25 ml a láhve opět umístil do inkubátoru. Pokud není uvedeno jinak, bylo do média od první pasáže přidáváno selekční antibiotikum puromycin (10 µg/ml).

Při sklizení buněk jsem odsál médium, buňky opláchl RT PBS a následně sklízel pomocí 10 ml ledového PBS/láhev. Opět jsem uvolnění buněk podpořil opatrným klepáním a po jejich uvolnění jsem případné zbylé buňky ze dna uvolnil cell-scrapere (Sigma-Aldrich, USA). Buňky jsem pipetou resuspendoval a následně přenesl do 16ml falkonky. Každou láhev opláchl ještě 2 ml PBS a přidal ke zbytku suspenze. Suspenzi jsem centrifugoval na centrifuze UNIVERSAL 32R (Hettich Zentrifugen, Německo) 7 min při 1900 g a 6°C. Poté jsem slil supernatant, buňky resuspendoval v 5 ml ledového PBS a centrifugaci opakovl. Opět jsem slil supernatant a buňky jsem uložil do -80°C

3.2.5. Opětovné zamražení buněk

Od každé buněčné linie jsem zamrazil část buněk pro případnou revitalizaci. Buňky jsem opláchl PBS a následně trypsinizoval 1,5 ml 1x TE/láhev. Po uvolnění buněk jsem trypsinizaci zastavil přidáním 10 ml suplementovaného média bez puromycinu a následně buněčnou suspenzi centrifugoval 7 minut v RT a 1900g na UNIVERSAL 32R (Hettich Zentrifugen, Německo). Buněčnou peletu jsem resuspendoval ve 3600 μ l 10% v/v dimethylsulfoxidu (DMSO) v suplementovaném médiu bez puromycinu a následně po 1800 μ l přenesl do dvou kryotub. Ty byly následně uloženy v -80°C a po 24 hodinách přesunuty do dusíkového kryokontejneru ThermoLyne Liquid Nitrogen Cryo Storage Tank s monitorem tekutého dusíku (Thermo Scientific, USA) (-196°C).

3.2.6. Stanovení růstové křivky

Buňky jsem rozpěstoval v suplementovaném médiu s puromycinem (10 $\mu\text{g/ml}$). Pro určení růstové křivky jsem používal 6-ti jamkovou destičku. Do osmi jamek/linie jsem napipetoval 2 ml suplementovaného média s puromycinem, nechal médium vytemperovat na 37°C a nasytit 5% CO_2 . Buňky byly sklizeny pomocí 1x TE, trypsinizace zastavena 5-ti ml suplementovaného média a pomocí počítací pipety *Scepter Handheld Automated Cell Counter* (MilliPore, USA) a počítací komůrky byla určena jejich hustota. Následně jsem přenesl od každé linie do osmi jamek 50 000 buněk. Buňky byly inkubovány v inkubátoru a každých 24 hodin byla sklízena jedna jamka od každé linie. Buňky v jamce jsem 2x opláchl RT PBS a následně trypsinizoval 200 μ l 1x TE. Trypsinizaci jsem zastavil přidáním 9,8 ml suplementovaného média a následně pomocí 3 měření počítací pipetou a jednoho měření v počítací komůrce stanovil koncentraci buněk. Poté jsem každých 24 hodin celý proces opakoval s tím, že 3., 5. a 7. den jsem buňkám vyměnil médium.

3.2.7. Indukce apoptózy

V buněčných liniích jsem indukoval vnitřní apoptotickou dráhu pomocí staurosporinu a vnější pomocí TNF- α (tumor necrosis factor) a INF- γ (interferon) a vnější apoptotickou dráhu pomocí staurosporinu. Od každé linie jsem si připravil deset lahví s konfluencí přibližně 90%. Buňky byly pěstovány v suplementovaném médiu s puromycinem. Pro indukci apoptózy staurosporinem jsem si připravil médium s 2 μM staurosporinem. Do 20 ml přefiltrovaného suplementovaného média jsem přidal 30 μ l staurosporinu (Sigma-Aldrich; USA). Obdobně jsem připravil i médium s TNF- α (Sigma-Aldrich; USA) (1/1 000 000) a INF γ (Sigma-

Aldrich; USA) (1/1 250 000). Následně jsem čtyřem lahvím od každé linie vyměnil médium za 20 ml média se staurosporinem, dalším čtyřem jsem vyměnil médium za 20 ml média s TNF- α a INF- γ , a dvě láhve/linie sklídil jako vzorky z jednotlivých indukcí v čase 0h. Buňky byly ponechány v inkubátoru ve 37°C a 5% CO₂. Po 3, 6-ti, 9-ti a 12-ti hodinách od začátku indukce jsem ledovým PBS sklízel po jedné láhvi každé indukované linie.

3.2.8. Transientní transfekce buněk expresním plazmidem

Od každé linie jsem si připravil 20 láhví s konfluencí přibližně 90%. Následně jsem si připravil reakční směs transfekčního kitu Lipofectamine 3000 (Invitrogen, USA). Rozpustil jsem 32 μ l lipofectaminu 3000 (Invitrogen, USA) v 1 ml Opti-Mem média/láhev. Následně jsem rozpustil 20 μ g plazmidové DNA a 40 μ l reagentie P 3000 (Invitrogen, USA) také v 1 ml média/láhev tak, že polovina směsí obsahovala plasmidovou DNA s ClpP^{WT} a druhá polovina s ClpP^{S153A}. Obě směsi jsem smíchal a nechal 15 minut v RT. Poté jsem výslednou směs dolil 5,9 ml Opti-Mem a opět nechal 15 minut v RT. Buňky jsem opláchl RT PBS, přilil jim připravených 8 ml směsi a nechal reakci probíhat 8 hodin v inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Připravil jsem si médium. Do 500 ml DMEM (PAN Biotech, Německo) jsem přidal 100 ml inaktivovaného FBS (Sigma-Aldrich, USA) a 6 ml 100x koncentrovaného antibiotického a antimykotického roztoku (Biosera, Francie). Takto obohaceného média jsem po 8-mi hodinách inkubace přidal ke každé láhvi 12 ml a buňky nechal růst dalších 36 hodin v inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Poté jsem buňky sklídil ledovým PBS.

3.2.9. Izolace mitochondrií

Celou izolaci jsem prováděl na ledu. Sklizené buňky jsem rozmrazil a resuspendoval v ekvivalentním množství STE roztoku. Následně jsem suspenzi homogenizoval v Dounceho sklo-sklo homogenizátoru 3 minuty/homogenizace jednoho obsahu homogenizátoru. Homogenát jsem centrifugoval v centrifuze Biofuge 28RS (Heraeus, Německo), předchlazené na 4°C, 15 minut při 600 g. Odebral jsem supernatant a ten jsem opět centrifugoval, tentokrát 25 minut při 10 000 g a opět 4°C. Následně jsem mitochondriální peletu resuspendoval v malém množství STE roztoku tak, aby dosáhla optické homogenity. Poté jsem změřil její koncentraci proteinu a vzorky opět zamrazil do -80°C (Sanyo, Japonsko).

3.2.10. Měření koncentrace proteinu Bradfordově metodou

Měření koncentrace proteinu probíhalo ve třech opakováních metodou Bradfordové. Každý vzorek jsem zvortexoval a přidal od něj 1 μl do 799 μl destilované H_2O . Pro srovnávací “prázdný“ vzorek jsem přidal 1 μl H_2O do 799 μl H_2O . Vzorky jsem zvortexoval, přidal k nim 200 μl Bradfordova činidla a nechal 10 minut inkubovat v RT. Poté jsem změřil jejich koncentraci proteinu na spektrofotometru UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko).

3.2.11. Měření koncentrace proteinu Lowryho metodou

Lowryho metodu jsem používal pro určení koncentrace proteinu vzorků určených k imunoprecipitaci. Všechny vzorky (kalibrační i měřené) jsem si připravil a následně měřil ve dvou opakováních. Vzorky kalibrační křivky podle jsem připravil tabulky č. 1.

Tabulka č. 1. Míchání standardů

číslo vzorku:	$\text{H}_2\text{O}/\mu\text{l}$	BSA/ μl	koncentrace BSA /($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Blank	200	-	-
1.	175	25	5
2.	150	50	10
3.	125	75	15
4.	100	100	20
5.	75	125	20

Z měřených vzorků jsem si odebral 3 μl a 10x je zředil dH_2O , poté jsem ze zředěné směsi odebral 5 a 7 μl do nových 1,5ml ependorfek (opět ve dvou opakováních), doplnil vodou do 200 μl a zvortexoval. Připravil jsem si roztok MIX s výslednými koncentracemi: roztok C (2%), roztok B (2%) a roztok A (96%). Prvně jsem smíchal B a C a teprve následně přidal roztok A. Z roztoku MIX jsem přidal 1 ml ke všem vzorkům a nechal 15 minut stát v RT. Folinovo reagens jsem čerstvě zředil dH_2O v poměru 1:1 a poté přidal 100 μl ke každému vzorku. Směs jsem nechal 30 minut odstát v RT. Poté jsem zkalibroval spektrofotometr UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko) a následně na něm změřil koncentraci měřených vzorků. Měření jsem prováděl ve vlnové délce 700 nm. Výsledné hodnoty jsem následně přepočítal na původní koncentraci a všechny 4 měření na vzorek zprůměroval.

3.2.12. Příprava vzorku na SDS-PAGE

Vzorek jsem rozmrazil na ledu a přidal k němu pufr RIPA v poměru 1:1 k objemu sklizených buněk. Vzorek jsem po dobu 20-ti minut každých 5 minut vortexoval. Poté jsem

vzorek centrifugoval na centrifuze Biofuge 28RS (Heraeus, Německo) 20000 g při 4 °C po dobu 10 min. Odebral jsem supernatant a změřil koncentraci proteinu metodou Bradfordové. Připravil jsem si 4x SB s čerstvě přidaným merkaptoethanolem (8%). Tuto směs jsem přidal k vzorku v objemu trojnásobném oproti objemu vzorku. Následně jsem vzorky nechal 30 minut temperovat v 37°C a poté je uložil do -20°C.

3.2.13. SDS-PAGE elektroforéza

Očištěná skříčka jsem umístil do stojanu. Na ledu jsem si namíchal směs na gel podle tabulky č. 2. APS a TEMED jsem přidával těsně před nalitím gelu. Nejprve jsem nalil separační gel, převrstvil jej vodou a nechal hodinu tuhnout. Poté jsem vodu slil, nalil čerstvě připravený zaostřovací gel, vložil hřebínek a nechal gel tuhnout 30 minut. Skříčka s gely jsem umístil do elektroforetické aparatury, vyndal hřebínky, naložoval vzorky a nalil katodový a anodový pufr. 30 minut jsem nechal běžet elektroforézu při 40 V, poté jsem zvýšil napětí na 100 V.

Tabulkač. 2. Příprava gelů pro SDS-PAGE

	zaostřovací gel 4%	separační gel 12%
Acrylamide 30,8%	1,3 ml	3,9 ml
3x GB	3,33 ml	3,33 ml
dH ₂ O	5,27 ml	2,7 ml
APS 10%	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
celk. objem	10 ml	10 ml

3.2.14. Western blot a imunodetekce

Gely z elektroforézy jsem změřil a přemístil do transferového pufru na 30 minut. Mezitím jsem si připravil ke každému gelu PVDF membránu a 6 filtračních papírů Whatman® (Whatman, Německo) v rozměru gelu. Membránu jsem aktivoval 30 sekund v methanolu, poté opláchl vodou a přenesl do transferového pufru. Po uplynutí 30 minut jsem připravil sloupeček 3 Whatmanů a membrány do Fastblotu B64 (Biometra, Německo). Na ně jsem umístil odpovídající gel a opět 3 Whatmany. Všechny Whatmany byly navlhčené v transferovém pufru, stejně jako deska Fastblotu, aby byly zajištěny polosuché (semi-dry) podmínky. Nasadil jsem víko a spustil přístroj na konstantní proud o velikosti určené podle vzorce (plocha membrán/cm²) x 0,65 mA na 1 hodinu. Poté jsem přístroj rozebral a membrány dal na 8 hodin sušit do papírové krabičky. Po usušení jsem membrány aktivoval 2x 5 minut v methanolu. Methanol jsem slil a membrány opláchl 2x 10 minut v 1xTBS. Poté jsem membránu blokoval 2 hodiny v 0,2% roztoku i-Block™

Tropix (Invitrogen, USA) v TBS. Membrány jsem opláchl v TBS 2x10 minut a následně inkuboval v roztoku primární protilátky v 0,2% roztoku i-Blocku v 1x TBS s 0,1% Tween. Koncentrace protilátky v roztoku se v závislosti na protilátce pohybovala mezi 1:1000 a 1:10000. Inkubace v primární protilátce probíhala 2-3 hodiny v RT nebo přes noc v 4°C. Po uběhnutí doby jsem membrány 4x opláchl 1xTBS s 0,1% Tween v intervalech 1,5,10 a 15 minut. Poté jsem membrány inkuboval hodinu v roztoku sekundární protilátky v 1x TBS s 0,1% Tween. Anti-rabbit protilátky jsem ředil na koncentraci 1:2500, anti-mouse jsem ředil 1:4000. Opět jsem membrány 4x opláchl 1xTBS s 0,1% Tween v intervalech 1,5,10 a 15 minut a následně je ještě 2x opláchl 1xTBS po deseti minutách. Nakonec jsem membrány vyvíjel v luminiscenčním substrátu SuperSignal WestFemto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoScientific (USA), SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific (USA), nebo Western Bright Sirius, Advansta (USA). Následně jsem signál vyhodnotil na přístroji GBOX imaging system, (Syngene, Indie).

3.2.15. Barvení gelů

Jako jednu z kontrol správného loadování jsem gely po Western-Blotu barvil alespoň 3 hodiny v barvicím roztoku s Coomassie Brilliant Blue. Následně jsem je opláchl dH₂O a odbarvoval další alespoň 3 hodiny v odbarvovacím roztoku. Gely jsem pak přenesl na filtrační papír Whatman® (Whatman, Německo) a usušil v sušičce gelů (Biometra, Německo).

3.2.16. Koimunoprecipitace

Pro imunoprecipitaci jsem použil mitochondrie izolované z buněk po proběhnutí transienční transfekce plasmidem kódujícím ClpP^{WT} nebo ClpP^{S153A} (ClpP s mutací v aktivním místě) s navázaným oligopeptidem FLAG. Objem mitochondrií, obsahující 1 mg mitochondriálních proteinů, jsem lyzoval pomocí 1 ml lyzačního roztoku (2% PIC, 0,5% Triton X-100, v 1xTBS). Směs jsem vortexoval každé 4 minuty po dobu 20ti minut.

Mezitím jsem si připravil anti-FLAG M2-afinity kuličky (Sigma-Aldrich, USA), které jsem rozmrazil, odebral 5% μ l/vzorek, centrifugoval na UNIVERSAL 32R (Hettich Zentrifugen, Německo) 8200 g, 30 sekund. Pipetou jsem odsál supernatant, přidal jsem 500 μ l 1x TBS, zvortexoval a opět centrifugoval 8200 g, 30 sekund. Tento proces oplachování jsem opakoval dohromady 3x.

Mitochondriální lyzát jsem centrifugoval na UNIVERSAL 32R (Hettich Zentrifugen, Německo) při 10 000 g, 10 minut. Poté jsem odebral supernatant a přepipetoval ho k anti-

FLAG M2 kuličkám. Suspenzi jsem dal do rotátoru (Torrey pines scientific, USA) a nechal probíhat reakci 3,5 hodiny při 4°C. Poté jsem směs centrifugoval 8200 g, 30 sekund a odebral supernatant (frakce Flow Through). 5x jsem kuličky opláchl v 1x TBS s 2% PIC a opět centrifugoval. Přidal jsem 100 µl 3x FLAG peptidu (Sigma-Aldrich, USA) a 30 minut nechal eluovat v rotátoru při 4°C. Poté jsem směs opět centrifugoval při 8200g, 30 sekund. Odebral jsem supernatant (koimunoprecipitát) a jak ten, tak frakci Flow Through jsem doplnil trojnásobným objemem 4x SB s 8% merkaptoethanolu a nechal inkubovat 30 minut ve 37°C. Poté jsem oba vzorky uložil do -20 °C.

