

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

**Charakterizace signálních peptidů
mitochondriálního typu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracoval: Bc. Tomáš Kučera

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.

Studijní obor: Biochemie

Praha 2008

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Praze dne 2. května 2008

.....
Tomáš Kučera

Tomáš Kučera

Mé poděkování je směrováno Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. nejen za odborné vedení a za možnost vypracovat tuto diplomovou práci v Laboratoři biologie sekundárních metabolitů MBÚ AV, ale též za velmi přátelský přístup.

Dále děkuji Ing. Anně Matuškové za odborné vedení, cenné rady i připomínky a zvláště pak za trpělivost a ochotu kdykoli a znova poradit. Též děkuji všem členům naší laboratoře za velmi přátelské pracovní prostředí.

Děkuji Doc. RNDr. Michalu Otyepkovi, PhD. za možnost stáže na katedře Fyzikální chemie PřF Univerzity Palackého v Olomoci a za velmi přátelský přístup.

Děkuji Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za záštitu, kterou mi poskytla.

Zvláštní poděkování pak patří mým rodičům, kteří mne vždy ve všem podporovali a umožnili celé studium.

Děkuji všem.

O B S A H

SOUHRN	7
SUMMARY	8
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Vznik eukaryotní buňky	10
2.1.1 Vodíková hypotéza	11
2.1.2 Syntrofická hypotéza	12
2.1.3 Ox-tox hypotéza	13
2.2 Organely mitochondriálního typu	14
2.2.1 Mitochondrie	14
2.2.2 Hydrogenosomy	15
2.3 Transport proteinů do mitochondrie	17
2.3.1 Kotranslační transport	17
2.3.2 Posttranslační transport	17
2.3.3 Signální sekvence substrátů	19
2.3.1.1 Primární struktura	20
2.3.1.2 Sekundární struktura	21
2.4 Signální peptidasy mitochondriálního typu	23
2.4.1 Mitochondriální „processing“ peptidasa	23
2.4.1.1 $\alpha\beta$ -dimer	23
2.4.1.2 β -podjednotka	24
2.4.1.3 α -podjednotka	26
2.4.1.4 Evoluční souvislosti	27
2.4.1.5 Mechanismus funkce	28
2.4.2 Hydrogenosomální „processing“ peptidasa	30
3. CÍLE PRÁCE	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1 Materiály	33
4.1.1 Bakteriální kmeny	33
4.1.2 Kvasinkové kmeny	33
4.1.3 Vektory	33
4.1.4 Chemikálie	35
4.1.5 Enzymy	36

4.1.6	Pufry a roztoky	36
4.1.7	Kultivační média a agary	38
4.1.8	Komerční soupravy	39
4.1.9	Software	40
4.2	Metody	41
4.2.1	Práce s buňkami	41
4.2.1.1	Kultivace <i>E. coli</i>	41
4.2.1.2	Kultivace <i>S. cerevisiae</i>	41
4.2.1.3	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	41
4.2.1.4	Příprava kompetentních buněk <i>S. cerevisiae</i>	42
4.2.1.5	Transformace buněk <i>E. coli</i>	42
4.2.1.6	Transformace buněk <i>S. cerevisiae</i>	43
4.2.2	Práce s DNA	44
4.2.2.1	Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	44
4.2.2.2	Enzymové úpravy DNA	45
4.2.2.3	Agarosová elektroforéza DNA	45
4.2.3	Práce s proteiny	46
4.2.3.1	Heterologní exprese proteinů	46
4.2.3.2	Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)	47
4.2.3.3	Purifikace proteinů z inkluzních tělisek	47
4.2.3.4	Spojení podjednotek α- a β-HPP	48
4.2.3.5	Metalloafinitní purifikace proteinů	48
4.2.3.6	Gelová chromatografie	48
4.2.3.7	Stanovení aktivity HPP	49
4.2.3.8	Stanovení stability	49
4.2.4	Kvasinkový dvouhybridový systém	49
4.2.4.1	Testování interakcí	51
4.2.5	Molekulární dynamika	53
4.2.5.1	Stavba výchozího modelu	53
4.2.5.2	Volná dynamika	54
4.2.5.3	Cílená dynamika	54
5.	VÝSLEDKY A DIKUSE	55
5.1	Výsledky	55
5.1.1	Příprava a funkční testování prekurzoru AK	55
5.1.1.1	Příprava expresního konstruktu	55

5.1.1.2	Produkce prekurzoru AK	56
5.1.1.3	Metaloafinitní purifikace prekurzoru AK	57
5.1.1.4	Odsolení prekurzoru AK	58
5.1.1.5	Stanovení stability prekurzoru AK	58
5.1.2	Hydrogenosomální „processing“ peptidasa	59
5.1.2.1	Renaturace HPP z inkluzních tělisek	59
5.1.2.2	Purifikace HPP v nativní formě	60
5.1.2.3	Stanovení stability HPP	62
5.1.2.4	Stanovení podmínek aktivity HPP	62
5.1.3	Kvasinkový dvouhybridový systém	66
5.1.3.1	Příprava plazmidových konstruktů	66
5.1.3.2	Testování interakcí podjednotek MPP a HPP	
		67
5.1.4	Mitochondriální „processing“ peptidasa	69
5.1.4.1	Volná dynamika výchozího modelu MPP	
		69
5.1.4.2	Translokace substrátu do aktivního centra MPP	
		71
5.1.4.3	Volná dynamika po proteolýze substrátu v aktivním centru MPP	
		73
5.2	Diskuse	76
6.	ZÁVĚR	81
7.	SEZNAM LITERATURY	82
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	88
9.	PŘÍLOHY	89
8.1	Molekulární dynamika	89
8.2	Programy	89
8.3	Seznam literatury pro EndNote	89

S O U H R N

Mitochondriální „processing“ peptidasa (MPP) je heterodimerní (α -, β -MPP) signální metalopeptidasa, která hraje klíčovou roli během importu proteinových prekurzorů do mitochondrie, kdy rozeznává a odštěpuje signální sekvence importovaných proteinů. Zde byla charakterizována nová signální peptidasa mitochondriálního typu - hydrogesomální „processing“ peptidasa (HPP) z hydrogenosomů *Trichomonas vaginalis*. Hydrogenosomy jsou velmi redukované formy mitochondrií nacházející se v různých intracelulárních parazitech a mikroaerofilních eukaryotech. Bylo ukázáno, že HPP je aktivní jako $\alpha\beta$ -dimer, podobně jako MPP, a nikoli jako samotná β -podjednotka, jak bylo publikováno autory Brown a kol [100].

Zatímco β -MPP plní funkci katalytickou, tak α -MPP funkci regulační. Glycinová smyčka α -podjednotky (GRL) obsahuje mezi nejrůznějšími organismy téměř absolutně konzervovanou sekvenci aminokyselin a její význam spočívá pravděpodobně v rozeznávání substrátů. Metodami molekulární dynamiky zde bylo potvrzeno, že interakce substrátu s GRL je zprostředkována hydrofobními rezidui a dále bylo ukázáno, že GRL se výrazně uplatňuje během vtahování substrátu do aktivního centra, kde se velmi silně projevuje její flexibilita.

S U M M A R Y

Mitochondrial processing peptidase (MPP) is heterodimeric matalopeptidase (α -, β -MPP) that plays a key role in mitochondrial protein import, by recognizing and cleaving the targeting presequences of host nuclear-encoded mitochondrial matrix proteins. Here was characterized a novel processing peptidase from the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* - the hydrogenosomal processing peptidase (HPP). Hydrogenosomes are highly reduced versions of mitochondria that are found in diverse parasitic or microaerophilic microbial eukaryotes. It was demonstrated that, contrary to previous reports [100], the *Trichomonas* hydrogenosomal processing peptidase (HPP) functions efficiently as a $\alpha\beta$ heterodimer, rather than as a β -homodimer.