3.2.17. Měření aktivit jednotlivých komplexů dýchacího řetězce

U mnou vyizolovaných mitochondriích byly spektrofotometricky měřeny aktivity jednotlivých komplexů dýchacího řetězce spektrofotometrem UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko).

4. Výsledky

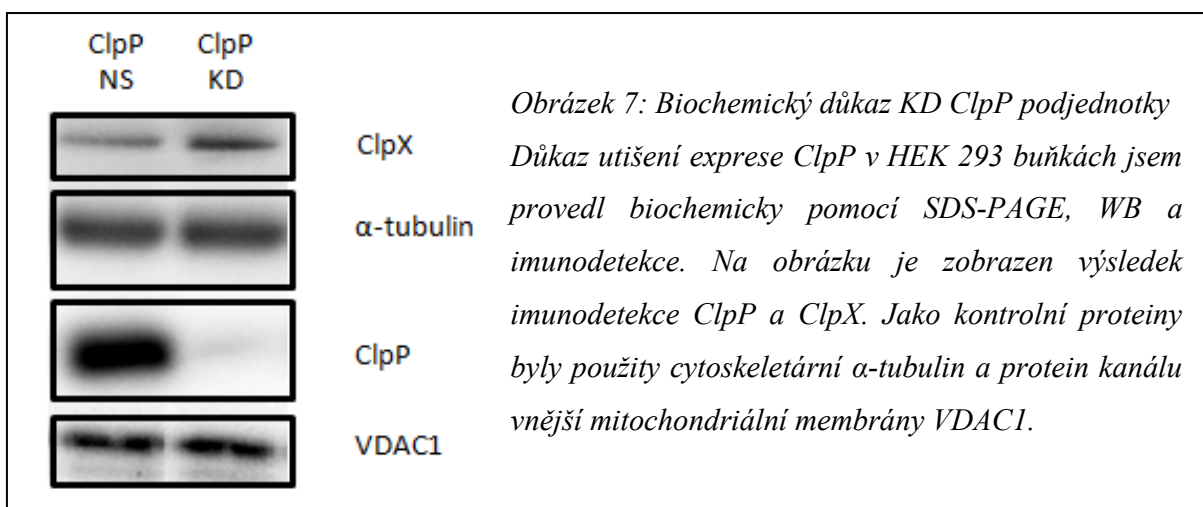
Mitochondriální proteázy mají důležité role v mnoha buněčných dějích, od regulace buněčného cyklu, přes odpověď na buněčný stres a apoptózu až po regulace metabolismu. Tyto role jsou dány jak jejich proteolytickou funkcí, tak schopností působit jako adaptorové proteiny pro další mitochondriální složky. V této práci jsem provedl buněčně biologickou a biochemickou analýzu linie, která má ClpP podjednotku ClpXP proteázy utlumenou prostřednictvím shRNA interference. Na této a kontrolní linii jsem sledoval růstovou rychlost, změnu exprese některých proteinů různých mitochondriálních drah.

Následně jsem provedl reintrodukcii ClpP v buňkách pomocí transfekce expresním plasmidem nesoucím ClpP a ClpP s mutací v aktivním místě A457G. Na těchto liniích jsem opět provedl biochemické srovnání míry exprese vybraných proteinů. Dále jsem se pomocí imunoprecipitace pokusil objevit interakční partnery ClpP a substráty ClpXP proteázy.

Poté jsem se vedle downregulace ClpP pokusil dosáhnout také overexprese tím, že jsem “čisté“ HEK 293 buňky transfekoval opět stejnými plasmidy. Na všech těchto liniích poté byla měřena aktivita jednotlivých komplexů dýchacího řetězce.

4.1 – ClpX a ClpP v ClpP KD buňkách

Jako první jsem provedl biochemický důkaz knockdownu. Napěstoval jsem si buňky linie s KD vlastní ClpP podjednotky (dále ClpP KD) a k nim kontrolní linii, sklídl je, připravil z nich vzorky pro SDS-PAGE. Poté jsem provedl western-blot a imunodetekci pomocí protilátek. Jako loadovací kontroly jsem použil cytoskeletární protein α -tubulin a protein mitochondriálního kanálu VDAC1 (Voltage-dependent anion-selective channel 1). Současně s hladinou ClpP mě zajímala i hladina druhé podjednotky, ClpX. Výsledky jsou znázorněny na obrázku č.7.

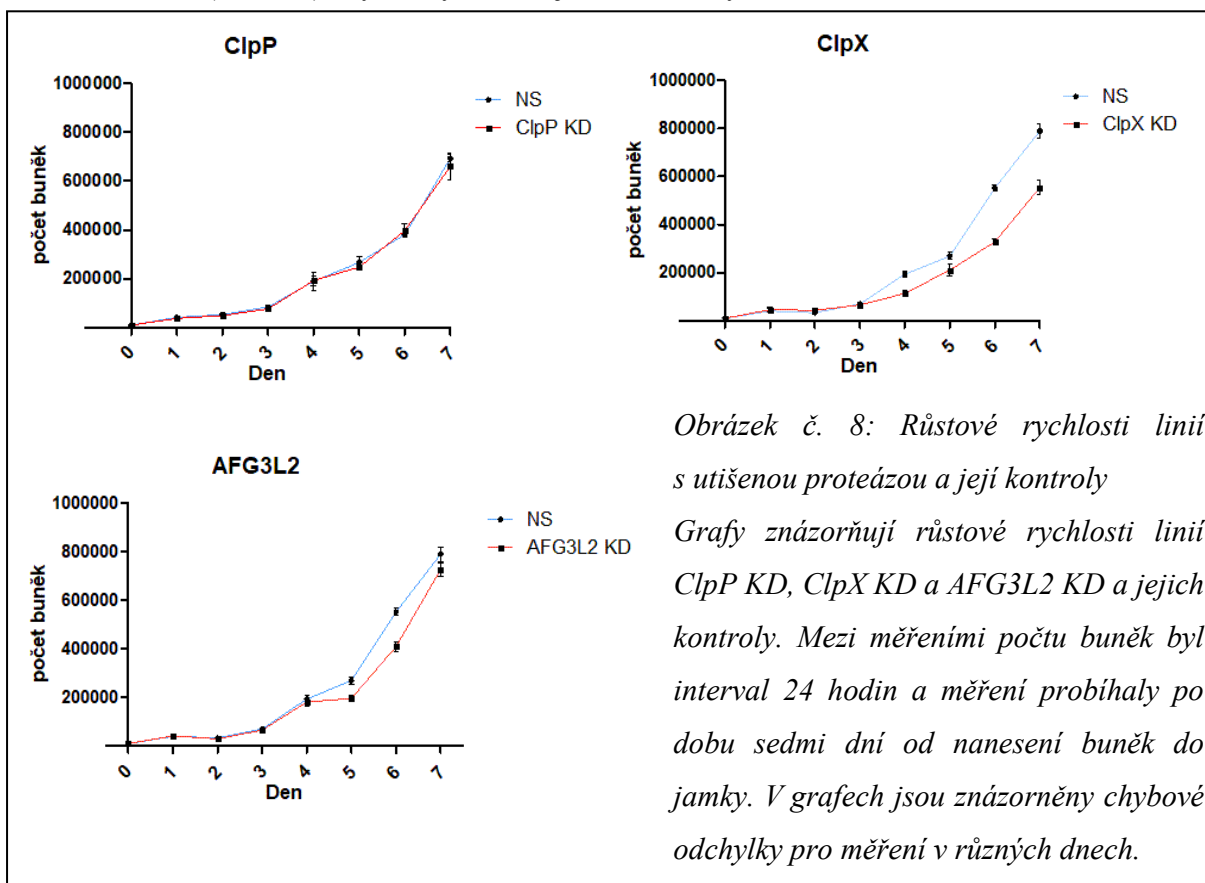


Z obrázku je patrné, že v buňkách ClpP KD je exprese ClpP výrazně utlumena proti kontrolní linii. Současně se ukazuje, že ClpX má v případě absence ClpP zvýšenou hladinu v buňce. Lze předpokládat, že jde o snahu buňky potlačit dopad KD a tedy i snížení množství funkčních komplexů ClpXP. Při zvýšené hladině ClpX bude k rozpoznání substrátu docházet častěji a zbývající ClpP komplexy budou tak častěji využívány - dojde tedy k zachování větší části ClpXP aktivity, než by odpovídalo míře snížení ClpP.

4.2 – Růstové křivky

Pro obecnou charakterizaci dopadu ClpP knockdownu na buňky jsem se rozhodl změřit jejich růstovou rychlost. Pro srovnání jsem vedle růstové rychlosti linie s KD vlastní ClpP podjednotky (dále ClpP KD) změřil také růstovou rychlost linie s KD rozpoznávací podjednotky ClpX (dále ClpX KD) a linie s KD jiné mitochondriální proteázy, AFG3L2, která má proteolytickou doménu také otočenou do mitochondriální matrix (dále AFG3L2 KD).

Rozpěstoval jsem zamražené linie HEK 293 buněk s expresí jednotlivých proteáz utišenou pomocí shRNA. V každé linii bylo 5 různých utišujících shRNA konstruktů pro omezení vlivu off-targetingu. Současně každá linie měla vlastní kontrolní linii trasfekovanou zkráceným pGIPZ mir konstruktem (dále NS). Výsledky měření jsou zobrazeny na obrázku č. 8.

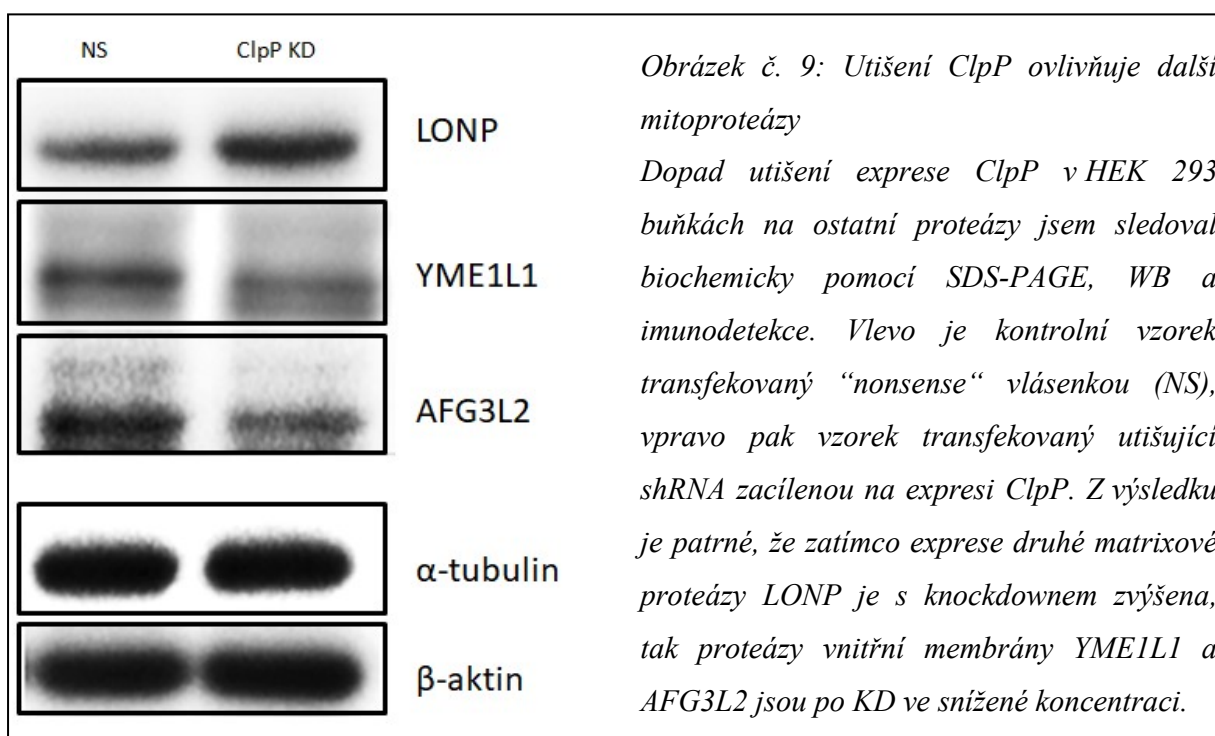


Na růstových rychlostech je patrná výrazná změna u ClpX KD, oproti tomu u ClpP KD a AFG3L2 KD není rozdíl v růstových rychlostech příliš signifikantní. Zároveň hlavní rozdíl u ClpX KD působí jako neschopnost rychle reagovat na výměnu média 3. a 5. den zvýšením růstové rychlosti.

Důvodem pro to, že ClpX KD má na buňky větší dopad než ClpP KD by mohlo být právě to, že ClpP KD je spojený se zvýšením exprese ClpX, zatímco ClpX KD se zvýšením míry ClpP spojený není (nepublikované výsledky laboratoře). Jak již bylo zmíněno, dnešní lidská ClpP není schopna v nepřítomnosti ClpX oligomerizovat a tedy by neměla mít proteolytickou aktivitu (Kang et al., 2002). Je ale možné, že u některého z předků dnešního člověka byla proteolytická aktivita ClpP heptameru nezávislá na ClpX a zvýšení hladiny ClpP podjednotky proteázy by tak mohlo vést k poškození buňky její nespecifickou proteolytickou aktivitou. Šlo by tedy o evoluční pozůstalost. I proto mě dále zajímalo, jak reaguje ClpX na reintrodukcii ClpP v buňce.

4.3 – Vliv umlčení ClpP na HEK 293 buňky na některé proteiny

V další řadě jsem sledoval rozdíly exprese vybraných proteinů u ClpP KD a NS linie pomocí SDS-PAGE, western-blotu a imunodetekce. Všechna měření jsem prováděl v dubletech a alespoň ve dvou opakováních. Jako kontroly přesnosti nanášení jsem použil cytoskeletární proteiny α -tubulin a β -aktin. Sledované proteiny jsem následně rozdělil do čtyř skupin podle hlavní funkce. První sledovanou skupinou byly další mitochondriální proteázy - AFG3L2, LONP a YME1L1 (viz obrázek č. 9).

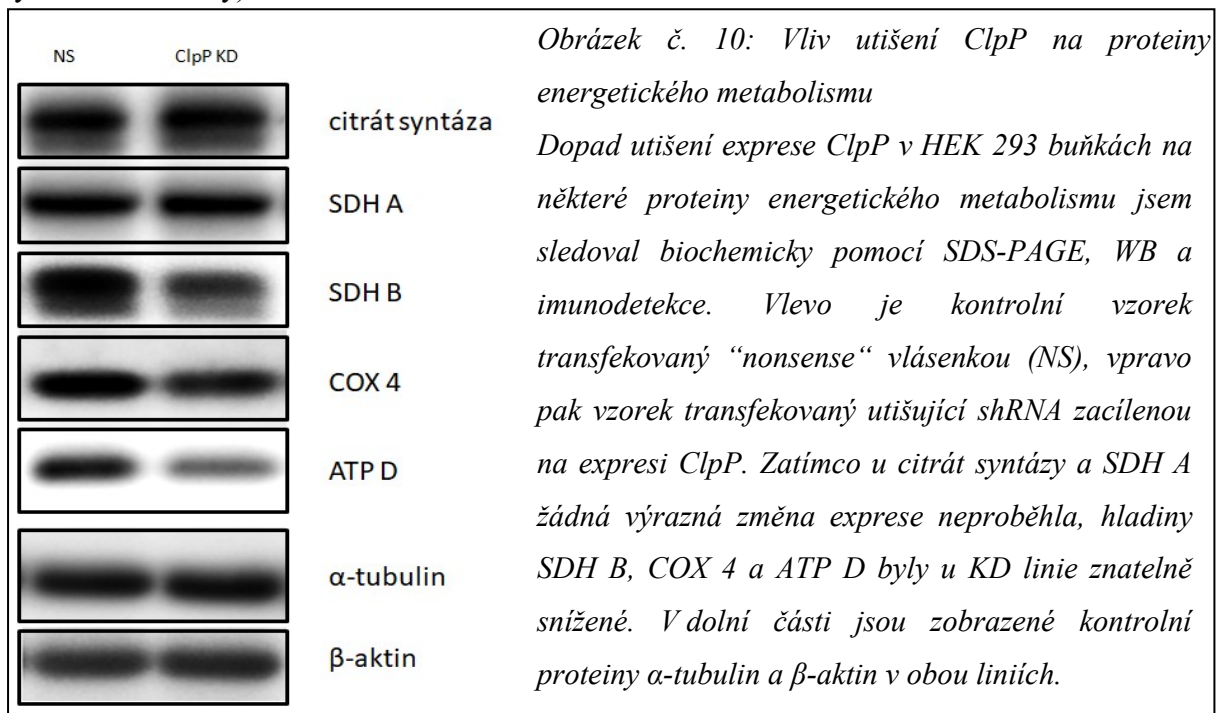


Z výsledků je patrné, že druhá matrixová proteáza LONP je s knockdownem zvýšena. V tomto případě se může jednat obdobně jako u zvýšení ClpX o snahu potlačit defektní vliv nedostatku ClpP v buňce. LONP patří stejně jako komplex ClpXP mezi proteiny kontroly kvality a oba komplexy mají funkci jak proteázovou, tak chaperonovou (Pryde et al., 2016). LONP tedy pravděpodobně nahrazuje funkci chaperonu a proteolyticky odbourává společné substráty. Zároveň se v důsledku hromadění poškozených substrátů ClpXP, které LONP nerozpozná, zvyšuje riziko oxidativního stresu a LONP tedy musí o to aktivněji odbourávat například poškozené proteiny dýchacího řetězce.

Dále také z těchto dat nelze vyloučit, že LONP by mohl být také substrátem ClpXP komplexu, který se v buňce hromadí. Hladinu LONP jsem tedy dále sledoval po reintrodukcii ClpP v buňkách (viz kapitola 4.5). Vzhledem k tomu, že LONP a ClpXP kompetují o TFAM (Kasashima et al., 2012; Lu et al., 2013), lze při snížení ClpP a zvýšení LONP očekávat změna na úrovni TFAM.

Naproti tomu, exprese obou sledovaných mitoproteáz vnitřní membrány je po KD ClpP snížena. Je možné, že ClpP se podílí na procesování membránových proteáz a jejich ukotvení do membrány, nebo že chaperonovou aktivitou podporuje stabilitu jejich matrixových domén.

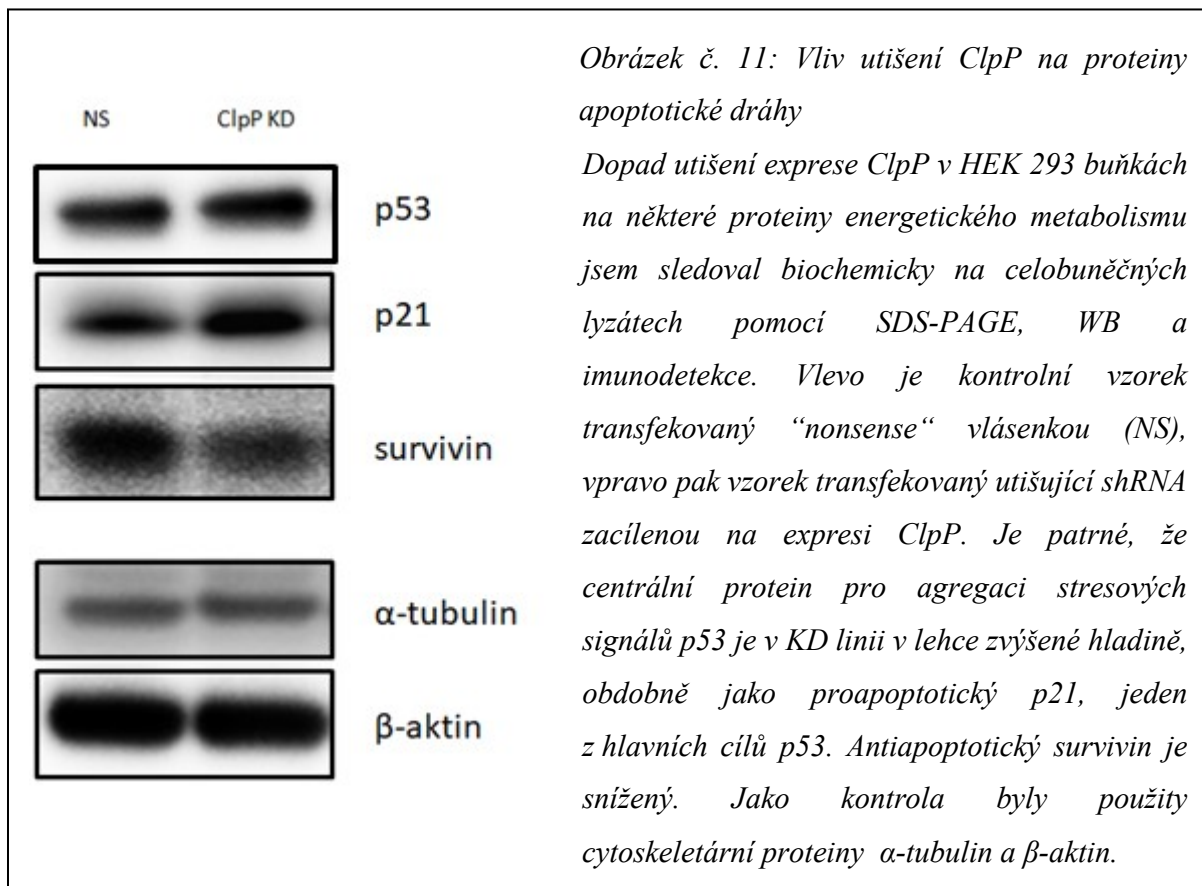
Druhá skupina, na kterou jsem se zaměřil, shrnovala některé proteiny energetického metabolismu (viz obrázek č. 10). Sem patřila citrát syntáza z Krebsova cyklu a dále proteiny dýchacího řetězce - podjednotky sukcinát dehydrogenázy (komplex II) SDH A a SDH B (podjednotky A a B sukcinát dehydrogenázy), podjednotka komplexu IV COX 4 (podjednotka 4 cytochrom oxidázy).



Citrát syntáza je mitochondriální protein s relativně stabilní hladinou a není tedy překvapivé, že ani zde není výrazně ovlivněna. Obdobně je tomu i u SDH A podjednotky komplexu II. Jiná podjednotka komplexu II, SDH B, byla popsána jako jeden ze substrátů ClpXP proteázy, a měla by se tedy v KD buňkách akumulovat v mitochondriích (Seo et al., 2016). V našich liniích ovšem došlo naopak k úbytku SDH B. Možná právě interakce se survivinem, který podporuje zabudovávání SDH B do komplexu II, zvyšuje stabilitu SDH B a tedy i jeho koncentraci v buňce.

Stejným způsobem byly sníženy hladiny COX 4 a ATP D, podjednotek komplexů IV a V. Snížení zde by mohlo být způsobeno tím, že ClpP ovlivňuje mitochondriální transkripci přes degradaci ERAL1 (Szczepanowska et al., 2016) a současně u ClpP KD kvůli zvýšení ClpX dochází k ovlivnění transkripčního faktoru TFAM. Nedostatek mitochondriálně kódovaných podjednotek by mohl mít vliv na stabilitu celého komplexu a kvůli nestabilitě by pak docházelo k degradaci volných podjednotek, čímž by se snížila celková hladina těchto proteinů. Pro ověření těchto hypotéz jsem tyto proteiny dále sledoval po reintrodukcii ClpP v buňce.

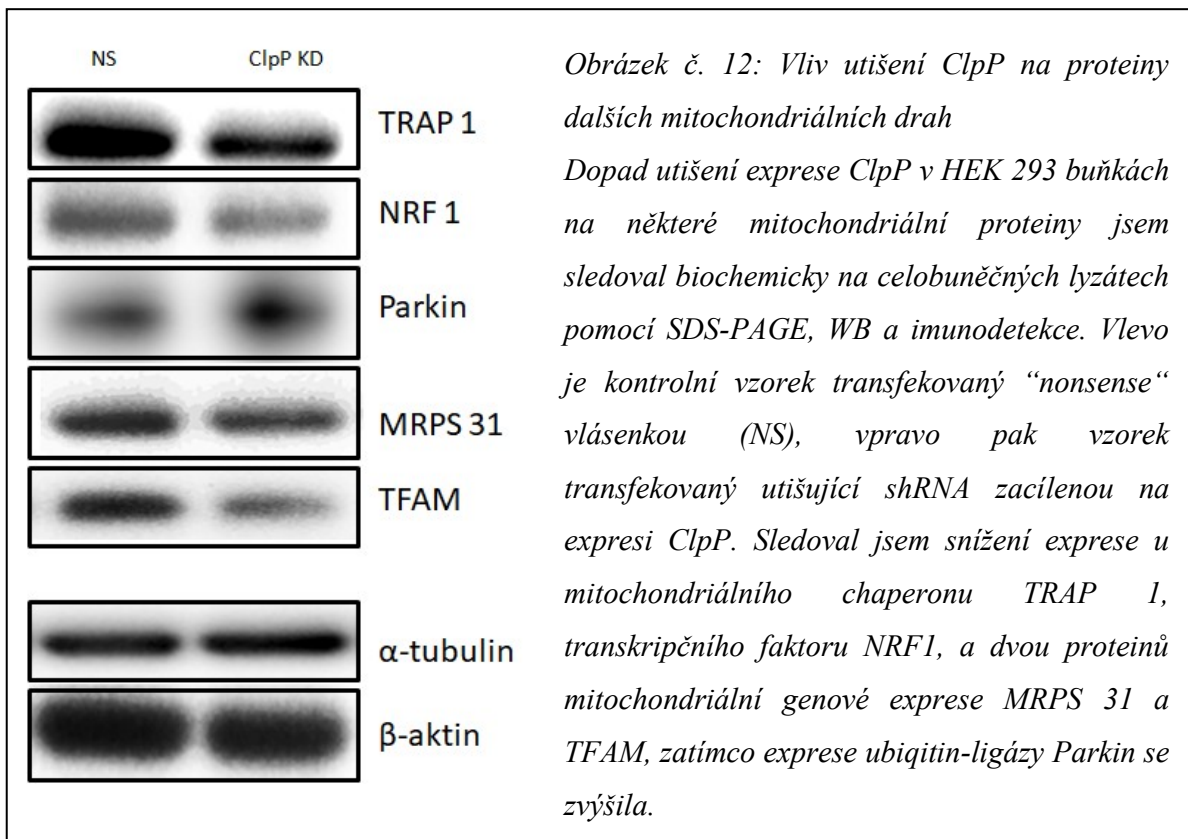
Třetí skupina shrnovala proteiny apoptotické a antiapoptotické dráhy - p21, p53 a survivin. Výsledky značení jsou zobrazeny na obrázku č. 11



Výsledky ukazují, že KD ClpP je pro buňky stresovou změnou. Při zvýšení buněčné koncentrace centrálního proteinu buněčného stresu p53 i jednoho z cílů p53, inhibitoru buněčného cyklu p21 a snížení survivinu inhibitoru apoptózy by se dalo očekávat, že bude ovlivněna i růstová rychlost, k tomu ale u naší linie nedošlo. Dále je třeba pamatovat, že survivin má i jiné než antiapoptotické funkce, například se podílí na začlenění SDH B do komplexu II. Survivin má současně prokázanou interakci s ClpP (Seo et al., 2016), takže nelze vyloučit, že snížení jeho hladiny nemusí se stresem vůbec souviset.

Dopad změny hladiny p53 je ale obtížněji odhadnutelný, protože p53 integruje mnoho drah buněčného stresu a pouhá jeho koncentrace nemusí plně vypovídat o jeho aktivitě. Vzhledem k těmto výsledkům jsme se rozhodli v dalším kroku provést na ClpP KD buňkách indukci apoptózy.

Poslední skupina proteinů, které jsme sledovali v tomto kroku, shrnovala zbylé proteiny různých drah - mitochondriální chaperon TRAP1, dále transkripční faktor NRF1 (nukleární respirační faktor 1), mitochondriální ubiquitin ligázu Parkin, podjednotku mitochondriálního ribosomu MRPS 31 a mitochondriální transkripční faktor A (TFAM). Výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 12.



Z výsledků je patrné, že mitochondriální chaperon TRAP1 je v buňkách s ClpP KD ve snížené koncentraci. TRAP1 tvoří vazbu jak s ClpP, tak se survivinem, které jsou oba v ClpP KD linii ve snížených koncentracích. V práci z roku 2016 bylo ukázáno, že při snížení exprese survivinu se sníží i exprese TRAP1 (Seo et al., 2016). Mé výsledky tedy odpovídají těmto zjištěním.

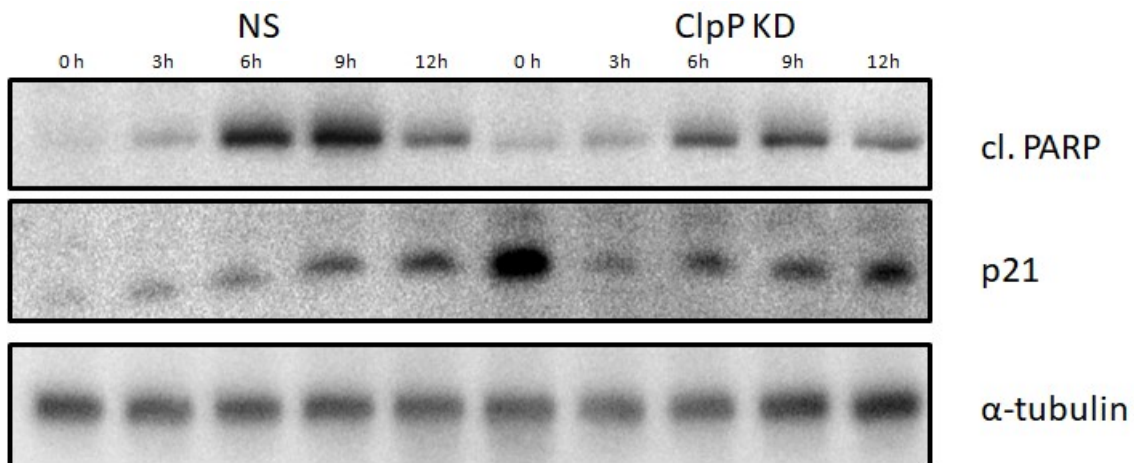
Dalším proteinem, u kterého došlo ke snížení exprese je NRF1. NRF1 je jaderný transkripční faktor, který aktivuje jaderné geny potřebné pro respiraci, syntézu mitochondriální DNA, mitochondriální transkripci a další mitochondriální dráhy (Scarpulla, 2006). Jedním z těchto genů je gen pro mitochondriální transkripční faktor TFAM, u něhož jsme také pozorovali snížení. Současně TFAM v jádře negativní zpětnou vazbou snižuje aktivitu NRF1 a tím i vlastní expresi (Lee et al., 2014). To, společně se snížením hladiny podjednotky mitochondriálního chromosomu MRPS 31, opět může mít za následek snížení hladiny mitochondriálních proteinů, a to jak jaderných, tak mitochondriálně kódovaných.

Posledním proteinem z této skupiny je mitochondriální ubiquitin-ligáza Parkin. Parkin je zodpovědný za ubiquitinilaci proteinů vnější mitochondriální membrány a následnou mitofágií poškozených mitochondrií (Seirafi et al., 2015). Zvýšení jeho hladiny v buňce by mohlo naznačovat horší stav mitochondrií ClpP KD linie způsobený některým z dříve popsaných jevů.