Whereas β -MPP is catalytic subunit, α -MPP has regulatory function. Glycine-rich loop of α -MPP (GRL) is almost absolutely conserved among different organisms and is probably very important in substrate recognition. Molecular dynamics methods were used to confirm that the interaction between substrate and GRL is mediated by hydrophobic interactions. Futher was shown the importance of GRL flexibilty during translocation of the substrate to active center of MPP

1. ÚVOD

Důsledkem evoluce eukaryotických buněk je jejich kompartmentace, která jim dovoluje fungovat mnohem efektivněji. Pro tuto diplomovou práci mají význam organely mitochondriálního typu, které mohou nést vlastní genetickou informaci. Avšak tato DNA má malou informační kapacitu, a kóduje tak jen malé množství proteinů těchto organel. Proto je většina proteinů kódována jadernými geny, jejichž produkty jsou následně do příslušných organel transportovány.

Protože organizace, obsah a funkce těchto organel je přesně definována, je nutné, aby existoval specifický transportní systém pro import těchto proteinů. Většina proteinů určených pro organely mitochondriálního typu je tak syntetizována ve formě svých prekursorů nesoucích aminokyselinovou signální sekvenci. Po dokončení transportu již signální sekvence nejsou potřeba a jsou specificky odštěpovány příslušnými endopeptidasami.

Zatímco mitochondriální „processing“ peptidasa (MPP) je již relativně dobře charakterizovaný enzym jak po stránce fyziologické funkce, biochemických vlastností a struktury a „zbývá“ tedy pouze detailně objasnit mechanismus funkce, tak v případě hydrogenosomální „processing“ peptidasy (HPP) dosud ani jistě nevíme, zda funguje jako monomer či nějaká forma dimeru. V odhalování vlastností a funkce hydrogenosomální „processing“ peptidasy stojíme teprve na začátku dlouhé cesty.

Rozklíčování funkcí těchto dvou peptidas by tak snad mohlo pomoci k objasnění evoluce eukaryotické buňky a v další fázi výzkumu pak k návrhu léků proti rozličným nemocem (malárie a další).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vznik eukaryotní buňky

Ačkoli nejdůležitějším rozdílem mezi eukaryoty na straně jedné a bakteriemi na straně druhé je existence jádra, mnoho eukaryotických buněk charakterizuje také přítomnost dodatečných organel. Všechny dosud charakterizované eukaryotické organismy nesou totiž určité elementy s charakteristickými znaky pro mitochondrie – ať už se jedná o „pravou“ mitochondrii, plastid, peroxisom, hydrogenosom, mitosom nebo pouze o několik genů, které zbyly po druhotné ztrátě organely mitochondriálního typu. Důsledek tohoto poznání je ten, že objasnění evoluční historie mitochondrie může odhalit historii samotné eukaryotické buňky.

Vznik mitochondrie byl velmi významnou událostí v evoluci eukaryotické buňky. Dnes je již obecně přijímána teorie, že mitochondrie se vyvinuly endosymbiosou v hostitelské buňce [1]. Studium mitochondriálního proteomu a fylogenetické analýzy mitochondriálního genomu ukázaly, že endosymbiotický prapředek je nejspíše α-proteobakteriálního původu [2, 3]. Dosud však není zcela jasné, jestli hostitelské buňka byla podobná dnešním archebakteriím nebo zdali se jednalo už o částečně vyvinutého eukaryota, který měl jádro, cytoskelet a primitivní endomembránový systém (tzv. *archezoon*) [4].

Dobrým kandidátem na takového prapředka je α-proteobakterie *Rickettsia prowazekii*. Téměř všichni členové této skupiny organismů žijí ve spojení s eukaryotickými buňkami bud' jako symbionti nebo jako intracelulární paraziti rostlin a zvířat. Přítomnost téměř identických systémů pro energetický metabolismus *R. prowazekii* a aerobních mitochondrií pravděpodobně reflektuje jejich společný původ [3]. Naopak z analýzy mnoha genů zajišťující membránový transport a některé regulační dráhy je patrné, že tyto systémy se vyvinuly v eukaryotickém jádru až po akvizici mitochondriálního prapředka [5].

Ukázkovým příkladem mitochondriálních proteinů nebakteriálního původu je ATP/ADP translokační komplex, který zajišťuje transport ATP/ADP přes mitochondriální membrány. Tento typ transportu byl dosud nalezen pouze u *Rickettsia*, *Chlamydia*, mitochondrií a chloroplastů [6], avšak ATP/ADP translokačné komplexy *Rickettsia* a mitochondrií si nejsou podobné. Dále není důvod předpokládat, že by volně žijící α-proteobakterie exportovala/importovala ATP do/ze svého prostředí. Tyto skutečnosti naznačují, že ATP/ADP translokačné systémy vznikly nezávisle na sobě, a že v době, kdy došlo k akvizici mitochondriálního prapředka někdy před 1,5 miliardou let, nebyla α-proteobakterie schopná transportovat ATP.

Co ale bylo hnací silou evoluce mitochondrie, nebyla-li to výměna ATP mezi endosymbiontem a hostitelem? Existuje několik novějších hypotéz, které se pokouší objasnit ty části tradiční endosymbiotické teorie, které staví na významu ATP pro evoluci mitochondrie.

2.1.1 Vodíková hypotéza

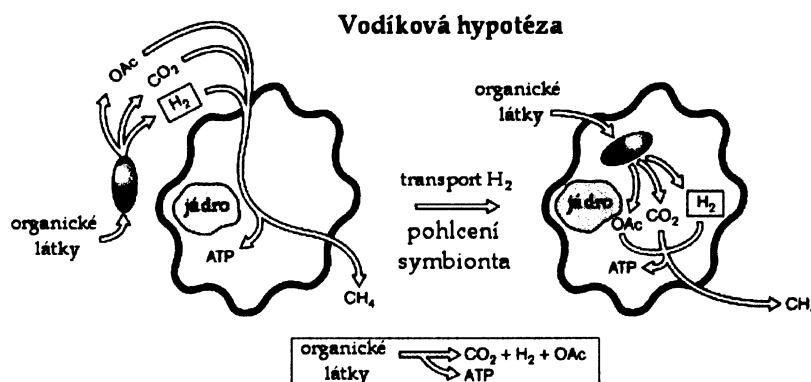
Vodíková hypotéza (Obr. 1) uvažuje jako hnací sílu evoluce mitochondrie produkci/spotřebu vodíku [7]. Tato hypotéza postuluje, že prvotně se dva organismy potkaly v prostředí bohatém na vodík a oxid uhličitý a že jeden z nich mohl být fakultativně anaerobní. Symbiosa těchto dvou organismů se ustavila na základě produkce vodíku a oxidu uhličitého symbiontem, přičemž v důsledku změny složení zemské atmosféry hostitel postupem času začal být na svém symbiontu čím dál tím více závislý, až nakonec jej pohltil úplně.

Oproti tradiční endosymbiotické teorii jsou zde tedy dva důležité rozdíly:

- aerobní versus fakultativně anaerobní symbiont a
- význam ATP versus význam vodíku.

Vodíková hypotéza dále uvažuje, že společný prapředek nesl geny pro všechny enzymy dnes přítomné jak v mitochondriích, tak v hydrogenosomech.

Rozdílná distribuce těchto enzymů v organelách dnešních organismů je pak vysvětlena jako rozdílná ztráta v průběhu evoluce.



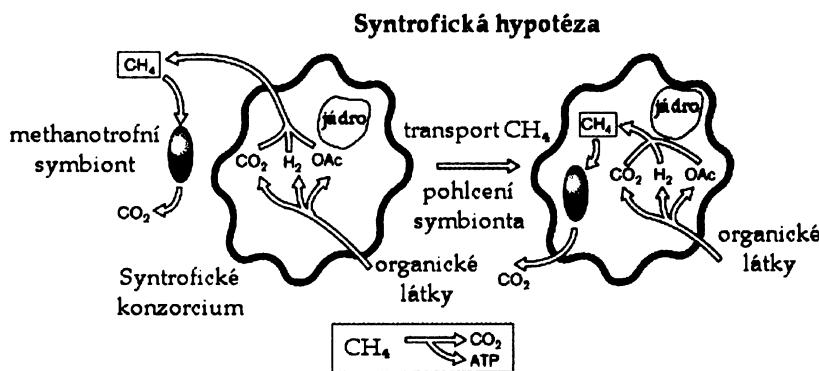
Obr. 1 Schématický pohled na vodíkovou hypotézu [7]. Detaily uvedeny v textu. OAc, acetyl CoA. Obrázek převzat z [5].

Potlačení nebo ztráta anaerobního metabolismu vedla v aerobním prostředí ke vzniku mitochondrie (jinými slovy, mitochondrie byla na počátku anaerobní), zatímco ztráta respirace směrovala vývoj endosymbionta v anaerobním prostředí ke vzniku hydrogenosomu.

2.1.2 Syntrofická hypotéza

Syntrofická hypotéza (Obr. 2) staví také na mezidruhovém transportu vodíku, ale uvažuje jiné organismy [8, 9]. Syntrofická a vodíková hypotéza se také liší v počtu předpokládaných „akvizičních kroků“: zatímco vodíková hypotéza navrhuje pouze jednu endosymbiotickou událost, tak syntrofická hypotéza postuluje dvě oddělené symbiotické události [9]. Společně naopak mají anaerobní prostředí na počátku celého procesu.

Za prvního symbionta je považována myxobakterie redukující sulfát a produkující vodík, která vytvořila syntrofický vztah s anaerobním na vodíku závislým methanogenem. Tato událost vedla k prvotní eukaryogenesi a vzniku konsorcia produkovacího methan. Syntrofická hypotéza předpokládá, že mitochondrie vznikla v druhém „akvizičním kroku“, konkrétně že byla odvozena od methanotrofní δ -proteobakterie, která byla závislá na methanu produkovaném konsorcium.

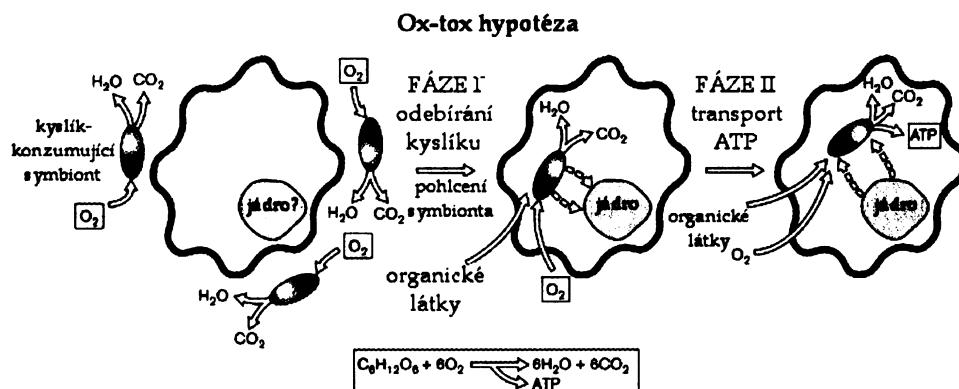


Obr. 2 Schématický pohled na syntrofickou hypotézu [8]. Detaily uvedeny v textu. Obrázek převzat z [5].

2.1.3 Ox-tox hypotéza

Podle ox-tox hypotézy (Obr. 3) vznikla mitochondrie ve dvou fázích [5]. Počáteční funkce symbionta v první fázi byla detoxikace – anaerobní hostitel tak získal selekční výhodu proti stoupajícímu množství kyslíku v zemské atmosféře před 2 miliardami let [10-12].

Následně dochází k těsnějšímu soužití obou organismů, až nakonec hostitel symbionta zcela pochltí, který tak může mnohem efektivněji detoxikovat intracelulární prostředí svého anaerobního hostitele. V druhé fázi dochází k propojování metabolických drah obou organismů, zejména transportního a regulačního systému. Nejdůležitějším krokem je integrace ATP/ADP translokázového systému kódovaného hostitelským genomem do membrány protomitochondrie.



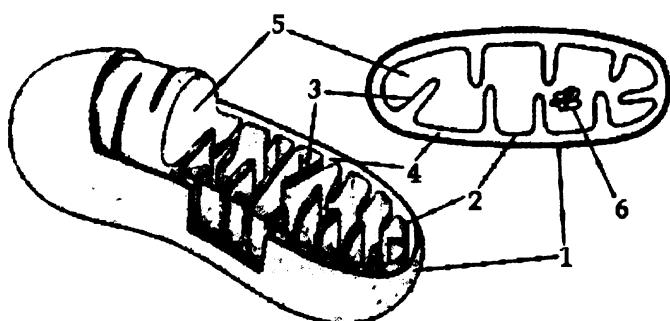
Obr. 3 Schématický pohled na ox-tox hypotézu [5]. Detaily uvedeny v textu. Obrázek převzat z [5].

2.2 Organely mitochondriálního typu

Již bylo řečeno, že všechny dosud charakterizované eukaryotické organismy nesou určité elementy s charakteristickými znaky mitochondrie – jinými slovy řečeno, pro eukaryotické buňky je typická přítomnost organel mitochondriálního typu. V následujícím textu však bude věnována pozornost pouze mitochondriím a z evolučního hlediska velice zajímavým hydrogenosomům.

2.2.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou dvoumembránové organely eukaryotických buněk, které zajišťují celou řadu dějů pro buňku životně nezbytných. V mitochondriích rozlišujeme vnitřní a vnější membránu, mezimembránový prostor a matrix (Obr. 4). Mitochondrie jsou nejen energetickým centrem buňky, ale je zde také lokalizováno velké množství dalších esenciálních metabolických drah, jako například oxidace mastných kyselin. Na všech těchto dějích participuje mnoho mitochondriálních proteinů, často sdružených do celých proteinových komplexů, jejichž lokalizace je v mitochondrii přesně definována.



Obr. 4 Schéma mitochondrie. 1 – vnější membrána, 2 – vnitřní membrána, 3 – kristy, 4 – mezinambránový prostor, 5 – matrix, 6 – mitochondriální DNA.

Přestože mitochondrie disponují vlastním genetickým materiálem, většina mitochondriálních proteinů je kódována jadernými geny. Pro ilustraci: mitochondriální genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (86 kb) obsahuje 54 genů, z nichž pouze devět kóduje proteiny [13] a zbývajících 400-500 potřebných proteinů je kódováno jadernými geny [14], syntetizováno na ribosomech endoplasmatického retikula v cytosolu a transportováno do mitochondrie.

Děje v mitochondriích jsou lokalizovány do vnější nebo vnitřní membrány, meziembránového prostoru nebo matrix. Je tedy nezbytné, aby existoval efektivní a striktní systém pro import prekurzorů mitochondriálních proteinů.

Proteiny určené pro mitochondrie jsou syntetizovány jako delší peptidové prekurzory nesoucí aminokyselinovou signální sekvenci [15].

2.2.2 Hydrogenosomy

Hydrogenosomy byly poprvé popsány u trichomonád [16, 17], ale dnes jsou známé u celé řady rozličných organismů. Hydrogenosomy se však u jednotlivých evolučně vzdálených skupin organismů liší jak strukturou, tak někdy i metabolickou aktivitou, což naznačuje, že u jednotlivých skupin organismů mohly vzniknout nezávisle na sobě jako důsledek adaptace na prostředí chudé na kyslík [18]. Přesto ale hydrogenosomy vykazují několik společných rysů:

- produkce vodíku
- dvojitá membrána
- produkce ATP substrátovou fosforylací
- absence DNA (ale existují výjimky [19])
- centrum biosyntézy FeS center [20]

Embley a spol. [21] postulovali hypotézu o vzniku hydrogenosmů, která předpokládá že hydrogenosomy vznikly z mitochondrie úspěšnou ztrátou kódujících sekvencí DNA v anaerobním prostředí. Tuto hypotézu podporuje fakt, že hydrogenosomy obsahují množství enzymů s výraznou sekvenční homologií se svými mitochondriálními protějšky. Konkrétně se jedná o některé komponenty dýchacího řetězce, adenylátkinasu, „heat-shock“ proteiny 10, 60 a 70 [22-26]. Mitochondriální původ hydrogenosomů však nemůže sám o sobě vysvětlit přítomnost charakteristických enzymů, které se nenacházejí v současných mitochondriích, jako je např. hydrogenasa nebo PFO (komplex pyruvát-ferredoxin oxidoreduktasy) [27]. Pokud jsou hydrogenosomy skutečně pozměněnou mitochondrií, musely by získat geny pro tyto enzymy z jiného genomu.