4.4 – Indukce apoptózy

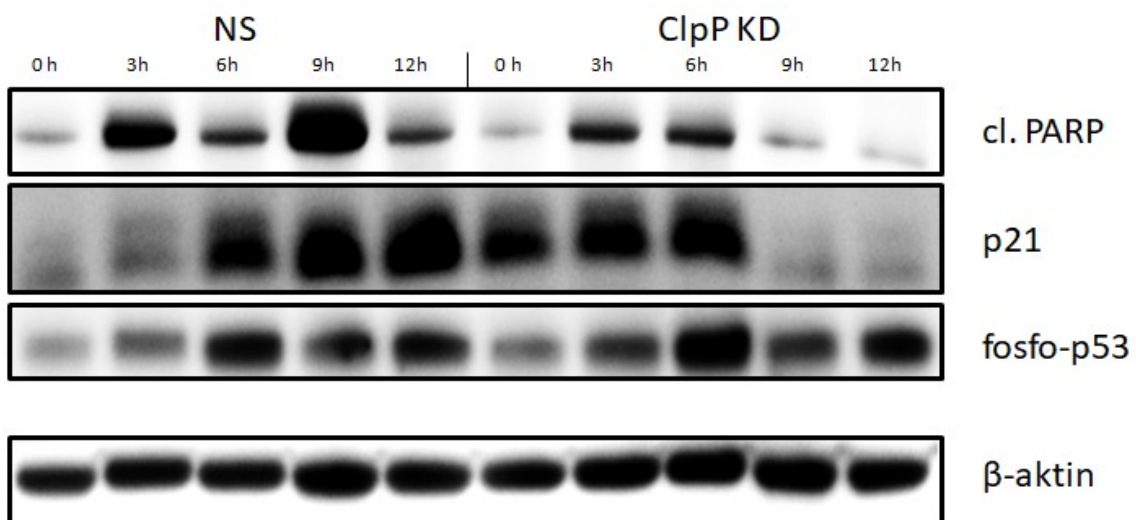
Vzhledem k změnám u proapoptotických proteinů p53 a p21 jsem na ClpP KD linii a kontrolní linii indukoval vnější apoptotickou dráhu staurosporinem (2 μ M) a vnitřní apoptotickou dráhu pomocí TNF- α (1/1 000 000) a INF- γ (1/1 250 000). Buňky jsem sklízel v časech 0, 3, 6, 9 a 12 hodin od indukce apoptózy. Následně jsem si připravil vzorky a provedl SDS-PAGE a western blot. Na liniích jsem sledoval změny na úrovni hladiny p21, kaspázou štěpeného a deaktivovaného proteinu PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) a hladině proteinu p53 fosforylovaného na pozici Ser15. Právě fosforylace tohoto serinu je klíčová pro aktivitu p53 vedoucí k zastavení buněčného cyklu a k apoptóze (Loughery et al., 2014). Jako kontrolní proteiny jsem opět používal cytoskeletární α -tubulin a β -aktin. Výsledky značení vnitřní a vnější apoptotické dráhy jsou znázorněny níže (viz obrázky č. 13 a 14).

Co se aktivity kaspáz na seštěpení PARP týče, není v případě vnitřní ani vnější apoptotické dráhy patrný rozdíl v průběhu mezi ClpP KD a NS linií.



Obrázek č. 13: Indukce vnitřní apoptotické dráhy

Vliv ClpP KD na vnitřní apoptotickou dráhu po indukci TNF- α a INF- γ jsem sledoval biochemicky na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Vlevo jsou kontrolní vzorky, vpravo pak vzorky transfekované utišující shRNA zacílenou na expresi ClpP. Buňky byly sklizeny každé 3 hodiny v časech 0, 3, 6, 9 a 12 hodin od indukce apoptózy. Jako markery apoptózy byly zvoleny kaspázou sestřížený PARP a dále p21. Jako kontrolní protein byl naznačen α -tubulin.



Obrázek č. 14: Indukce vnější apoptotické dráhy

Vliv ClpP KD na vnitřní apoptotickou dráhu po indukci staurosporinem jsem sledoval biochemicky na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Vlevo jsou kontrolní vzorky, vpravo pak vzorky transfekované utišující shRNA zacílenou na expresi ClpP. Buňky byly sklizeny každé 3 hodiny v časech 0, 3, 6, 9 a 12 hodin od indukce apoptózy. Jako markery apoptózy byly zvoleny kaspázou sestřížený PARP a dále p21 a fosfo-p53, protein p53 fosforylovaný na Ser15. Jako kontrolní protein byl naznačen α -tubulin.

Oproti tomu u proteinu p21 je rozdíl značný. Výsledky indukce vnitřní i vnější apoptotické dráhy v čase 0 hodin jasně potvrzují, že linie ClpP KD má zvýšenou klidovou hladinu p21. Současně se změny hladiny p21 mezi ClpP KD a kontrolní linií liší u vnější a vnitřní dráhy.

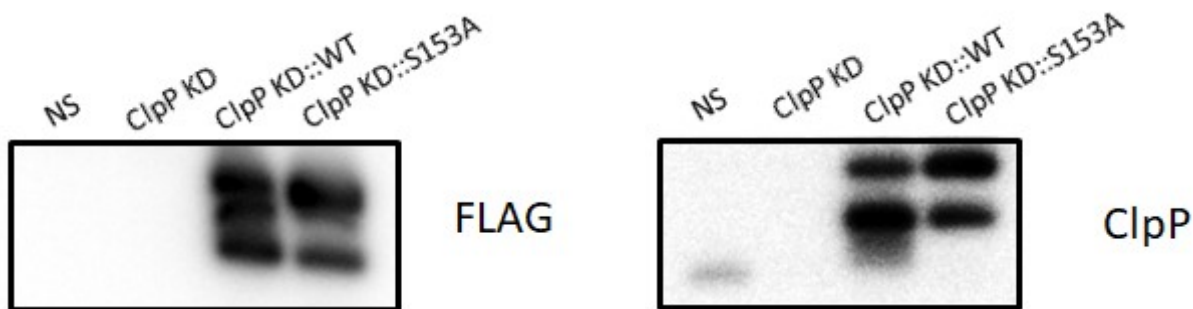
Indukce TNF- α a INF- γ vedla k poklesu hladiny p21 u ClpP KD a následně se hladina p21 vyvíjela u obou linií shodně. Po indukci staurosporinem ale u ClpP KD hladina p21 ještě vzrostla a maximum měla okolo 6-té hodiny, zatímco u kontrolní linie došlo k nárůstu p21 až výrazně později. Sledoval jsem, jestli za změnou p21 nemůže být změna v aktivitě p53 právě fosforylací na Ser15, právě ta je totiž důležitá pro vazbu p53 do promotoru genu pro p21 (Loughery et al., 2014). V hladině fosfo-p53 ale podobně jako v případě štěpeného PARP proteinu není mezi ClpP KD a kontrolní linií zřetelný rozdíl. Pravděpodobným důvodem je to, že zvýšení hladiny p21 je v ClpP KD buňkách způsobeno nějakým s aktivitou p53 a apoptózou nesouvisejícím jevem.

4.5 – Reintrodukce ClpP v buňkách

V dalším kroku jsem se v ClpP KD buňkách rozhodl reintrodukovat ClpP, abych ukázal, že změny, které jsem zaznamenal, jsou dány cíleným knockdownem ClpP a ne off-targetingem způsobeným použitím shRNA. Rozpěstoval jsem tedy ClpP KD linii a transientně buňky transfekoval plasmidem nesoucím gen pro ClpP s navázaným FLAG peptidem. Pro srovnání jsem další část ClpP KD linie transfekoval plasmidem nesoucím mutovaný gen pro ClpP s mutací 457A>G kódujícím mutantní ClpP^{S153A}. Tato mutace zasahuje katalytický serin v aktivním místě proteázy. Na mutantní ClpP byl opět připojený FLAG. Transfekci jsem provedl pomocí Lipofectaminu 3000 a buňky jsem sklízel 48 hodin po zahájení transfekce. Následně jsem připravil vzorky pro SDS-PAGE a společně se vzorky ClpP KD a kontrolní linií NS jsem provedl SDS-PAGE, western blot a následně imunodetekoval různé mitochondriální proteiny.

Jako první jsem na imunodetekci FLAG a ClpP dokázal, že transfekce byla úspěšná (viz obrázek č. 15). Je vidět, že významná část ClpP-FLAG proteinu byla patrně v ne zcela zpracovaném stavu. Současně je patrné, že ClpP má v nových transfekovaných buňkách znatelně vyšší expresi, než jakou mělo v původní kontrolní (NS) linii.

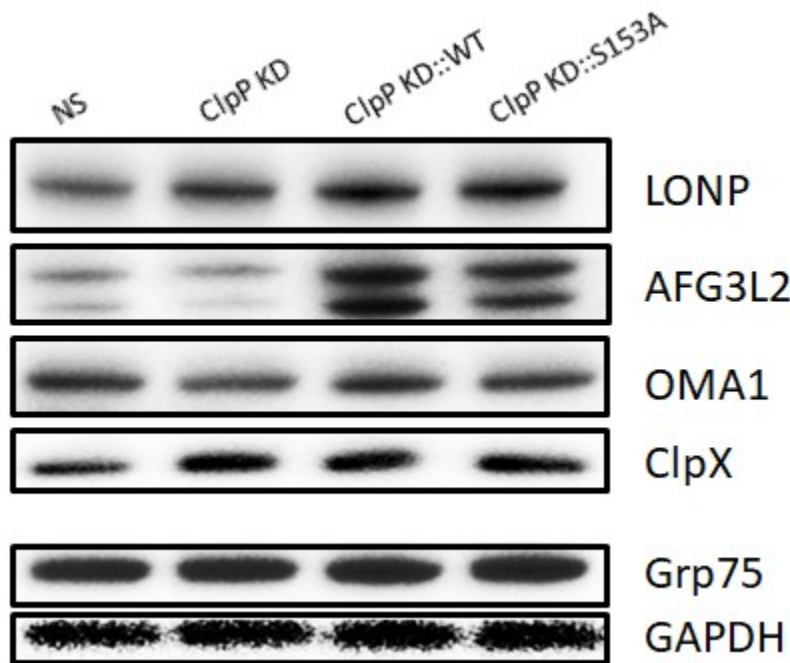
Po důkazu úspěšné transfekce jsem sledoval změny na úrovni proteinů ze skupin jako v části 4.3. Ukázalo se, že hladina cytoskeletárních proteinů je transfekcí ovlivněna (viz obrázek č. 19) a proto jsem musel zvolit novou sadu kontrolních proteinů. Pro to posloužil dobře mitochondriální porin VDAC1, glykolytický protein GAPDH (glyceraldehyd fosfát dehydrogenáza), mitochondriální matrixový chaperon z rodiny proteinů teplotního šoku Grp75 (glucose regulated protein 75) a protein eIF2- α (eukaryotický iniciační faktor α).



Obrázek č. 15: Důkaz úspěšné transfekce ClpP KD linie

Úspěšnost transfekce jsem dokázal biochemicky na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Značil jsem jak ClpP samotné, tak FLAG peptid, který byl na ClpP uměle navázán. Vlevo je značení FLAG, vpravo ClpP, v obou případech byly vzorky srovnány v pořadí zleva kontrolní (NS), původní linie ClpP KD před transfekcí (ClpP KD), ClpP KD s reintrodukovaným ClpP (ClpP KD::WT) a ClpP KD transfekováno ClpP bez proteolytické aktivity (ClpP KD::S153A). Je patrné, že FLAG peptid je přítomný v obou transfekovaných liniích a ClpP je patrné jak v NS, tak v transfekovaných liniích. ClpP má po navázání FLAG zjevně vyšší molekulovou hmotnost a objevuje se stejně jako FLAG ve dvou velikostech, pravděpodobně v závislosti na míře proběhlého procesování.

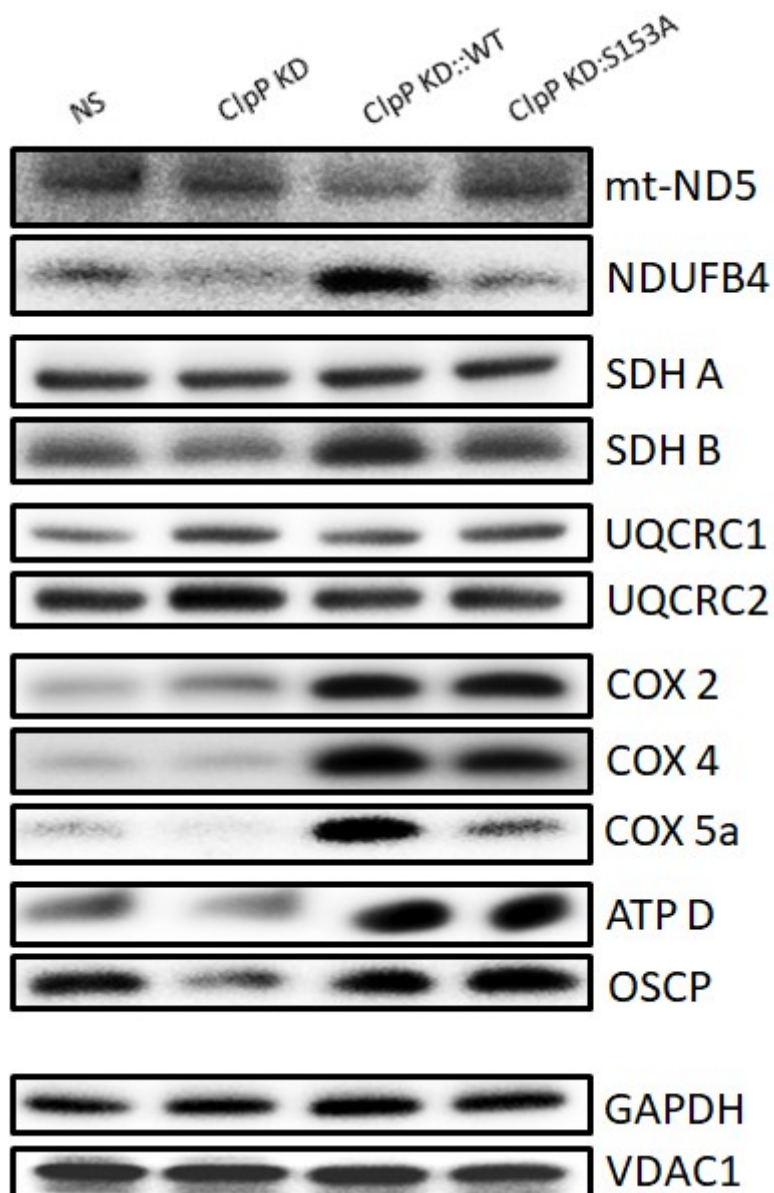
Jako první skupinu jsem opět zvolil proteázy (viz obrázek č. 16). Z proteáz jsem zvolil sledovat změny u LONP, AFG3L2, OMA1 a podjednotky ClpX proteázy ClpXP. V případě, že by docházelo k substituci proteolytické aktivity komplexu ClpXP jinou proteázou, očekávali bychom zvýšení hladiny u linie ClpP KD, opětovné snížení po reintrodukcii a opětovné zvýšení po transfekci KD linie mutantní formou ClpP. Tento trend ale nebyl zaznamenán u žádné z proteáz. U podjednotek matrixových proteáz LONP a ClpX nedošlo po reintrodukcii k očekávanému snížení, u ClpX je snížení jen nepatrné. To odpovídá stavu, kdy hladina LONP a ClpX určitým způsobem reaguje na proces knockdownu ClpP, ale ne přímo na hladinu ClpP. Oproti tomu u proteáz vnitřní mitochondriální membrány AFG3L2 a OMA1 je patrné snížení u ClpP KD linie a zvýšení po reintrodukcii. U obou linií s reintrodukovaným ClpP je patrná nižší hladina AFG3L2 a OMA1 u mutantní formy ClpP, hladina AFG3L2 je ovšem po transfekci výrazně vyšší než u kontrolní linie. Zde předpokládám, že pro hladinu AFG3L2 v buňce má větší vliv samotná hladina ClpP, a menší jeho aktivita, zatímco u OMA1 mají srovnatelný vliv oba tyto faktory.



Obrázek č. 16: Mitochondriální proteázy reagují na knockdown a reintrodukci ClpP podle lokalizace v mitochondriálních kompartmentech

Vliv KD a reintrodukce ClpP na mitochondriální proteázy jsem studoval na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Vzorky byly srovnány v pořadí zleva: kontrolní (NS), původní linie ClpP KD před transfekcí (ClpP KD), ClpP KD s reintrodukovaným ClpP (ClpP KD::WT) a ClpP KD transfekováno ClpP bez proteolytické aktivity (ClpP KD::S153A). Značeny byly proteázy LONP, AFG3L2, OMA1 a podjednotka ClpX proteázy ClpXP. Jako kontrolní proteiny byly značeny mitochondriální chaperon Grp75 a glykolytický protein GAPDH. Zatímco podjednotky matrixových proteáz LONP a ClpX jsou po KD ClpP zvýšeny nezávisle na hladině ClpP, proteázy vnitřní membrány AFG3L2 a OMA1 reagují přímo na proteolytickou aktivitu ClpP a kopírují hladinu aktivního ClpP.