Z evolučního hlediska jsou zajímavé hydrogenosomy nálevníka *Nyctotherus ovalis*, které neobvykle obsahují vlastní DNA. Některé geny této DNA jsou homologní s příslušnými mitochondriálními geny aerobních nálevníků. Hydrogenosomy *N. ovalis* produkují vodík, avšak jsou senzitivní vůči inhibitorům komplexu I dýchacího řetězce a produkují sukcinát jako svůj koncový metabolický produkt – produkt typický pro mitochondrie v anaerobním prostředí. Tyto skutečnosti naznačují, že hydrogenosomy *N. ovalis* by mohly být chybějícím spojujícím článkem mezi mitochondriemi a hydrogenosomy [19].

Jedním možným způsobem, jak pooodhalit evoluci hydrogenosomů, je rekonstrukce na základě přísné fylogenetické analýzy proteinů charakteristických pro hydrogenosomy. Souvislosti mezi mitochondriemi a hydrogenosomy jsou v současnosti teprve odkrývány.

2.3 Transport proteinů do mitochondrie

Během evoluce endosymbiontů v autonomní organely došlo k přenosu genetické informace do jádra hostitelské buňky, což si vynutilo vznik specializovaných transportních systémů, které zajišťovaly/zajišťují transport různých produktů metabolismu z /do organely a import proteinů kódovaných jadernými geny.

2.3.1 „Kotranslační“ transport

Jak je ze samotného názvu zřejmé, ke „kotranslačnímu“ transportu proteinu dochází již během syntézy proteinu v cytosolu, kdy dochází ke vzniku vazby mezi ribosomem a mitochondrií. Tyto proteiny nesou neštěpitelnou N-koncovou, C-koncovou nebo vnitřní signální sekvenci [15], která je rozpoznávána komplexem integrálních bílkovin vnější membrány (TOM, translocase of the outer membrane) [28] a dále pak komplexem vnitřní membrány (TIM, translocase of the inner membrane) [29]. „Kotranslačně“ jsou transportovány především proteiny vnější mitochondriální membrány a „carrier“ proteiny vnitřní membrány mitochondrie [30].

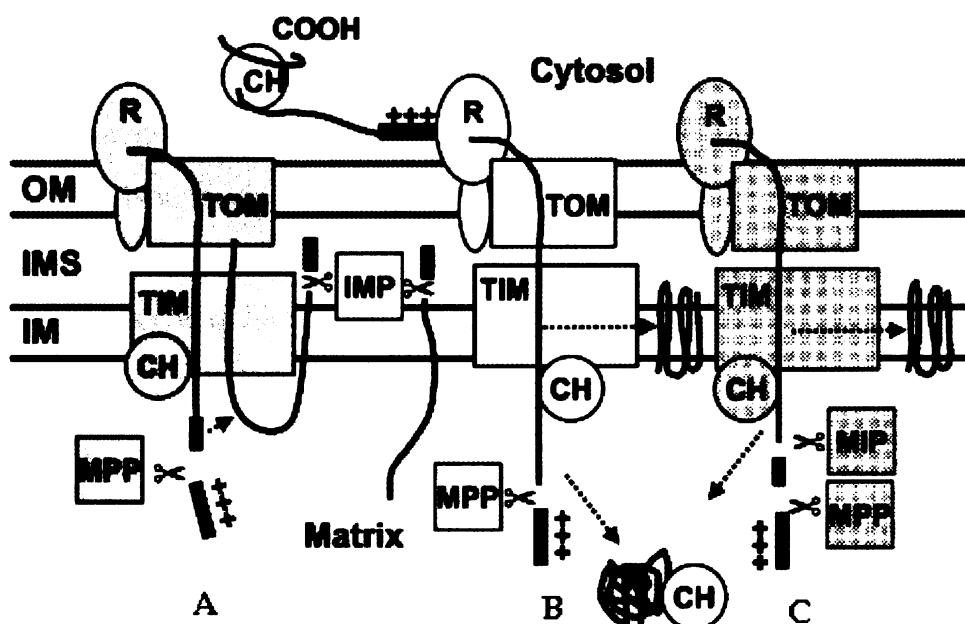
2.3.2 Posttranslační transport

Postranslačním transportem se rozumí transport proteinů až po dokončení jejich syntézy na ribosomech. Pro tyto proteiny je charakteristická odštěpitelná N-koncová signální sekvence, která sestává až ze 120 aminokyselinových zbytků. Má potenciální schopnost tvořit v hydrofobním prostředí nestabilní α -helix a díky přítomnosti bazických aminokyselin je kladně nabité [31]. Za touto sekvencí může následovat další signální sekvence, sestávající z osmi aminokyselin [32-35].

V cytoplasmě je signální sekvence důležitá pro rozeznání transportovaného proteinového prekurzoru specifickými chaperony, které zabraňují agregaci a degradaci proteinu a udržují jej v konformaci optimální pro import [36, 37]. Vlastní transport je zahájen hydrofobní interakcí signální sekvence s TOM komplexem (Obr. 5), konkrétně s jeho podjednotkou Tom20 (Obr. 7). Transport přes vnitřní membránu vyžaduje elektrochemický potenciál ($\Delta\psi$) [38], interakci s TIM

komplexem a je doprovázen hydrolýzou ATP [29, 39, 40]. Po transportu do matrix je signální sekvence z prekurzoru proteolyticky odštěpena.

Proces odštěpování signální sekvence je odlišný v závislosti na charakteru sekvence samotné a na destinaci proteinu (Obr. 5).



Obr. 5 Proteolytické úpravy mitochondriálních proteinových prekurzorů. Signální sekvence je znázorněna jako pozitivně nabité doména. CH, cytosolické a mitochondriální chaperony; R, receptor vnější membrány asociovaný s TOM, translokačním komplexem vnější membrány; TIM, translokační vnitřní membrány; OM, vnější membrána; IMS, meziembránový prostor; IM, vnitřní membrána; MPP, mitochondriální „processing“ peptidasa; IMP, peptidasa vnitřní membrány; MIP, mitochondriální „intermediate“ peptidasa. Obrázek převzat z [41].

Signální sekvence většiny proteinových prekurzorů odštěpuje v matrix mitochondrie mitochondriální „processing“ peptidasa (MPP, EC 3.4.24.64) [42, 43], která proteolyticky upravuje prekurzory transportované do matrix (Obr. 5-B). U prekurzorů směrovaných do meziembránového prostoru bývá hlavní signální sekvence doprovázena další signální sekvencí, tzv. intramitochondriální třídící sekvencí [32-35]. Hlavní signální sekvence je pak odštěpována MPP, zatímco druhá je štěpena peptidasou vnitřní membrány (IMP, EC 3.4.9; Obr. 5-A) [44]. Signální sekvence další skupiny proteinových prekurzorů jsou sekvenčně štěpeny nejprve MPP a dále pak mitochondriální „intermediate“ peptidasou (MIP, EC 3.4.24.59), peptidasou lokalizovanou ve vnitřní membráně mitochondrie (Obr. 5-C) [33].

Celý proces transportu mitochondriálních proteinů je zakončen „poskládáním“ proteinu do své nativní konformace za pomoci mitochondriálních chaperonů, případně jeho asociací do oligomerních proteinových komplexů.

2.3.3 Signální sekvence substrátů

Jak již bylo řečeno, většina proteinů směrovaných do mitochondrií je syntetizována ve formě svých prekurzorů nesoucích na N-konci signální sekvenci. MPP tyto sekvence odštěpuje, přičemž rozeznává širokou škálu signálních sekencí, které jsou hodně variabilní. Délka signálních sekencí se mění od 8 do 121 aminokyselinových zbytků, průměrná délka je pak 32 aminokyselin. Signální sekvence jsou obecně delší u rostlinných proteinových prekurzorů.

Klasickému schématu proteolyticky odštěpovaných signálních sekencí se vymykají některé substráty. Ukázalo se, že MPP též proteolyticky upravuje polypeptidové substráty, tedy takové substráty, jejichž proteolýzou vzniká více, v tomto případě dva, nativní proteiny. MPP nejprve odštěpuje signální sekvenci a následně rozštěpí polypeptidový substrát na dva proteiny, které se v matrix „poskládá“ do své nativní konformace [45]. Podobně se vymyká dvoukrokovéštěpení frataxinu, jehož se také účastní mitochondriální „processing“ peptidasou [46].