Další skupinou proteinů, u kterých jsem sledoval změny hladiny po KD ClpP a následné reintrodukci klasické a mutantní varianty, byly podjednotky jednotlivých komplexů dýchacího řetězce (viz obrázek č. 17). Sledoval jsem změny u podjednotek všech pěti komplexů, mt-ND5 a NDUFB4 (mitochondrial NADH dehydrogenase subunits 5 and 4-β) jako podjednotky komplexu I, SDH A a SDH B jako podjednotky komplexu II, UQCRC1 a UQCRC2 (Ubiquinol-Cytochrome c Reductase Core Protein) jako podjednotky komplexu III, podjednotky komplexu IV COX 2, COX 4 a COX 5a, a podjednotky komplexu V: ATP D jako podjednotku F₀ a OSCP (oligomycin sensitivity conferral protein) jako δ-podjednotku F₁.



Obrázek č. 17: KD i reintrodukce ClpP značně ovlivňuje hladiny podjednotek OXPHOS

Vliv KD a reintrodukce ClpP na podjednotky komplexů dýchacího řetězce jsem studoval na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Vzorky byly srovnány v pořadí zleva: kontrolní (NS), původní linie ClpP KD před transfekcí (ClpP KD), ClpP KD s reintrodukovaným ClpP (ClpP KD:WT) a ClpP KD transfekováno ClpP bez proteolytické aktivity (ClpP KD:S153A). Značeny byly vybrané podjednotky všech pěti komplexů dýchacího řetězce, na obrázku jsou seřazeny odshora počínaje podjednotkami komplexu I (mt-ND5 a NDUFB4), pokračuje podjednotkami komplexu II (SDH A a SDH B), komplexu III (UQCRC1 a UQCRC2), komplexu IV (COX 2, COX 4 a COX 5a) a konče podjednotkami komplexu V (ATP D a OSCP). Jako kontrolní proteiny byly značeny mitochondriální proteiny porin VDAC1 a glykolytický protein GAPDH.

Z výsledků je patrné, že různé komplexy reagují na změny exprese různými způsoby. Očekávali jsme, že může být odlišná reakce jaderně a mitochondriálně kódovaných proteinů. U podjednotek komplexu I je patrné, že zatímco jaderně kódovaná NDUFB4 má zvýšenou hladinu v přítomnosti ClpP, mitochondriálně kódovaná mt-ND5 je viditelně snižena pouze v případě overexprimovaného ClpP. Přitom by se vzhledem k povzbuzení mitochondriální translace prostřednictvím ClpP štěpení ERAL1 (Szczepanowska et al., 2016) dalo v přítomnosti ClpP očekávat zvýšení hladiny právě mitochondriálně kódovaných proteinů.

Změny hladiny jaderně kódovaných podjednotek SDH A a SDH B komplexu II se podle očekávání lišili. Již dříve byla popsána vazba SDH B na ClpP a hlavně ClpX podjednotku komplexu ClpXP. Zatímco u SDH A jsme změnu nepozorovali, v nepřítomnosti ClpP, respektive jeho proteolytické aktivity, jsme sledovali znatelné snížení hladiny SDH B. Nezměněná hladina SDH A se shoduje s dřívějšími pozorováními, oproti tomu u SDH B jsme sledovali opačný trend, než autoři před mámi (Seo et al., 2016). Zatímco my sledovali úbytek, který lze vysvětlit přes absenci vazby survivinu na ClpXP, který současně pomáhá foldingu SDH B a jeho začlenění do kvartérní struktury, Seo sledoval hromadění špatně sbaleného SDH B v mitochondrii. Proč naše buňky ukazují opačný, než dříve popsaný trend, není v současnosti známo. Jedním z rozdílů je, že výzkum byl prováděn na různých vstupních buňkách (rakovinné PC3 a HEK 293).

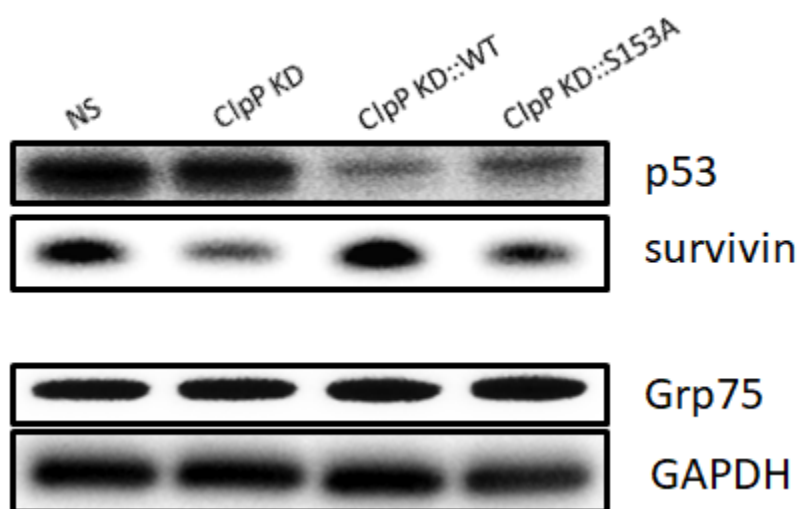
Jaderně kódované podjednotky UQCRC1 a UQCRC2 komplexu III měly obě zvýšenou hladinu po umlčení aktivity ClpP. Ty by mohli být kandidátními proteiny na substráty ClpXP proteázy.

U komplexu IV dýchacího řetězce jsem sledoval změnu hladiny mitochondriálně kódovaného COX 2 a jaderně kódovaných COX 4 a COX 5a. Jaderně kódované COX 4 a COX 5a jsou v přítomnosti aktivního ClpP ve zvýšené koncentraci, i neaktivní forma ale jejich koncentraci zvedá. Mitochondriálně kódovaný COX 2 má silně zvýšenou hladinu u obou linií po transfekci, ale oproti kontrolní linii má lehce zvýšenou hladinu i ClpP KD linie. Tento trend je podobný trendu proteinů s chaperonovou aktivitou ClpX a LONP - je možné, že některý z nich se účastní správného foldingu nebo asemblace.

Oba proteiny komplexu V, které jsem sledoval, jsou kódovány jaderným genomem. Jak ATP D, coby podjednotka F_O části, tak OSCP, také označováno ATP 50, jako součást F₁. Protein OSCP tvoří základ "stonku", který propojuje F_O a F₁ část ATP syntázy. Přestože patří k různým subkomplexům, změna jejich hladiny v reakci na změnu exprese ClpP má stejný trend - zvyšuje se v přítomnosti ClpP. Změna je zjevně závislá na přítomnosti ClpP, ne na jeho proteolytické aktivitě.

Pro podrobnější zjištění dopadu změn exprese ClpP na podjednotky dýchacího řetězce jsme později měřili aktivity komplexů OXPHOS pro jednotlivé linie (viz kapitola 4.8).

Třetí skupinou byly opět proteiny související s apoptózou. Sledoval jsem změny hladiny antiapoptotického survivinu a proteinu p53. Jako kontrolní proteiny opět sloužili GAPDH a Grp75 (viz obrázek č. 18).



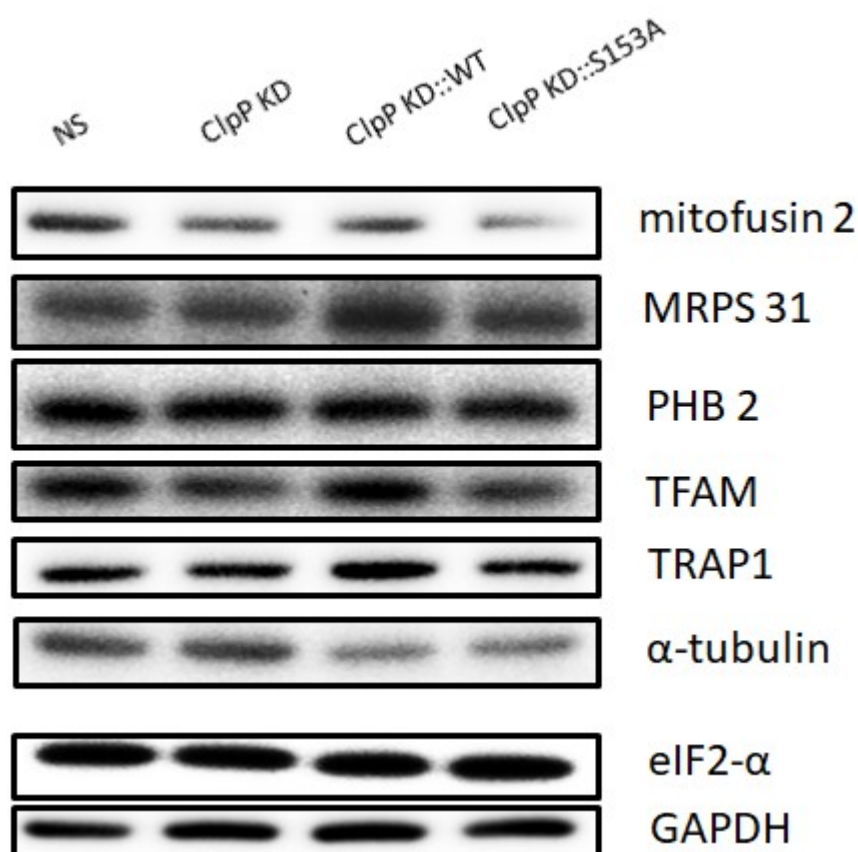
Obrázek č. 18: Změny po KD a reintrodukci ClpP u proteinů p53 a survivinu

Vliv KD a reintrodukce ClpP na proteiny související s apoptózou jsem studoval na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Vzorky byly srovnány v pořadí zleva: kontrolní (NS), původní linie ClpP KD před transfekcí (ClpP KD), ClpP KD s reintrodukovaným ClpP (ClpP KD::WT) a ClpP KD transfekováno ClpP bez proteolytické aktivity (ClpP KD::S153A). Byly sledovány změny na úrovni hladiny centrálního proteinu buněčného stresu p53 a antiapoptotického survivinu. Jako kontrolní proteiny byly značeny mitochondriální chaperon Grp75 a glykolytický protein GAPDH.

U survivinu se objevuje obdobný trend jako u SDH B, kterému survivin pomáhá s foldingem a asemblací (Rivadeneira et al., 2015). Je tedy možné, že právě zvýšená hladina survivinu v přítomnosti proteolyticky aktivní formy ClpP je zodpovědná za vyšší zvýšení hladiny SDH B, které je tak úspěšněji asemblováno do komplexu II a nedochází k odbourání jeho volné formy v mitochondriální matrix.

U p53 došlo po transfekci k výraznému snížení exprese v obou liniích. Z toho vyplývá, že na změnu u p53 měl mnohem větší roli samotný proces transfekce, než přítomnost či nepřítomnost ClpP. Vzhledem k tomu, že p53 je centrální molekulou buněčného stresu, mohl by tento fakt být způsobený například tím, že zatímco ClpP KD a kontrolní NS linie byly pěstovány v médiu se selekčním puromycinem, v době od transfekce po sklizení linií s reintrodukovaným ClpP byl puromycin vysazen. Proto jsem dále ověřil dopad růstu v médiu s puromycinem proti médiu bez puromycinu na p53 v linii ClpP KD a kontrolní linii NS (viz kapitola 4.7).

Poslední skupina proteinů, u kterých jsem sledoval dopad změny exprese ClpP, byla opět nehomogenní skupina shrnující proteiny různých drah a funkcí v mitochondriích i mimo ně. Jde o mitofusin 2, účastníci se fúze vnější membrány mitochondrií při remodelaci mitochondriální sítě, již zmíněný ribosomální MRPS 31, protein PHB 2 (prohibitin 2) mající strukturní funkci v mitochondriích, mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), mitochondriální chaperon TRAP 1 a cytoskeletární α -tubulin. Jako kontrolní proteiny byly značeny protein jaderného translačního aparátu eIF2- α (eukaryotický iniciační faktor 2 - α) a glykolitický protein GAPDH (viz obrázek č. 19).



Obrázek č. 19: Změny po KD a reintrodukcí ClpP u proteinů dalších drah a funkcí

Vliv KD a reintrodukce ClpP na vybrané proteiny jsem studoval na celobuněčných lyzátech pomocí SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Vzorky byly srovnány v pořadí zleva: kontrolní (NS), původní linie ClpP KD před transfekcí (ClpP KD), ClpP KD s reintrodukovaným ClpP (ClpP KD::WT) a ClpP KD transfekováno ClpP bez proteolytické aktivity (KD::S153A). Jako kontrolní proteiny byly značeny mitochondriální chaperon Grp75 a glykolytický protein GAPDH.

Z výsledků je patrné zvýšení hladiny mitofusinu v přítomnosti aktivního ClpP. ClpP podporuje kvalitní složení mitochondrií, které v lepším stavu mohou lépe fúzovat a restrukturalizovat se. Strukturní protein prohibitin 2 nevykazuje žádné výrazné změny exprese.

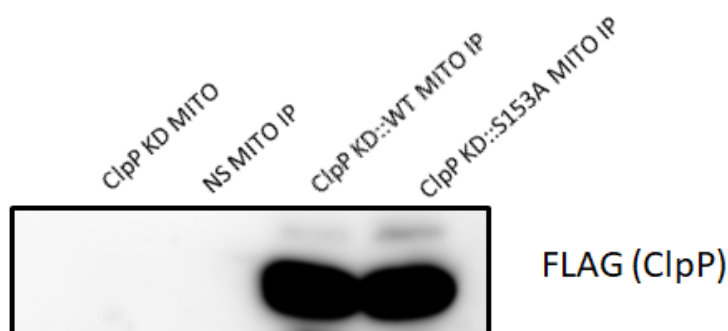
Proteiny účastníci se mitochondriální genové exprese, transkripční faktor TFAM a ribosomální protein MRPS 31 jsou opět ve zvýšené hladině v přítomnosti aktivního ClpP, což lze přičíst roli aktivního odbourání inhibitoru mitochondriální translace ERAL1 právě ClpXP komplexem (Szczepanowska et al., 2016).

Mitochondriální chaperon TRAP 1 který má popsanou vazbu jak se survivinem, tak s ClpP, má opět zvýšenou hladinu v přítomnosti aktivního ClpP. Zde jeho stabilitu podporuje právě vazba na již zmíněný survivin.

Posledním proteinem na obrázku č. 19 je α -tubulin. U α -tubulinu dochází ke změnám obdobným jako u p53. Proces transientí transfekce lipofectaminem měl zjevně výrazný dopad i na cytoskelet. Nelze ale předpokládat, že by cytoskeletární změny nějak souviseli s expresí ClpP, jde zde spíše o experimentální artefakt.

4.6 – Příprava vzorků pro hledání interakčních partnerů ClpP

Z obou linií po reintrodukcii ClpP (mutovaného i WT ClpP) jsem izoloval mitochondrie a přes navázaný FLAG provedl koimunoprecipitaci proteinů s ClpP. Následně jsem z proteinové směsi připravil vzorky pro SDS-PAGE. Pomocí SDS-PAGE, western-blotu a imunodetekce FLAG peptidu jsem dokázal, že koimunoprecipitace byla úspěšná (viz obrázek č. 20). Další práci s koimunoprecipitátem jsem přenechal dalším členům laboratoře. Nepoškozený ClpP-FLAG váže především proteiny s vazbou na ClpXP, mutovaná varianta ClpP-FLAG by přes tzv. trapping essay měla vázat substráty ClpXP proteázy (Szczepanowska et al., 2016).

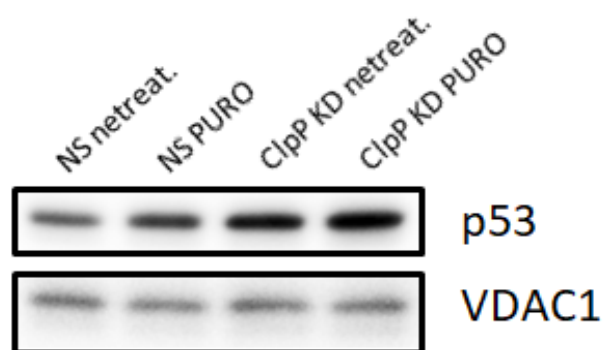


Obrázek č. 20: Doklad úspěšné koimunoprecipitace

Na obrázku je doklad úspěšné koimunoprecipitace. Koimunoprecipitaci jsem provedl na mitochondriích z ClpP KD linie, transfekovaných plasmidem s nemutovanou formou ClpP (vzorek ClpP KD::WT MITO IP) a mutantní formou ClpP^{S153A} (vzorek ClpP KD::S153A MITO IP). Obě tyto formy měly navázaný peptid FLAG. Jako kontrolní vzorky jsem použil mitochondriální lyzát z linie ClpP KD (vzorek ClpP KD MITO) a koimunoprecipitát mitochondrií kontrolní linie NS (vzorek NS MITO IP). Vzorky jsou seřazeny zleva: ClpP KD MITO, NS MITO IP, ClpP KD::WT MITO IP a ClpP KD::S153A MITO IP.

4.7 – Vliv puromycinu na náchylnost buněk k apoptóze

Vzhledem k výsledkům na p53 po reintrodukcii ClpP jsem se rozhodl otestovat míru dopadu přítomnosti puromycinu v médiu na buňky, které nesou plasmid s rezistencí vůči puromycinu. Napěstoval jsem linii s KD ClpP a kontrolní linii NS v médiu obohaceném o puromycin. Po pasážování buněk jsem část buněk od obou linií pěstoval v médiu s puromycinem a část bez puromycinu. Buňkám jsem po osmi hodinách vyměnil médium podle stejného rozdělení a 48 hodin od pasáže jsem buňky sklídlil a připravil vzorek na SDS-PAGE. Následně jsem provedl SDS-PAGE, western-blot a imunodetekci p53. Jako kontrolní protein jsem značil mitochondriální porin VDAC1 (viz obrázek č.21).



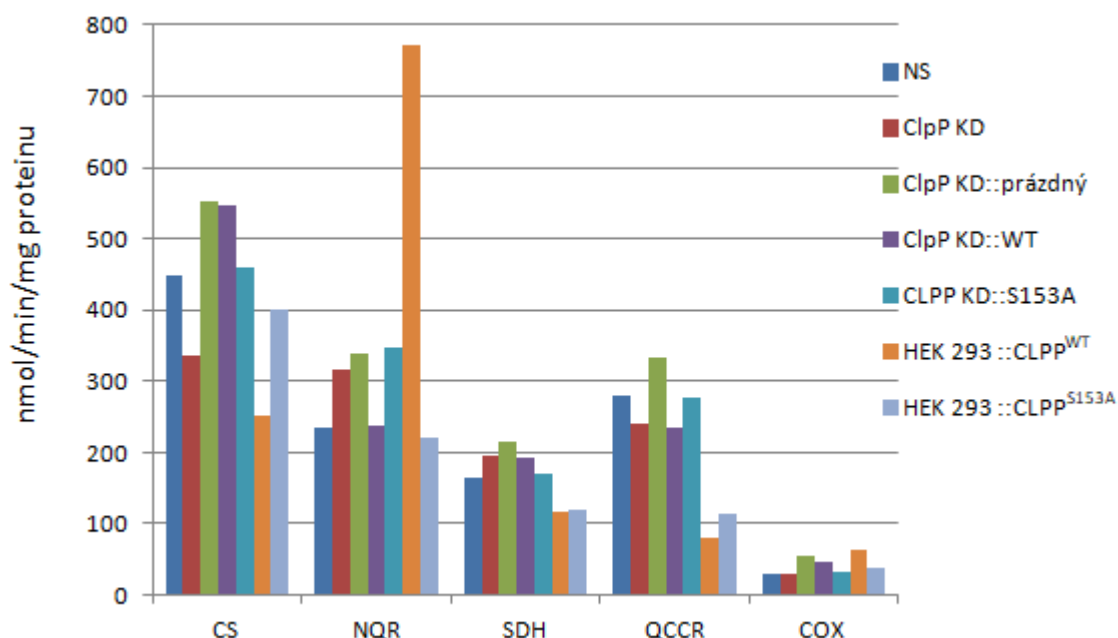
Obrázek č. 21: Test vlivu puromycinu na hladinu p53 v buňkách

Vliv antibiotika puromycinu na hladinu p53 v liniích nesoucích plasmid s rezistencí vůči puromycinu jsem testoval na celobuněčných lyzátech SDS-PAGE, WB a imunodetekce. Pro porovnání jsem použil dvě linie, ClpP KD a kontrolní NS. U obou linií byl část buněk na dva dny vysazen puromycin (linie NS netreat. a ClpP KD netreat.) a část vysazen nebyl (linie NS PURO a ClpP KD PURO). Jako kontrolní protein jsem značil mitochondriální porin VDAC1.

Z výsledku značení je patrné, že puromycin je zodpovědný za zvednutí hladiny p53 v buňce. Znamená to tedy, že změny hladiny p53, které jsme zaznamenali v buňkách po reintrodukcii ClpP^{WT} a ClpP^{S153A} (viz obrázek č. 18) jsou způsobeny absencí puromycinu v médiu od zahájení transfekce. Současně ale výsledky opět ukazují, že také absence ClpP zvyšuje hladinu p53, což značí zvětšení buněčného stresu.

4.8 – Charakterizace aktivit komplexů dýchacího řetězce

Po zaznamenání změn hladin různých proteinů všech komplexů dýchacího řetězce jsem se rozhodl změřit aktivity komplexů I-IV. Napěstoval jsem výše popsané linie ClpP KD, kontrolní NS, ClpP KD::WT (ClpP KD linii po reintrodukci WT formy ClpP) a ClpP KD::S153A (ClpP KD linii po reintrodukci mutantní formy ClpP^{S153A}). Pro porovnání vlivu transfekce byla použita kontrolní linie ClpP KD::prázdný (ClpP KD transfekovaná bez přítomnosti plasmidu). Dále mě zajímal i vliv overexpresce ClpP v buňce HEK 293, a tak jsem čistou HEK 293 linii transiентně transfekoval plasmidy nesoucí ClpP^{WT} (linie HEK 293 ::ClpP^{WT}) a mutantní formu ClpP^{S153A} (linie HEK 293 ::ClpP^{S153A}). Následně jsem z těchto linií izoloval mitochondrie a nechal jsem v naší laboratoři změřit aktivitu jednotlivých komplexů dýchacího řetězce. Aktivitu jsem dále normalizoval na 1 mg proteinu. Výsledky měření jsem zanesl do grafu (viz obrázek č. 22).



Obrázek č. 22: Vliv exprese ClpP na aktivitu OXPHOS

Aktivita komplexů I-IV a aktivita citrát-syntázy byla měřena na izolovaných mitochondriích spektrofotometricky. Jednotlivé enzymové komplexy jsou seřazeny zleva: citrát syntáza (CS), komplex I (NADH-ubichinon reduktáza, dále NQR), komplex II (sukcinát-dehydrogenáza, dále SDH), komplex III (koenzym Q:cytochrom c – oxidoreduktáza, dále QCCR) a komplex IV (cytochrom c oxidáza, dále COX). Aktivity byly sledovány na liniích s různou mírou exprese ClpP: kontrolní linie NS, ClpP KD a ClpP KD::prázdný s expresí utlumenou pomocí shRNA, linie po reintrodukci aktivní/neaktivní formy ClpP (ClpP KD::WT a ClpP KD::MUT) a čisté linie HEK 293 bez utišení, do kterých byla transfekována nová aktivní/neaktivní forma ClpP (HEK 293 ::ClpP^{WT} a HEK 293 ::ClpP^{S153A}).

Z výsledků je patrné, že ke změnám aktivit jednotlivých komplexů v souvislosti s mírou exprese ClpP dochází. U citrát syntázy, enzymu krebsova cyklu, dochází ke snížení aktivity jak při snížení exprese ClpP (rozdíl mezi ClpP KD a NS) tak při overexpresi aktivní formy ClpP. Podle toho se zdá, že systém v HEK 293 buňkách je z hlediska exprese ClpP přiměřeně vyvážen a významné výchylky oběma směry snižují aktivitu citrát syntázy. Překvapivě ovšem došlo ke zvýšení aktivity u kontrolní linie pro reintrodukcí ClpP (ClpP KD::prázdný), u které jsme očekávali obdobnou aktivitu jako u ClpP KD.

K nejméně výraznější změně aktivit mezi všemi liniemi a komplexy došlo u komplexu I. Zde u linie s overexpresí aktivního ClpP došlo k extrémnímu nárůstu aktivity. Překvapivě nejnižší aktivitu komplexu I nejeví linie s utišenou expresí ClpP, ale linie, které mají expresi ClpP okolo běžné hladiny. Tento jev, kdy k nárůstu aktivity dochází při narušení rovnováhy hladiny aktivního ClpP bude ještě třeba dále prozkoumat.

U komplexů II a III je patrné výrazné snížení hladiny u linií s overexpresí obou ClpP forem. Ty se ale od ostatních linií liší také tím, že na nich nebyla provedena stabilní transfekce, není tedy zcela jasné, která z těchto změn je za tento stav u linií zodpovědná.

U komplexu IV je patrný nárůst aktivity po overexpresi proteolyticky aktivního ClpP, a to jak mírné v linii po reintrodukcí (ClpP KD::WT), tak silné (linie HEK 293 ::ClpPWT). Překvapivě ale podobný trend není patrný mezi liniemi ClpP KD a kontrolní NS, kde k signifikantní změně aktivity nedochází.

5. Diskuze

Pro studium funkce serinové peptidázy ClpP v lidských buňkách jsem testoval buňky HEK 293, ve kterých byl proveden stabilní knockdown pomocí shRNA. V těchto buňkách jsem následně ClpP transientně reintrodukoval a to jak aktivní, tak mutací inaktivovanou formu ClpP^{S153A}. Dále jsem připravil linie HEK 293 s overexpresí proteolyticky aktivní ClpP^{WT} a inaktivní formy ClpP^{S153A}. Inaktivace byla určena záměnnou mutací v aktivním místě proteolytického serinu 153. Již dříve bylo ukázáno, že záměna serinu v pozici 153 za cystein nebo alanin vede ke ztrátě schopnosti proteolýzy (Kang et al., 2002). Výše uvedené linie byly testovány buněčně biologickými a především biochemickými metodami.

Na růstových rychlostech se ukázalo, že knockdown ClpP, podobně jako knockdown AFG3L2 nemá na rychlost proliferace buněk vliv, zatímco knockdown ClpX ukazuje zpomalenou reakci na nový přísun živin.

Významná část práce byla pak zaměřena na zjištění případné role ClpP v apoptotické dráze. Mitochondrie jsou klíčovou organelou pro průběh apoptózy. Právě z mitochondrií se uvolňuje cytochrom c, který aktivuje kaspázy pomocí APAF komplexu, (Li et al., 1997). Dále bylo zjištěno, že se do mitochondrií dostává protein p53, který pak aktivuje apoptózu i zevnitř (Vaseva et al., 2012). V naší laboratoři bylo již dříve ukázáno, že v přenosu p53 do mitochondriální matrix pomáhá adaptorový protein LACE1 (Cesnekova et al., 2016).

V průběhu výzkumu jsem sledoval změny na úrovni exprese proapoptotických a antiapoptotických proteinů v buňkách s různou expresí ClpP, a indukoval jsem v linii se stabilním knockdownem ClpP apoptózu. Z výsledků je zřejmé, že v důsledku knockdownu ClpP dochází k nárůstu hladiny p53 a p21 na celobuněčné úrovni, stejně jako dochází ke snížení hladiny survivinu. Vazba a stabilizace survivinu prostřednictvím ClpXP komplexu byla popsána v roce 2016 (Seo et al., 2016). Po indukci apoptózy ale mezi ClpP KD linií a kontrolní linií nebyly patrné rozdíly. Proteiny p53 a p21 byly tedy pravděpodobně zvýšeny z důvodu většího buněčného stresu způsobeného vyřazením mitochondriální proteázy, než pro přímou roli ClpP v apoptotické dráze. Současně byla role v přenosu p53 do mitochondrií letos popsána na druhé serinové proteáze mitochondriální matrix, LONP (Sung et al., 2018). Také jsem ukázal, že jednou z příčin snížení hladiny p53 po reintrodukci ClpP v buňce je absence puromycinu v médiu v této fázi experimentu a nikoliv samotná přítomnost ClpP nebo proces transfekce.

Dále jsem sledoval změny na úrovni hladin dalších mitochondriálních proteáz. Zatímco proteázy vnitřní mitochondriální membrány YME1L1, AFG3L2 a OMA1 kopírovali hladinu ClpP (s vlivem jak proteolytické aktivity, tak samotné koncentrace), tak ostatní podjednotky matrixových serinových proteáz, ClpX a LONP, byly po knockdownu ClpP stabilně ve zvýšené hladině, nezávisle na reintrodukcii. Je známo, že mezi jednotlivými proteolytickými komplexy dochází ke kompetici o substráty (Anand et al., 2014) a samozřejmě může docházet i ke vzájemné degradaci.

Hlavní část práce se pak věnovala energetickému metabolismu. Výsledky ukazují, že po downregulaci ClpP došlo k ovlivnění hladiny některých proteinů všech komplexů dýchacího řetězce, zatímco některé proteiny energetického metabolismu, konkrétně SDH A, glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza nebo citrát syntáza ovlivněny nebyly.

Na úrovni aktivit jednotlivých komplexů se pak ukázalo, že nejvýraznější změna proběhla po overexpresi ClpP na komplexu I. Současně změny na úrovni hladiny podjednotek komplexu III ukazují, že se jedná o kandidátní proteiny na substráty ClpXP proteázy.

U SDH B bylo dříve popsáno, že ClpXP proteáza se podílí na jeho správném sbalení a v její nepřítomnosti dochází k hromadění nesbaleného SDH B v mitochondrii (Seo et al., 2016). Naše data oproti tomu ukazují, že v přítomnosti ClpP je celková hladina SDH B v buňce vyšší. To může být jeho stabilizací po assemblaci do komplexu II, díky kterému nedochází tak často k poškození a následnému odbourání SDH B pro něj specifickou proteázou kontroly kvality. Autoři článku také nezaznamenali změny na úrovni hladiny COX 4 podjednotky komplexu IV, zatímco na našich výsledcích byla tato změna patrná, stejně jako byl trend reakce COX 4 na hladinu ClpP doložen po reintrodukcii ClpP v ClpP KD buňkách. Oproti tomu, hladina survivinu ve výsledcích obou prací korelovala s hladinou ClpP. Předchozí neshody ve výsledcích však zatím neumíme plně vysvětlit a jsou tedy podnětem k dalšímu bádání.

Také jsem zaznamenal změny na dalších úrovních - protein mitofusin, podílející se na restrukturalizaci mitochondriální sítě, proteiny účastníci se mitochondriální genové exprese (MRPS 31, TFAM), a také změnu na úrovni mitochondriálního molekulárního chaperonu TRAP1. Změny na úrovni proteinů účastnících se mitochondriální genové exprese jsou pochopitelné z několika důvodů. Jedním je fakt, že TFAM a ClpX leží pravděpodobně v jedné dráze (Kasashima et al., 2012) a současně TFAM v nepřítomnosti ClpP není navázán na DNA

a je odbourán LONP (Lu et al., 2013), přičemž u obou proteáz došlo k ovlivnění. Druhým jevem, který je také zodpovědný za změny v mitochondriální genové expresi je výše zmíněná vazba ERAL1 na mitochondriální ribosom. V nepřítomnosti ClpP není ERAL1 odbourán a inhibuje tak mitochondriální translaci (Szczepanowska et al., 2016). Navzdory těmto změnám jsem ale nezaznamenal jednotný trend mezi mitochondriálně kódovanými proteiny. Zatímco u mt-ND5 dochází ke snížení především po reintrodukci ClpP, u COX 2 došlo po reintrodukci ClpP naopak k silnému nárůstu hladiny. Změny COX 2 kopírují změny ostatních podjednotek komplexu IV dýchacího řetězce, zatímco změna hladiny mt-ND5 jde proti změně druhé sledované podjednotky komplexu I, NDUFB4. Také je třeba přiznat, že pro kvalifikovanou analýzu by bylo vhodné zaznamenat data pro více mitochondriálně kódovaných podjednotek OXPHOS, než jen dvě z celkových třinácti.

Mitofusin je protein, nacházející se ve vnější mitochondriální membráně. Jeho funkcí je fúze mitochondrií, která je nezbytná pro dynamiku mitochondriální sítě. Je známo, že proteáza vnější mitochondriální membrány USP30 ho vede k degradaci (Yue et al., 2014), je ale současně těžké si představit, jak by s ním mohla přímo interagovat matrixová proteáza. Změny na jeho úrovni pravděpodobně souvisí s kvalitou mitochondrií, která se po vyřazení ClpP snižuje.