Signální sekvence navíc vykazují jen málo společných rysů ve své primární struktuře. Ukázalo se však, že existuje několik rysů společných všem signálním sekvencím rozpoznávaným mitochondriální „processing“ peptidasou, a to sice:

- nese pozitivní náboj [31],
- má schopnost vytvářet amfifilní α -helix [35, 47, 48],
- přítomnost argininu v pozici -2 nebo -3 od místa proteolýzy [32, 35] (toto pravidlo není ale absolutní) a
- přítomnost hydrofobního zbytku kolem pozice +1 od místa proteolýzy [49].

Dosud nebylo zcela jasné, proč jsou vlastně signální sekvence odštěpovány. Mukhopadhyay a kol. [50] však nedávno ukázal, že prekurzorové proteiny jsou

v matrix mitochondrie poměrně rychle degradovány, pokud nedojde k odštěpení signální sekvence za účasti MPP. Zdá se tedy, že přítomnost signálních sekvencí brání správné funkci importovaného proteinu.

2.3.3.1 Primární struktura

Přestože se signální sekvence liší v délce a v aminokyselinové sekvenci, podařilo se porovnáním sekvencí [51] (Obr. 6) různých prekurzorů mitochondriálních proteinů získat základní strukturní motiv v primární struktuře většiny signálních sekvencí, tzv. R-2 pravidlo, kdy se arginin nachází v pozici -2 vzhledem k místu proteolýzy. Toto pravidlo však není absolutní, některé substráty mají arginin v pozici -3, jiné jej nemají vůbec a přesto jsou substráty mitochondriální „processing“ peptidasy.

		MPP
MAAT	(J02622)	MALLHSGKVLSGVVASAFPHGGLAAAAS
RSCSA	(J03621)	MVSGSSGLAAARLLSRTPLLQQMG
YCOX8	(P04039)	MLCQOMIRTTAKRSSENIMTRPIIM
HMUT	(A59145)	MLRAKQNLFLSPHYLRQVKESSSGSRLIQ
YRM02	(P12687)	MWNPIILLDTSSPSFQKEVSGVFLQV

Obr. 6 Místa proteolysy signálních sekvencí prekurzorů mitochondriálních proteinů. MAAT, myší aspartátaminotransferasa; RSCSA, α -podjednotka krysí sukcinyl-CoA-synthetasy; YCOX8, podjednotka 8 cytochrom c oxidasy *S. cerevisiae*; HMUT, lidská methylmalonyl-CoA-mutasa; YRM02, 60S ribosomální protein L2 *S. cerevisiae*. V závorkách jsou uvedeny GenBank přístupové klíče. Obrázek převzat z [41].

Význam argininu v pozici -2 byl potvrzen mnoha pracemi, kdy byl arginin v této pozici (proximální) nahrazen jinou aminokyselinou, přičemž došlo k několikanásobnému poklesu proteolýzy. Naopak substituce distálního argininu (například arginin v pozici -10) za lysin neměla na proteolýzu prakticky žádný vliv. Lze tedy shrnout, že zatímco distální arginin je rozeznáván jako bazická aminokyselina, tak proximální arginin je rozeznáván jako individuum [32, 35, 49, 52, 53].

Experimenty s delecemi a substitucemi v signální sekvenci dále ukázaly význam bazických aminokyselin pro efektivní proteolytickou úpravu mitochondriální „processing“ peptidasou [49, 54-59]. Kyslé zbytky se téměř nevyskytují, a tak sekvence nese kladný náboj. Význam pozitivního náboje naznačuje také rentgenová analýza struktury enzym-substrát [60].

Přítomnost zbytků glycinu a prolinu mezi proximálním a distálním argininem, respektive mezi proximálním argininem a distálním bazickým zbytkem, zajišťuje delším signálním sekvencím jistou dávku flexibility, které tak mohou interagovat s příslušnými aminokyselinami podjednotek MPP [31].

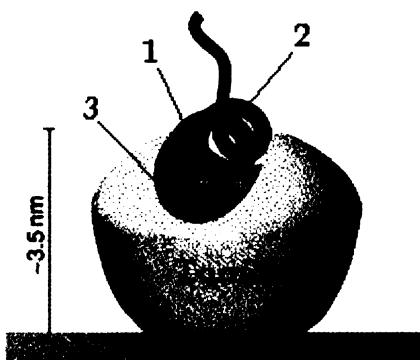
Do pozice +1 jsou často situovány objemné hydrofobní zbytky fenylalaninu, leucinu nebo isoleucinu [49]. Významnou pozici v nativním proteinu na N-konci je pak pozice +2 a/nebo +3, kde se vyskytuje malé hydrofilní zbytky serinu nebo threoninu [61, 62].

2.3.3.2 Sekundární struktura

Samotná přítomnost některých aminokyselin v daných pozicích signální sekvence nemůže být dostačující pro rozeznávání proteinových prekurzorů transportním systémem a později pak mitochondriální „processing“ peptidasou. Jelikož mezi prekurzory proteolyticky upravovanými MPP neexistuje jednoznačný společný rozpoznávací motiv, předpokládá se, že MPP rozpoznává určitou vyšší uspořádanou strukturu. A skutečně, pomocí dvoudimenzionální vodíkové nukleární magnetické rezonance kombinované s cirkulárním dichroismem na syntetických peptidech odpovídajícím skutečným signálním sekvencím byla popsána amfifilní α -helikální struktura signální sekvence [63, 64].

Schopnost signálních sekvencí tvořit amfifilní α -helix je velmi významná skutečnost. α -helixy sekvencí substrátů MPP mají na jedné straně exponovány hydrofobní aminokyseliny a na straně druhé aminokyseliny kladně nabité. Tato schopnost se projevuje prokazatelně přinejmenším během transportu proteinového prekurzoru do mitochondrie, neboť v okamžiku kontaktu signální sekvence s TOM komplexem, respektive s cytosolickou doménou jeho podjednotky Tom20, je sekvence v konformaci α -helixu [65, 66]. Tvorba α -helixu je podmíněna přítomností hydrofobního prostředí, které podjednotka Tom20 vytváří expozici svých nepolárních a hydrofobních zbytků aminokyselin do žlábku, kde dochází k vlastní interakci se signální sekvencí (Obr. 7). Zdá se, že nepolární prostředí mitochondriálních membrán pak dále tento α -helix stabilizuje. Na základě předcházejících experimentálních výsledků naší skupiny pak

předpokládáme, že α -helix signální sekvence se uplatňuje pravděpodobně též v prvotním kontaktu s α -podjednotkou MPP v tzv. glycinovém místě [67].



Obr. 7 Interakce podjednotky Tom20 se signální sekvencí. Model cytosolické domény podjednotky Tom20 TOM komplexu s interagující sekvencí v konformaci amfifilního α -helixu. Signální sekvence se váže svou hydrofobní stranou (1) do hydrofobního žlábku (3), přičemž pozitivně nabitá strana sekvence (2) je orientována na opačnou stranu. Model vytvořen na základě NMR [65] potvrzen krystalovou studií [66].

Studie, které se zabývaly sekundární strukturou signálních sekvencí, ukázaly, že signální sekvence tvoří α -helixy s různým stupněm flexibility, která rozhoduje o tom, zda sekvence bude odštěpena nebo ne. Ukázalo se, že prekurzory s helixy dlouhými a stabilními nejsou substráty MPP, zatímco krátké (s maximálně třemi otáčkami) a nestabilní naopak podstupují proteolytickou úpravu mitochondriální „processing“ peptidasou. Upravovány jsou též prekurzory se dvěma, případně více, krátkými α -helixy od sebe oddělenými krátkým flexibilním „linkerem“ tvořeným zbytky glycinu a/nebo prolinu [63, 68].

Ukázalo se, že signální sekvence je v aktivním centru MPP vázána v rozvolněné formě, nikoli v konformaci α -helixu (Obr. 10) [60]. Předpokládáme, že k přeměně z konformace α -helixu do rozvolněné formy dochází během vtahování signální sekvence do aktivního centra, přičemž tato přeměna je spojena se vzájemným pohybem domén α -podjednotky [69]. Příliš stabilní α -helix tak může představovat velkou konformační bariéru, která brání přechodu do rozvolněné konformace.