V situaci zhoršení stavu mitochondrií bychom očekávali zvýšení hladiny proteinů teplotního šoku, kam spadá například chaperon TRAP1. U toho ovšem byla popsána vazba na ClpXP komplex, se kterým spolupracuje (Seo et al., 2016), a i naše výsledky ukazují, že se TRAP1 vyskytuje v buňce společně s ClpP.

6. Závěr

Cílem této práce bylo charakterizovat dopad utišení ClpP na buňky HEK 293 na různých úrovních. Nejprve jsem shrnul současné poznatky o mitochondriálních proteázách přítomných v lidských buňkách s důrazem na podjednotky ClpX a ClpP matrixové proteázy ClpXP. Poté jsem studoval změny na buňkách s postranskripčně utišenou expresí ClpP a následně provedl “rescue“ experiment, kde jsem ClpP v buňkách s utišenou expresí reintrodukoval. Pro srovnání jsem buňky s utišeným ClpP transfekoval také proteolyticky mutantní, neaktivní formou ClpP^{S153A}. Bylo patrné, že většina změn souvisí přímo s proteolytickou aktivitou ClpP. Hypotézu o roli ClpP v mitochondriální části apoptotické dráhy mé výsledky nepotvrdili. Naopak se zdá, že na rozdíl od druhé serinové proteázy LONP, nemá peptidázová podjednotka ClpP v regulaci apoptotické dráhy významnou roli. Oproti tomu jsem v nepřítomnosti ClpP pozoroval změny hladiny jednotlivých podjednotek všech pěti komplexů dýchacího řetězce, což podporuje současnou hypotézu, že ClpP slouží jako důležitý protein kontroly kvality mitochondriálních proteinů a jeho nepřítomnost má na buňky negativní dopad. Současně výsledky ukazují, že ClpP má důležitou roli i v regulaci mitochondriální transkripce, protože ovlivňuje hned několik proteinů mitochondriálního transkripčního aparátu. Také jsem našel některé kandidátní proteiny na substráty ClpXP proteázy a pomocí koimunoprecipitace připravil vzorky, jejichž studium bude součástí pokračování výzkumu.

Reference:

- Ahmed, S., Jelani, M., Alrayes, N., Mohamoud, H.S.A., Almramhi, M.M., Anshasi, W., Ahmed, N.A.B., Wang, J., Nasir, J., and Al-Aama, J.Y. (2015). Exome analysis identified a novel missense mutation in the CLPP gene in a consanguineous Saudi family expanding the clinical spectrum of Perrault Syndrome type-3. *J. Neurol. Sci.* 353, 149–154.
- Aldridge, J.E., Horibe, T., and Hoogenraad, N.J. (2007). Discovery of Genes Activated by the Mitochondrial Unfolded Protein Response (mtUPR) and Cognate Promoter Elements. *PLoS ONE* 2.
- Al-Furoukh, N., Ianni, A., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., Wanrooij, S., and Braun, T. (2015). ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPR_{mt}) in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 2580–2591.
- Alikhani, N., Berglund, A.-K., Engmann, T., Spänning, E., Vögtle, F.-N., Pavlov, P., Meisinger, C., Langer, T., and Glaser, E. (2011). Targeting Capacity and Conservation of PreP Homologues Localization in Mitochondria of Different Species. *J. Mol. Biol.* 410, 400–410.
- Altmann, R. (1890). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen* (Leipzig: Veit).
- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* 204, 919–929.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Archibald, J.M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr. Biol.* 25, R911–R921.

- Aubin-Tam, M.-E., Olivares, A.O., Sauer, R.T., Baker, T.A., and Lang, M.J. (2011). Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine. *Cell* *145*, 257–267.
- Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2012). ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 15–28.
- Barelli, H., Vincent, J.-P., and Checler, F. Rat kidney endopeptidase 24.16. *Eur. J. Biochem.* *211*, 79–90.
- Bayot, A., Gareil, M., Chavatte, L., Hamon, M.-P., L'Hermitte-Stead, C., Beaumatin, F., Priault, M., Rustin, P., Lombès, A., Friguet, B., et al. (2014). Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. *Biochimie* *100*, 38–47.
- Bernstein, S.H., Venkatesh, S., Li, M., Lee, J., Lu, B., Hilchey, S.P., Morse, K.M., Metcalfe, H.M., Skalska, J., Andreeff, M., et al. (2012). The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives. *Blood* *119*, 3321–3329.
- Bertelsen, B., Melchior, L., Jensen, L.R., Groth, C., Glenthøj, B., Rizzo, R., Debes, N.M., Skov, L., Brøndum-Nielsen, K., Paschou, P., et al. (2014). Intragenic deletions affecting two alternative transcripts of the *IMMP2L* gene in patients with Tourette syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* *22*, 1283–1289.
- Boczonadi, V., and Horvath, R. (2016). Amyloid- β in mitochondrial disease: mutation in a human metallopeptidase links amyloidotic neurodegeneration with mitochondrial processing. *EMBO Mol. Med.* *8*, 173–175.
- Bohovych, I., Fernandez, M.R., Rahn, J.J., Stackley, K.D., Bestman, J.E., Anandhan, A., Franco, R., Claypool, S.M., Lewis, R.E., Chan, S.S.L., et al. (2015). Metalloprotease OMA1 Fine-tunes Mitochondrial Bioenergetic Function and Respiratory Supercomplex Stability. *Sci. Rep.* *5*.

- Bross, P., Andresen, B.S., Knudsen, I., Kruse, T.A., and Gregersen, N. (1995). Human ClpP protease: cDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal assignment of the gene. *FEBS Lett.* 377, 249–252.
- Buczek, M.S., Cardenas Arevalo, A.L., and Janakiraman, A. (2016). ClpXP and ClpAP control the Escherichia coli division protein ZapC by proteolysis. *Microbiology* 162, 909–920.
- Carvalho, D.S., Andrade, R.F.S., Pinho, S.T.R., Góes-Neto, A., Lobão, T.C.P., Bomfim, G.C., and El-Hani, C.N. (2015). What are the Evolutionary Origins of Mitochondria? A Complex Network Approach. *PLoS ONE* 10.
- Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., et al. (1998). Spastic Paraplegia and OXPHOS Impairment Caused by Mutations in Paraplegin, a Nuclear-Encoded Mitochondrial Metalloprotease. *Cell* 93, 973–983.
- Cavalcanti, D.M.L.P., Castro, L.M., Rosa Neto, J.C., Seelaender, M., Neves, R.X., Oliveira, V., Forti, F.L., Iwai, L.K., Gozzo, F.C., Todiras, M., et al. (2014). Neurolysin Knockout Mice Generation and Initial Phenotype Characterization. *J. Biol. Chem.* 289, 15426–15440.
- Cesnekova, J., Spacilova, J., Hansikova, H., Houstek, J., Zeman, J., and Stiburek, L. (2016). LACE1 interacts with p53 and mediates its mitochondrial translocation and apoptosis. *Oncotarget* 7, 47687–47698.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* 138, 628–644.
- Chao, J.-R., Parganas, E., Boyd, K., Hong, C.Y., Opferman, J.T., and Ihle, J.N. (2008). Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature* 452, 98–102.

- Chen, X., Valkenburgh, C.V., Fang, H., and Green, N. (1999). Signal Peptides Having Standard and Nonstandard Cleavage Sites Can Be Processed by Imp1p of the Mitochondrial Inner Membrane Protease. *J. Biol. Chem.* *274*, 37750–37754.
- Cheng, C.-W., Kuo, C.-Y., Fan, C.-C., Fang, W.-C., Jiang, S.S., Lo, Y.-K., Wang, T.-Y., Kao, M.-C., and Lee, A.Y.-L. (2013). Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* *4*, e681.
- Choi, K.-H., and Licht, S. (2005). Control of peptide product sizes by the energy-dependent protease ClpAP. *Biochemistry* *44*, 13921–13931.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., et al. (2006). Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling. *Cell* *126*, 163–175.
- Cole, A., Wang, Z., Coyaud, E., Voisin, V., Gronda, M., Jitkova, Y., Mattson, R., Hurren, R., Babovic, S., Maclean, N., et al. (2015). Inhibition of the mitochondrial protease, ClpP, as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *27*, 864–876.
- Corydon, T.J., Wilsbech, M., Jespersgaard, C., Andresen, B.S., Borglum, A.D., Pedersen, S., Bolund, L., Gregersen, N., and Bross, P. (2000). Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial ClpX. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* *11*, 899–905.
- Dursun, F., Mohamoud, H.S.A., Karim, N., Naeem, M., Jelani, M., and Kırmızıbekmez, H. (2016). A Novel Missense Mutation in the CLPP Gene Causing Perrault Syndrome Type 3 in a Turkish Family. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* *8*, 472–477.
- Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.-C., Westermann, B., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2009). Regulation of OPA1 processing and

- mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.* *187*, 1023–1036.
- El Yacoubi, B., Hatin, I., Deutsch, C., Kahveci, T., Rousset, J.-P., Iwata-Reuyl, D., G Murzin, A., and de Crécy-Lagard, V. (2011). A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *EMBO J.* *30*, 882–893.
- Eldomery, M.K., Akdemir, Z.C., Vögtle, F.-N., Charng, W.-L., Mulica, P., Rosenfeld, J.A., Gambin, T., Gu, S., Burrage, L.C., Al Shamsi, A., et al. (2016). MIPEP recessive variants cause a syndrome of left ventricular non-compaction, hypotonia, and infantile death. *Genome Med.* *8*.
- Fischer, F., Weil, A., Hamann, A., and Osiewacz, H.D. (2013). Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal ClpP deletion strain. *Nat. Commun.* *4*, 1397.
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S.-C., Tomii, K., Horton, P., and Imai, K. (2015). MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *14*, 1113–1126.
- Gibellini, L., Pinti, M., Boraldi, F., Giorgio, V., Bernardi, P., Bartolomeo, R., Nasi, M., De Biasi, S., Missiroli, S., Carnevale, G., et al. (2014). Silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in colon cancer cells. *FASEB J.* *28*, 5122–5135.
- Gimelli, S., Capra, V., Di Rocco, M., Leoni, M., Mirabelli-Badenier, M., Schiaffino, M.C., Fiorio, P., Cuoco, C., Gimelli, G., and Tassano, E. (2014). Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting IMMP2L gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Mol. Cytogenet.* *7*, 54.
- Gispert, S., Parganlija, D., Klinkenberg, M., Dröse, S., Wittig, I., Mittelbronn, M., Grzmil, P., Koob, S., Hamann, A., Walter, M., et al. (2013). Loss of mitochondrial peptidase Clpp

- leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4871–4887.
- Glynn, S.E., Martin, A., Nager, A.R., Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2009). Crystal structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine. *Cell* 139, 744–756.
- Goo, H.-G., Jung, M.K., Han, S.S., Rhim, H., and Kang, S. (2013). HtrA2/Omi deficiency causes damage and mutation of mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 1866–1875.
- Gottschalk, M.E., Coker, S.B., and Fox, L.A. (1996). Neurologic anomalies of Perrault syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 65, 274–276.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2, reviews1018.1-reviews1018.5.
- Hansen, J., Gregersen, N., and Bross, P. (2005). Differential degradation of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase by the protein quality control proteases Lon and ClpXP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1160–1170.
- Haynes, C.M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y., and Ron, D. (2007). ClpP Mediates Activation of a Mitochondrial Unfolded Protein Response in *C. elegans*. *Dev. Cell* 13, 467–480.
- Ieva, R., Heißwolf, A.K., Gebert, M., Vögtle, F.-N., Wollweber, F., Mehnert, C.S., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., Meisinger, C., Laan, M. van der, et al. (2013). Mitochondrial inner membrane protease promotes assembly of presequence translocase by removing a carboxy-terminal targeting sequence. *Nat. Commun.* 4, 2853.
- Inoue, M., Kamada, H., Abe, Y., Higashisaka, K., Nagano, K., Mukai, Y., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., and Tsunoda, S. (2015). Aminopeptidase P3, a new member of the TNF–

- TNFR2 signaling complex, induces phosphorylation of JNK1 and JNK2. *J Cell Sci* *128*, 656–669.
- Isaya, G., Kalousek, F., and Rosenberg, L.E. (1992). Amino-terminal octapeptides function as recognition signals for the mitochondrial intermediate peptidase. *J. Biol. Chem.* *267*, 7904–7910.
- Jenkinson, E.M., Rehman, A.U., Walsh, T., Clayton-Smith, J., Lee, K., Morell, R.J., Drummond, M.C., Khan, S.N., Naeem, M.A., Rauf, B., et al. (2013). Perrault Syndrome Is Caused by Recessive Mutations in CLPP, Encoding a Mitochondrial ATP-Dependent Chambered Protease. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 605–613.
- Jiang, X., Jiang, H., Shen, Z., and Wang, X. (2014). Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 14782–14787.
- Kang, S.G., Ortega, J., Singh, S.K., Wang, N., Huang, N., Steven, A.C., and Maurizi, M.R. (2002). Functional Proteolytic Complexes of the Human Mitochondrial ATP-dependent Protease, hClpXP. *J. Biol. Chem.* *277*, 21095–21102.
- Kang, S.G., Dimitrova, M.N., Ortega, J., Ginsburg, A., and Maurizi, M.R. (2005). Human Mitochondrial ClpP Is a Stable Heptamer That Assembles into a Tetradecamer in the Presence of ClpX. *J. Biol. Chem.* *280*, 35424–35432.
- Kardon, J.R., Yien, Y.Y., Huston, N.C., Branco, D.S., Hildick-Smith, G.J., Rhee, K.Y., Paw, B.H., and Baker, T.A. (2015). Mitochondrial ClpX activates a key enzyme for heme biosynthesis and erythropoiesis. *Cell* *161*, 858–867.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S.C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L.D., Herman, E.K., et al. (2016). A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. *Curr. Biol.* *26*, 1274–1284.

- Kasashima, K., Sumitani, M., and Endo, H. (2012). Maintenance of mitochondrial genome distribution by mitochondrial AAA+ protein ClpX. *Exp. Cell Res.* *318*, 2335–2343.
- Keckesova, Z., Donaher, J.L., Cock, J.D., Freinkman, E., Lingrell, S., Bachovchin, D.A., Bieri, B., Tischler, V., Noske, A., Okondo, M.C., et al. (2017). LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state. *Nature* *543*, 681–686.
- Kenniston, J.A., Baker, T.A., Fernandez, J.M., and Sauer, R.T. (2003). Linkage between ATP Consumption and Mechanical Unfolding during the Protein Processing Reactions of an AAA+ Degradation Machine. *Cell* *114*, 511–520.
- Kenniston, J.A., Burton, R.E., Siddiqui, S.M., Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2004). Effects of local protein stability and the geometric position of the substrate degradation tag on the efficiency of ClpXP denaturation and degradation. *J. Struct. Biol.* *146*, 130–140.
- Kim, Y.-I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2001). Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *8*, 230–233.
- Kita, K., Suzuki, T., and Ochi, T. (2012). Diphenylarsinic Acid Promotes Degradation of Glutaminase C by Mitochondrial Lon Protease. *J. Biol. Chem.* *287*, 18163–18172.
- Kobayashi, M., Takeda, K., Narita, T., Nagai, K., Okita, N., Sudo, Y., Miura, Y., Tsumoto, H., Nakagawa, Y., Shimano, H., et al. (2017). Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction. *Febs Lett.* *591*, 4067–4073.
- Koppen, M., Metodiev, M.D., Casari, G., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2007). Variable and Tissue-Specific Subunit Composition of Mitochondrial m-AAA Protease Complexes Linked to Hereditary Spastic Paraplegia. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 758–767.
- Kubota, Y., Nomura, K., Katoh, Y., Yamashita, R., Kaneko, K., and Furuyama, K. (2016). Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component

- of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *291*, 20516–20529.
- Lee, E.J., Kang, Y.C., Park, W.-H., Jeong, J.H., and Pak, Y.K. (2014). Negative transcriptional regulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) by nuclear TFAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *450*, 166–171.
- Lee, S.-F., Srinivasan, B., Sephton, C.F., Dries, D.R., Wang, B., Yu, C., Wang, Y., Dewey, C.M., Shah, S., Jiang, J., et al. (2011). γ -Secretase-regulated Proteolysis of the Notch Receptor by Mitochondrial Intermediate Peptidase. *J. Biol. Chem.* *286*, 27447–27453.
- Lemberg, M.K., Menendez, J., Misik, A., Garcia, M., Koth, C.M., and Freeman, M. (2005). Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases. *EMBO J.* *24*, 464–472.
- Leszczyniecka, M., Bhatia, U., Cueto, M., Nirmala, N.R., Towbin, H., Vattay, A., Wang, B., Zabudoff, S., and Phillips, P.E. (2006). MAP1D, a novel methionine aminopeptidase family member is overexpressed in colon cancer. *Oncogene* *25*, 3471–3478.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1823*, 1491–1508.
- Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovičová, G., Kutejová, E., and Suzuki, C.K. (2004). DNA and RNA Binding by the Mitochondrial Lon Protease Is Regulated by Nucleotide and Protein Substrate. *J. Biol. Chem.* *279*, 13902–13910.
- Logan, D.C. (2006). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* *57*, 1225–1243.