Lze shrnout, že aby protein byl substrátem MPP, potřebuje jednak krátký flexibilní amfifilní α -helix, a tomu odpovídající primární strukturu. Každá z těchto vlastností se projevuje v jiné fázi. Zatímco helikální struktura se zřejmě uplatňuje při prvotním kontaktu s MPP, tak primární struktura rozhoduje o vlastní proteolýze v aktivním centru.

2.4 Signální peptidasy mitochondriálního typu

Zatímco mitochondriální „processing“ peptidasa je studována od 80. let a jedná se již o relativně dobře prostudovaný enzym, tak u hydrogenosomální „processing“ peptidasy je tomu přesně naopak. Úroveň našeho poznání HPP je oproti MPP nesrovnatelně nižší, a proto bude v této kapitole MPP popsána detailně, zatímco HPP pouze stručně.

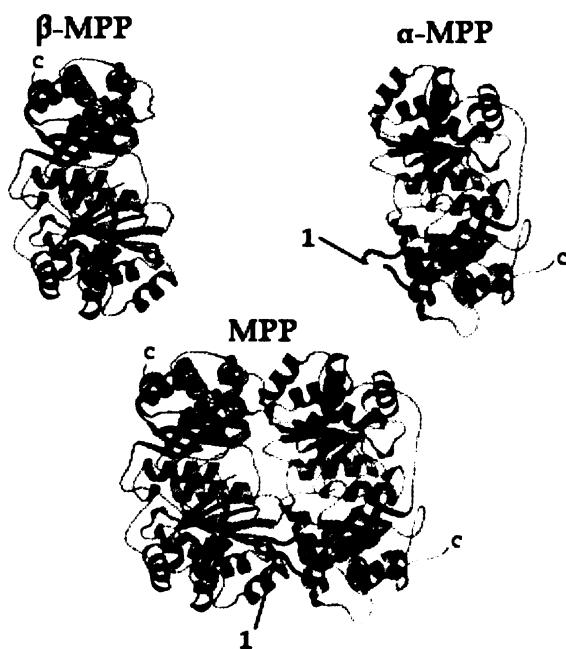
2.4.1 Mitochondriální „processing“ peptidasa

2.4.1.1 $\alpha\beta$ -dimer

Mitochondriální „processing“ peptidasa byla poprvé izolována z *Neurospora crassa* [70], *Saccharomyces cerevisiae* [71] a krysích jater [72], později pak z rajče [73], hovězích jater [57] a špenátu [74], jako heterodimer o velikosti 100-110 kDa. MPP je stabilní jako dimer, nicméně podjednotky (α , β) MPP mohou být během purifikace separovány. Podjednotky samy o sobě proteolytickou funkci však nemají [75]. Katalytické centrum enzymu se nachází v dutině tvořené oběma podjednotkami.

MPP purifikovaná z různých organismů vykazuje maximální aktivitu při pH 7-8, při nižších hodnotách pH dochází k inaktivaci enzymu, stejně jako po přidání EDTA nebo *o*-fenantrolinu. K obnovení aktivity pak dochází přidáním iontů Zn^{2+} , Co^{2+} a Mn^{2+} [76-78]. Ačkoli prvotně nebyl žádný kovový ion asociovaný s MPP detekován, později bylo zjištěno, že MPP obsahuje ion Zn^{2+} v aktivním centru (Obr. 9-B) [79].

Podjednotky MPP vykazují ~20-30% homologie mezi sebou [80, 81] a významná je též homologie podjednotek MPP mezi různými organismy. V sekvenci α -MPP *S. cerevisiae*, *N. crassa* a krysy byla nalezena ~36% identita [75]. Pro β -MPP je procento homologie ještě větší a činí ~45-52% mezi potkaní, *S. cerevisiae* a *N. crassa* podjednotkou [70, 80], což odráží rozdílné funkce obou podjednotek.



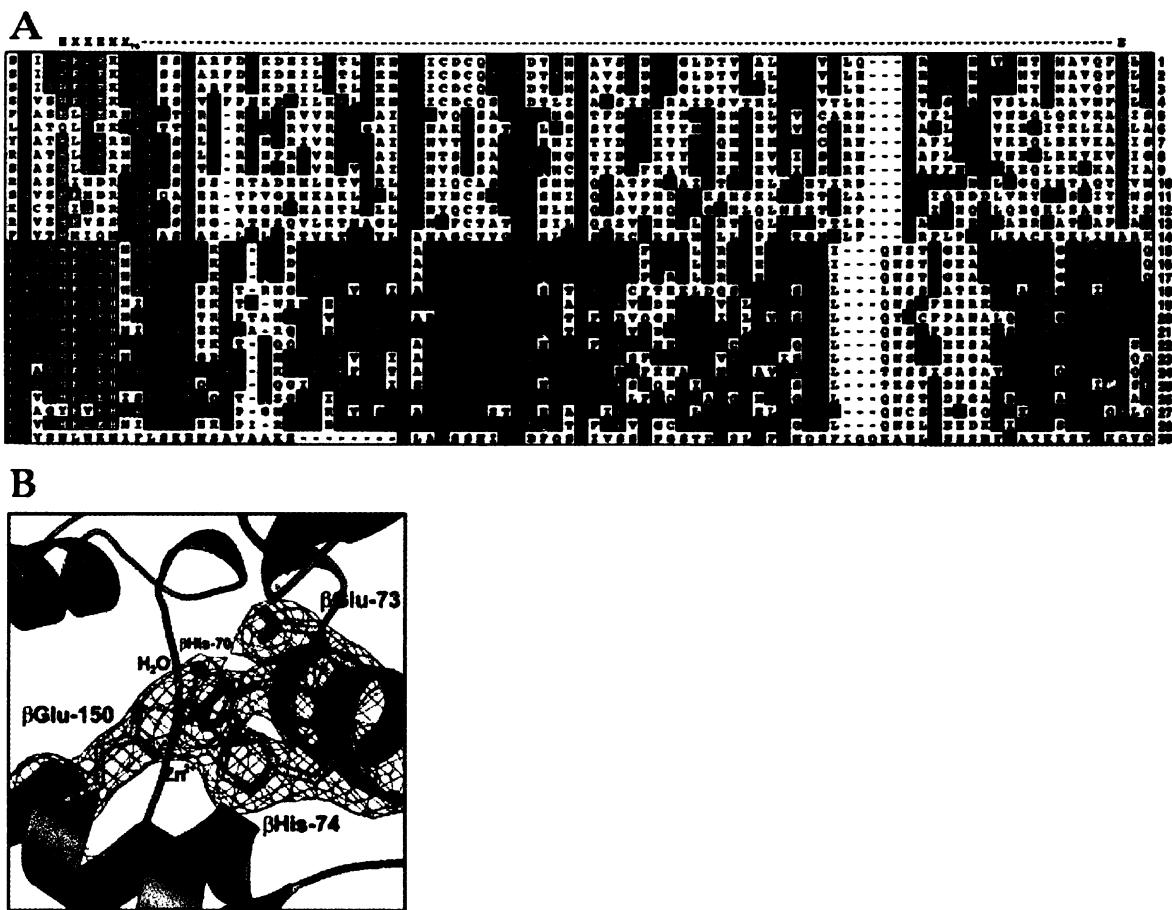
Obr. 8 Mitochondriální „processing“ peptidasa. Struktura na základě rentgenostrukturní analýzy. 1 - glycinové místo; C značí C-konec řetězce. Obrázek převzat z [60].

2.4.1.2 β -podjednotka

V β -podjednotce jsou lokalizovány aminokyseliny vážící zinek (Obr. 9-A), které vytvářejí plně konzervovaný motiv H-X-X-E-H-X₇₆-E (Obr. 9-B). Tento motiv je přítomen ve všech dosud známých β -MPP.

Nahrazení jakéhokoli aminokyselinového zbytku v motivu vázajícím zinek vedlo k úplné ztrátě schopnosti vázat zinek a došlo tak ke kompletní ztrátě proteolytické aktivity MPP [82-84]. Významnost tohoto motivu byla později potvrzena krystalografickou studií, která ukázala, že ion zinku je koordinován dvěma histidilovými zbytky a distální glutamovou kyselinou, přičemž proximální kyselina glutamová funguje jako základna pro molekulu vody, která se jako čtvrtý ligand koordinuje na ion zinku [60].