- Loughery, J., Cox, M., Smith, L.M., and Meek, D.W. (2014). Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res.* *42*, 7666–7680.
- Lowth, B.R., Kirstein-Miles, J., Saiyed, T., Brötz-Oesterhelt, H., Morimoto, R.I., Truscott, K.N., and Dougan, D.A. (2012). Substrate recognition and processing by a Walker B mutant of the human mitochondrial AAA+ protein CLPX. *J. Struct. Biol.* *179*, 193–201.
- Lu, B., Poirier, C., Gaspar, T., Gratzke, C., Harrison, W., Busija, D., Matzuk, M.M., Andersson, K.-E., Overbeek, P.A., and Bishop, C.E. (2008). A Mutation in the Inner Mitochondrial Membrane Peptidase 2-Like Gene (*Imp2l*) Affects Mitochondrial Function and Impairs Fertility in Mice. *Biol. Reprod.* *78*, 601–610.
- Lu, B., Lee, J., Nie, X., Li, M., Morozov, Y.I., Venkatesh, S., Bogenhagen, D.F., Temiakov, D., and Suzuki, C.K. (2013). Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol. Cell* *49*, 121–132.
- Marcassa, E., Kallinos, A., Jardine, J., Rusilowicz-Jones, E.V., Martinez, A., Kuehl, S., Islinger, M., Clague, M.J., and Urbé, S. (2018). Dual role of USP30 in controlling basal pexophagy and mitophagy. *EMBO Rep.* *19*.
- Marcondes, M.F.M., Alves, F.M., Assis, D.M., Hirata, I.Y., Juliano, L., Oliveira, V., and Juliano, M.A. (2015). Substrate specificity of mitochondrial intermediate peptidase analysed by a support-bound peptide library. *FEBS Open Bio* *5*, 429–436.
- Matsushima, Y., and Kaguni, L.S. (2012). Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 1080–1087.
- Matsushima, Y., Goto, Y., and Kaguni, L.S. (2010). Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of

- mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18410–18415.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* *19*, 630–641.
- Mossmann, D., Vögtle, F.-N., Taskin, A.A., Teixeira, P.F., Ring, J., Burkhart, J.M., Burger, N., Pinho, C.M., Tadic, J., Loreth, D., et al. (2014). Amyloid- β Peptide Induces Mitochondrial Dysfunction by Inhibition of Preprotein Maturation. *Cell Metab.* *20*, 662–669.
- Nicholls, D.G., and Lindberg, O. Brown-Adipose-Tissue Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* *37*, 523–530.
- Nie, X., Li, M., Lu, B., Zhang, Y., Lan, L., Chen, L., and Lu, J. (2013). Down-Regulating Overexpressed Human Lon in Cervical Cancer Suppresses Cell Proliferation and Bioenergetics. *PLoS ONE* *8*.
- Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2005). The m-AAA Protease Defective in Hereditary Spastic Paraplegia Controls Ribosome Assembly in Mitochondria. *Cell* *123*, 277–289.
- Oberto, J., Breuil, N., Hecker, A., Farina, F., Brochier-Armanet, C., Culetto, E., and Forterre, P. (2009). Qri7/OSGEPL, the mitochondrial version of the universal Kae1/YgjD protein, is essential for mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res.* *37*, 5343–5352.
- Ołdak, M., Oziębło, D., Pollak, A., Stępnia, I., Lazniewski, M., Lechowicz, U., Kochanek, K., Furmanek, M., Tacikowska, G., Plewczynski, D., et al. (2017). Novel neuro-audiological findings and further evidence for TWNK involvement in Perrault syndrome. *J. Transl. Med.* *15*.

- Osman, C., Wilmes, C., Tatsuta, T., and Langer, T. (2007). Prohibitins Interact Genetically with Atp23, a Novel Processing Peptidase and Chaperone for the F1F0-ATP Synthase. *Mol. Biol. Cell* 18, 627–635.
- O'Toole, J.F., Liu, Y., Davis, E.E., Westlake, C.J., Attanasio, M., Otto, E.A., Seelow, D., Nurnberg, G., Becker, C., Nuutinen, M., et al. (2010). Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J. Clin. Invest.* 120, 791–802.
- Petek, E., Schwarzbraun, T., Noor, A., Patel, M., Nakabayashi, K., Choufani, S., Windpassinger, C., Stamenkovic, M., Robertson, M.M., Aschauer, H.N., et al. (2007). Molecular and genomic studies of *IMMP2L* and mutation screening in autism and Tourette syndrome. *Mol. Genet. Genomics* 277, 71–81.
- Pierce, S.B., Walsh, T., Chisholm, K.M., Lee, M.K., Thornton, A.M., Fiumara, A., Opitz, J.M., Levy-Lahad, E., Klevit, R.E., and King, M.-C. (2010). Mutations in the DBP-Deficiency Protein HSD17B4 Cause Ovarian Dysgenesis, Hearing Loss, and Ataxia of Perrault Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 282–288.
- Pierce, S.B., Chisholm, K.M., Lynch, E.D., Lee, M.K., Walsh, T., Opitz, J.M., Li, W., Klevit, R.E., and King, M.-C. (2011). Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6543–6548.
- Plun-Favreau, H., Burchell, V.S., Holmström, K.M., Yao, Z., Deas, E., Cain, K., Fedele, V., Moiso, N., Campanella, M., Miguel Martins, L., et al. (2012). HtrA2 deficiency causes mitochondrial uncoupling through the F1F0-ATP synthase and consequent ATP depletion. *Cell Death Dis.* 3, e335.

- Polianskyte, Z., Peitsaro, N., Dapkunas, A., Liobikas, J., Soliymani, R., Lalowski, M., Speer, O., Seitsonen, J., Butcher, S., Cereghetti, G.M., et al. (2009). LACTB is a filament-forming protein localized in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18960–18965.
- Pryde, K.R., Taanman, J.W., and Schapira, A.H. (2016). A LON-ClpP Proteolytic Axis Degrades Complex I to Extinguish ROS Production in Depolarized Mitochondria. *Cell Rep.* *17*, 2522–2531.
- Quirós, P.M., Langer, T., and López-Otín, C. (2015). New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 345–359.
- Randhawa, H., Chikara, S., Gehring, D., Yildirim, T., Menon, J., and Reindl, K.M. (2013). Overexpression of peptide deformylase in breast, colon, and lung cancers. *BMC Cancer* *13*, 321.
- Rashid, M., Wangler, N.J., Yang, L., Shah, K., Arumugam, T.V., Abbruscato, T.J., and Karamyan, V.T. Functional up-regulation of endopeptidase neurolysin during post-acute and early recovery phases of experimental stroke in mouse brain. *J. Neurochem.* *129*, 179–189.
- Repsold, L., and Joubert, A.M. (2018). Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *BioMed Res. Int.* *2018*.
- Rivadeneira, D.B., Caino, M.C., Seo, J.H., Angelin, A., Wallace, D.C., Languino, L.R., and Altieri, D.C. (2015). Survivin promotes oxidative phosphorylation, subcellular mitochondrial repositioning, and tumor cell invasion. *Sci. Signal.* *8*, ra80.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* *14*, 255–274.
- de Sagarra, M.R., Mayo, I., Marco, S., Rodríguez-Vilariño, S., Oliva, J., Carrascosa, J.L., and Castaño, J.G. (1999). Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP11 Edited by W. Baumeister. *J. Mol. Biol.* *292*, 819–825.

- Sanjuán Szklarz, L.K., and Scorrano, L. (2012). The antiapoptotic OPA1/Parl couple participates in mitochondrial adaptation to heat shock. *Biochim. Biophys. Acta* *1817*, 1886–1893.
- Santagata, S., Bhattacharyya, D., Wang, F.-H., Singha, N., Hodtsev, A., and Spanopoulou, E. (1999). Molecular Cloning and Characterization of a Mouse Homolog of Bacterial ClpX, a Novel Mammalian Class II Member of the Hsp100/Clp Chaperone Family. *J. Biol. Chem.* *274*, 16311–16319.
- Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., et al. (2004). Sculpting the Proteome with AAA+ Proteases and Disassembly Machines. *Cell* *119*, 9–18.
- Scarpulla, R.C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* *97*, 673–683.
- Seiferling, D., Szczepanowska, K., Becker, C., Senft, K., Hermans, S., Maiti, P., König, T., Kukat, A., and Trifunovic, A. (2016). Loss of CLPP alleviates mitochondrial cardiomyopathy without affecting the mammalian UPR mt. *EMBO Rep.* *17*, 953–964.
- Seirafi, M., Kozlov, G., and Gehring, K. (2015). Parkin structure and function. *Febs J.* *282*, 2076–2088.
- Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., et al. (2012). Rhomboid Protease PARL Mediates the Mitochondrial Membrane Potential Loss-induced Cleavage of PGAM5. *J. Biol. Chem.* *287*, 34635–34645.
- Selivanov, V.A., Votyakova, T.V., Pivtoraiko, V.N., Zeak, J., Sukhomlin, T., Trucco, M., Roca, J., and Cascante, M. (2011). Reactive Oxygen Species Production by Forward and Reverse Electron Fluxes in the Mitochondrial Respiratory Chain. *PLoS Comput. Biol.* *7*.

- Seo, J.H., Rivadeneira, D.B., Caino, M.C., Chae, Y.C., Speicher, D.W., Tang, H.-Y., Vaira, V., Bosari, S., Palleschi, A., Rampini, P., et al. (2016). The Mitochondrial Unfoldase-Peptidase Complex ClpXP Controls Bioenergetics Stress and Metastasis. *PLoS Biol.* *14*.
- Serero, A., Giglione, C., Sardini, A., Martinez-Sanz, J., and Meinnel, T. (2003). An Unusual Peptide Deformylase Features in the Human Mitochondrial N-terminal Methionine Excision Pathway. *J. Biol. Chem.* *278*, 52953–52963.
- Serizawa, A., Dando, P.M., and Barrett, A.J. (1995). Characterization of a Mitochondrial Metallopeptidase Reveals Neurolysin as a Homologue of Thimet Oligopeptidase. *J. Biol. Chem.* *270*, 2092–2098.
- Shi, G., Lee, J.R., Grimes, D.A., Racacho, L., Ye, D., Yang, H., Ross, O.A., Farrer, M., McQuibban, G.A., and Bulman, D.E. (2011). Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1966–1974.
- Singh, R., Jamdar, S.N., Goyal, V.D., Kumar, A., Ghosh, B., and Makde, R.D. (2017). Structure of the human aminopeptidase XPNPEP3 and comparison of its in vitro activity with Icp55 orthologs: Insights into diverse cellular processes. *J. Biol. Chem.* *292*, 10035–10047.
- Smith-Carpenter, J.E., and Alper, B.J. (2018). Functional requirement for human pitrilysin metallopeptidase 1 arginine 183, mutated in amyloidogenic neuropathy. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *27*, 861–873.
- Soldà, G., Caccia, S., Robusto, M., Chiereghin, C., Castorina, P., Ambrosetti, U., Duga, S., and Asselta, R. (2016). First Independent Replication of the Involvement of LARS2 in Perrault Syndrome by Whole-Exome Sequencing of an Italian Family. *J. Hum. Genet.* *61*, 295–300.
- Stiburek, L., Cesnekova, J., Kostkova, O., Fornuskova, D., Vinsova, K., Wenchich, L., Houstek, J., and Zeman, J. (2012). YME1L controls the accumulation of respiratory chain

- subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* 23, 1010–1023.
- Strauss, K.A., Jinks, R.N., Puffenberger, E.G., Venkatesh, S., Singh, K., Cheng, I., Mikita, N., Thilagavathi, J., Lee, J., Sarafianos, S., et al. (2015). CODAS Syndrome Is Associated with Mutations of LONP1, Encoding Mitochondrial AAA+ Lon Protease. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 121–135.
- Sung, Y.-J., Kao, T.-Y., Kuo, C.-L., Fan, C.-C., Cheng, A.N., Fang, W.-C., Chou, H.-Y., Lo, Y.-K., Chen, C.-H., Jiang, S.S., et al. (2018). Mitochondrial Lon sequesters and stabilizes p53 in the matrix to restrain apoptosis under oxidative stress via its chaperone activity. *Cell Death Dis.* 9.
- Szczepanowska, K., Maiti, P., Kukat, A., Hofsetz, E., Nolte, H., Senft, K., Becker, C., Ruzzenente, B., Hornig-Do, H., Wibom, R., et al. (2016). CLPP coordinates mitoribosomal assembly through the regulation of ERAL1 levels. *EMBO J.* 35, 2566–2583.
- Tian, Q., Li, T., Hou, W., Zheng, J., Schrum, L.W., and Bonkovsky, H.L. (2011). Lon Peptidase 1 (LONP1)-dependent Breakdown of Mitochondrial 5-Aminolevulinic Acid Synthase Protein by Heme in Human Liver Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 26424–26430.
- Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149, 1536–1548.
- Verhagen, A.M., Coulson, E.J., and Vaux, D.L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* 2, reviews3009.1-reviews3009.10.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., et al. (2002). HtrA2 Promotes Cell Death through Its Serine Protease Activity and Its Ability to Antagonize Inhibitor of Apoptosis Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 445–454.

- Verhagen, A.M., Kratina, T.K., Hawkins, C.J., Silke, J., Ekert, P.G., and Vaux, D.L. (2007). Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ.* *14*, 348–357.
- Vögtle, F.-N., Wortelkamp, S., Zahedi, R.P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., et al. (2009). Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell* *139*, 428–439.
- Vögtle, F.-N., Prinz, C., Kellermann, J., Lottspeich, F., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2011). Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2135–2143.
- Vögtle, F.-N., Brändl, B., Larson, A., Pendziwiat, M., Friederich, M.W., White, S.M., Basinger, A., Kücükköse, C., Muhle, H., Jähn, J.A., et al. (2018). Mutations in PMPCB Encoding the Catalytic Subunit of the Mitochondrial Presequence Protease Cause Neurodegeneration in Early Childhood. *Am. J. Hum. Genet.* *102*, 557–573.
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., and Wang, X. (2012). The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 Functions at the Convergence Point of Multiple Necrotic Death Pathways. *Cell* *148*, 228–243.
- Williams, B., Bhat, N., Chien, P., and Shapiro, L. (2014). ClpXP and ClpAP proteolytic activity on divisome substrates is differentially regulated following the *Caulobacter* asymmetric cell division. *Mol. Microbiol.* *93*, 853–866.
- Yamauchi, S., Hou, Y.Y., Guo, A.K., Hirata, H., Nakajima, W., Yip, A.K., Yu, C., Harada, I., Chiam, K.-H., Sawada, Y., et al. (2014). p53-mediated activation of the mitochondrial protease HtrA2/Omi prevents cell invasion. *J. Cell Biol.* *204*, 1191–1207.
- Yien, Y.Y., Ducamp, S., van der Vorm, L.N., Kardon, J.R., Manceau, H., Kannengiesser, C., Bergonia, H.A., Kafina, M.D., Karim, Z., Gouya, L., et al. (2017). Mutation in human

- CLPX elevates levels of δ -aminolevulinic synthase and protoporphyrin IX to promote erythropoietic protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E8045–E8052.
- Yue, W., Chen, Z., Liu, H., Yan, C., Chen, M., Feng, D., Yan, C., Wu, H., Du, L., Wang, Y., et al. (2014). A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. *Cell Res.* *24*, 482–496.
- Zeng, X., Neupert, W., and Tzagoloff, A. (2007). The Metalloprotease Encoded by ATP23 Has a Dual Function in Processing and Assembly of Subunit 6 of Mitochondrial ATPase. *Mol. Biol. Cell* *18*, 617–626.
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I.V., Stasinopoulos, S., Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* *21*, 4411–4419.