Srovnání sekvencí β -MPP izolovaných z různých organismů dále ukázalo několik konzervovaných kyselých aminokyselin (Asp, Glu), které se nacházejí na α -helixu nasměrovaném do dutiny mezi podjednotkami. Tyto interagují s bazickými aminokyselinami signální sekvence substrátu a zřejmě se účastní vazby substrátu v rozvolněné konformaci, jak je tomu v případě vazby signální sekvence v aktivním centru MPP.



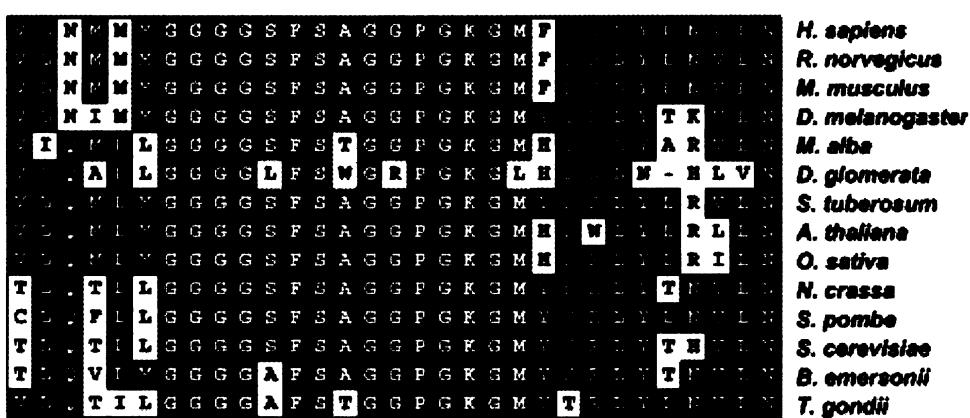
Obr. 9 Aminokyseliny vázající zinek v β -MPP. A - Srovnání sekvencí konzervovaných aminokyselin v zinek-vazebném místě z různých organismů. Konzervované zbytky jsou zvýrazněny černě, zinek-vazebné zbytky šedě. α -MPP: 1 – *H. sapiens* (Q10713); 2 – *R. norvegicus* (P20069); 3 – *M. musculus* (Q9DC61); 4 – *D. melanogaster* (AAF59168); 5 – *M. alba* (BAB62405); 6 – *D. glomerata* (AAG42149); 7 – *S. tuberosum* (P29677); 8 – *A. thaliana* (AAK59675); 9 – *O. sativa* (BAB55500); 10 – *N. crassa* (P23995); 11 – *S. pombe* (CAA22672); 12 – *S. cerevisiae* (P11914); 13 – *B. emersonii* (AAB50243); 14 – *T. gondii* (AAF00541). β -MPP: 15 – *H. sapiens* (O75439); 16 – *R. norvegicus* (Q03346); 17 – *M. musculus* (Q9CXT8); 18 – *C. elegans* (CAA92566); 19 – *S. tuberosum* (B48529); 20 – *O. sativa* (BAB39420); 21 – *C. melo* (AAK07827); 22 – *N. crassa* (P11913); 23 – *L. edodes* (AAD37722); 24 – *S. pombe* (CAB66443); 25 – *S. cerevisiae* (P10507); 26 – *B. emersonii* (AAC63093). Core I proteiny: 27 – *B. taurus* (P31800); 28 – *S. tuberosum* (AAB28041); 29 – *S. cerevisiae* (P07256). V závorce jsou uvedeny GenBank přístupové klíče. Obrázek převzat z [41]. B – struktura zinek-vazebného motivu založená na rentgenostrukturální analýze, obrázek převzat z [60].

2.4.1.3 α -podjednotka

Celková mezidruhová homologie α -podjednotek je nižší než v případě podjednotky katalytické, nicméně vysoko konzervovaným motivem všem α -MPP je tzv. glycinové místo (Obr. 10), které se nachází u vstupu do dutiny, kterou vytváří společně α - a β -podjednotka (Obr. 8) [60].

Glycinové místo je vůbec nejkonzervovanější sekvencí aminokyselin α -podjednotky (téměř absolutně konzervovanou mezi nejrůznějšími organismy) a je esenciální pro funkci MPP [85]. Tato smyčka může na první pohled bránit vstupu substrátu do aktivního centra MPP, nicméně bylo ukázáno, že substituce i delece zbytků aminokyselin, ať už částečná ($\Delta 289-291$) nebo delece celé smyčky, v této oblasti mají za následek významný pokles afinity enzymu k substrátu, a též pokles proteolytické aktivity [85, 86]. Zdá se tedy, že glycinová smyčka funguje jako významný flexibilní element zahrnutý v rozeznávání a vazbě substrátů a/nebo uvolňování produktů proteolýzy z katalytického centra enzymu. Dalece aminokyselinových zbytků v této oblasti měly za následek významný pokles proteolytické aktivity u substrátů s delšími sekvencemi [69].

Oproti β -podjednotce má α -podjednotka volnější terciární strukturu. Při vazbě substrátu dochází k vzájemnému pohybu domén α -MPP [69], které je třeba určitým způsobem stabilizovat. Zdá se, že tímto stabilizačním elementem by mohl být C-konec α -podjednotky.



Obr. 10 Srovnání sekvencí konzervovaných aminokyselin v glycinovém místě z různých organismů. Konzervované zbytky jsou zvýrazněny černě, glycinové místo šedě. Obrázek převzat z [41].

2.4.1.4 Evoluční souvislosti

Lokalizace MPP v mitochondrii se liší dle druhu organismu. Například u savců a kvasinky je MPP lokalizována v matrix [71, 73, 75], u *N. crassa* [70], *Euglena* a *Potylomella* [87] je β -podjednotka zakotvena ve vnitřní mitochondriální membráně na matrixové straně jako součást bc_1 komplexu dýchacího řetězce. Součástí tohoto komplexu mohou být také obě podjednotky [74, 88-90], jak je tomu například u špenátu nebo pšenice.

„Core I“ podjednotka bc_1 komplexu je homologní s β -podjednotkou MPP (β -MPP), „core II“ pak s α -podjednotkou (α -MPP). Spojení aktivity mitochondriální „processing“ peptidasy s bc_1 komplexem ve vnitřní membráně mitochondrie bylo nejprve považováno za vlastnost typickou pouze pro peptidasu rajčat, ale pozdější studie ukázaly, že tato vlastnost je obecnou vlastností MPP všech fotosyntetizujících rostlin [73, 74, 91]. U rostlin je tedy MPP integrální součástí komplexu redukujícího cytochrom c v dýchacím řetězci a plní dvě funkce zároveň [92].

U některých organismů (kvasinka, savci) došlo k funkčnímu i fyzickému oddělení mitochondriální „processing“ peptidasy od bc_1 komplexu, nicméně úzká evoluční souvislost je mezi nimi zřejmá, jak ukazuje práce [93], kdy byly z mitochondrií hovězího srdce izolovány „core I“ a „core II“ podjednotky bc_1 komplexu. Tyto podjednotky samy o sobě nevykazovaly žádnou proteolytickou aktivitu (podobně jako samostatné podjednotky MPP), ale po jejich mírné denaturaci změnou reakčního prostředí a následném smísení byla proteolytická aktivita pozorována, přičemž maxima této aktivity bylo dosaženo smísením podjednotek „core I“ a „core II“ v molárním poměru 1:1.

Byl vytvořen model odrážející tyto skutečnosti [94]. Časně v evoluci se mitochondriální „processing“ peptidasa začala vyvíjet z bakteriální proteasy a stala se součástí bc_1 komplexu (stav v současnosti typický pro rostlinky). V některých organismech (*S. cerevisiae*, savci) se později podjednotky MPP oddělily od bc_1 komplexu (pravděpodobně v důsledku duplikace jednoho nebo dvou genů), což těmto organismům dovolilo nezávislou regulaci proteolytické úpravy

do mitochondrie transportovaných proteinů a dýchacího řetězce. Situace v *N. crassa* tedy reprezentuje jakýsi mezistav v tomto procesu. Původní podjednotky (core I a core II) zůstaly součástí bc₁ komplexu ze strukturálních důvodu - staly se nezbytné pro funkci tohoto komplexu. Bifunkční role bc₁ komplexu rostlin tedy představuje situaci, která byla kdysi společná mitochondriím všech organismů [95].

2.4.1.5 Mechanismus funkce

Shrnutí poznatků a vytvoření pracovní hypotézy

S tím, jak se rozšiřovaly znalosti o struktuře MPP a o struktuře signálních sekvencí, vyvíjely se i modely mechanismu proteolytické úpravy. V současnosti, kdy je známa krystalová struktura enzymu a komplexu enzym-substrát [60], je proces vlastní proteolýzy velmi dobře popsán, nicméně stále zůstává nejasný mechanismus prvního kontaktu enzymu se substrátem, dále pak mechanismus jeho „nasměrování“ do dutiny mezi podjednotkami a též zůstává nejasný mechanismus uvolňování produktů proteolýzy z aktivního centra.

Interakce substrátu s α-podjednotkou způsobí vzájemný pohyb jejích obou domén. Míra tohoto pohybu je dána délkou signální sekvence, jak bylo prokázáno měřením tryptofanové fluorescence α-MPP v přítomnosti substrátu [69]. Toto společně s nezbytností glycinového místa [85] naznačuje, že místem prvního kontaktu je glycinové místo α-podjednotky.

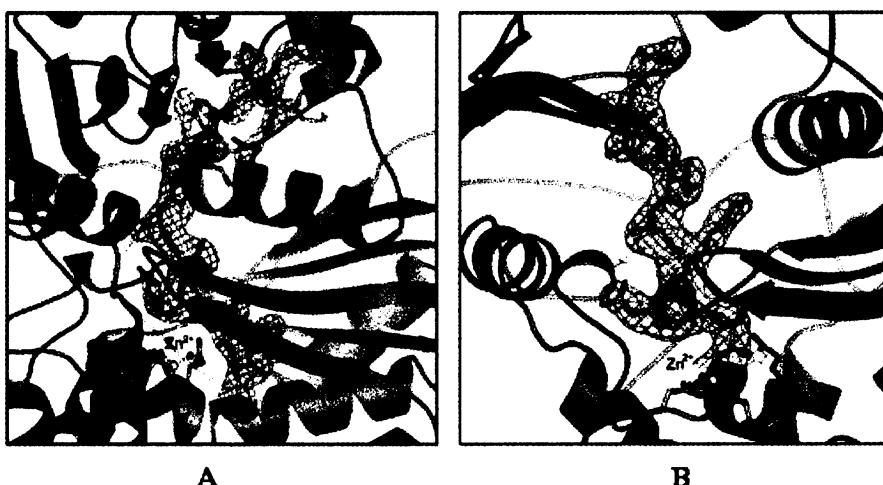
V glycinovém místě se nachází několik hydrofobních aminokyselin, které jsou exponovány na povrch. To naznačuje význam glycinového místa a možný mechanismus rozpoznávání substrátů, neboť hydrofobní aminokyseliny obvykle bývají v důsledku hydrofobního efektu nasměrovány do nitra proteinu.

Glycinová smyčka tak může interagovat s hydrofobními rezidui signální sekvence obdobně jako hydrofobní záliv na povrchu Tom20 [65, 66, 96]. Zde se uplatňuje schopnost signálních sekvencí vytvářet nestabilní amfifilní α-helix, který funguje jako rozpoznávací element při transportu proteinového prekurzoru přes

vnější membránu mitochondrie a zdá se, že podobný mechanismus by mohl fungovat i během prvotního kontaktu signální sekvence substrátu s MPP.

Předpokládáme, že v důsledku interakce se signální sekvencí dochází ke konformační změně α -podjednotky, konkrétně glycinové smyčky [67], a že tak dochází ke vtahování signální sekvence do dutiny mezi podjednotkami. Signální sekvence je následně součinností obou podjednotek zatažena do polární dutiny enzymu a orientována patřičnými aminokyselinovými zbytky tak, aby došlo v dutině k její fixaci. Během vtahování do dutiny dochází k hledání strukturních elementů v primární struktuře signální sekvence a ta je nakonec uchycena v rozvolněné konformaci tak, že místo proteolýzy se nachází v blízkosti motivu vázajícího zinek (Obr. 11).

Jakmile je signální sekvence uchycena odpovídajícím způsobem v aktivním centru, dojde k vlastní proteolýze za účasti iontu zinku a nativní protein uvolněný z dutiny MPP nabývá v matrix mitochondrie za účasti chaperonů své nativní konformace [37]. Odštěpená sekvence je pak enzymově degradována v matrix [97]. Přesný mechanismus uvolňování produktů z aktivního centra není znám, předpokládá se však opět účast glycinového místa α -podjednotky.



Obr. 11 Signální sekvence v aktivním centru MPP. Dva různě orientované pohledy. Model na základě rentgenostrukturální analýzy [60].

2.4.2 Hydrogenosomální „processing“ peptidasa

Podobně jako v případě proteinů transportovaných do mitochondrie, tak též proteiny transportované do hydrogenosomů nesou na N-konci signální sekvence aminokyselin, které jsou následně specificky odštěpovány hydrogenosomální „processing“ peptidasou [98]. Mitochondriální a hydrogenosomální signální sekvence mají podobné rysy v primární struktuře [41, 99], přičemž typickými znaky hydrogenosomálních signálních sekvencí jsou:

- arginin v pozici -2 nebo -3,
- leucin v pozici +2,
- asparagin nebo phenylalanin v pozici -1 vzhledem k místu proteolýzy a konečně
- přítomnost hydrofobních a hydroxylovaných aminokyselin.

Patrným rozdílem mezi hydrogenosomálními a mitochondriálními signálními sekvencemi je však jejich délka: 5-14 u hydrogenosomálních a obvyklých 20, ale až dokonce 80 u mitochondriálních signálních sekvencí.

Existuje pouze jedna jediná publikace, jejíž autoři charakterizovali 47kDa velkou metalopeptidasu z hydrogenosomů *Trichomonas vaginalis* (HPP) [100]. Tato peptidasa obsahuje motiv vázající zinek H-X-X-E-H-X₇₆-E, který je typický pro všechny β-MPP. Brown a kol. [100] však uvádějí, že na rozdíl od MPP je tato peptidasa schopná *in vitro* odštěpovat signální sekvence preproteinů transportovaných do matrix hydrogenosomů jako 100 kDa velký dimer β-podjednotek. *In vivo* HPP též tvoří 100 kDa velký ββ-dimer.

Fylogenetická analýza ukazuje na společný původ HPP a β-MPP a publikovaná data naznačují, že genová duplikace dala vzniknout α- a β-MPP ještě před divergencí *T. vaginalis* od organismů nesoucích mitochondrie.

Brown a kol. [100] navrhuje, že délka signální sekvence je v korelací s podjednotkovým složením příslušných peptidas. Konkrétně, že delší (mitochondriální) signální sekvence vyžadují u signální peptidasy přítomnost α- a

β -podjednotky (MPP), zatímco pro kratší signální sekvence (hydrogenosomální) je dostačující přítomnost β -podjednotek (HPP).

Nicméně sekvenční data ukazují na přítomnost hydrogenosomálního proteinu *T. vaginalis* s vysokou homologií s α -MPP, zvláště pak v oblasti glycinové smyčky.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo přispět k poznání struktury a funkce hydrogenosomální a mitochondriální „processing“ peptidasy.

Konkrétní cíle byly následující:

1. purifikovat hydrogenosomální „processing“ peptidasu
2. připravit substrát pro hydrogenosomální „processing“ peptidasu
3. charakterizovat podmínky pro aktivitu hydrogenosomální „processing“ peptidasy
4. charakterizovat interakce podjednotek mitochondriální a hydrogenosomální „processing“ peptidasy
5. pomocí metod molekulární dynamiky studovat mechanismus rozpoznávání substrátů mitochondriální „processing“ peptidasou a mechanismus vtahování substrátu do aktivního centra

Tato práce byla vypracována v Laboratoři biologie sekundárních metabolitů Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, kde se provádí výzkum mechanismu rozpoznávání substrátů mitochondriální a hydrogenosomální „processing“ peptidasou již delší dobu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

4.1.1 Bakteriální kmeny

JM109 (Stratagene)

e14⁻(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK⁻ mK⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]

Kmen *E. coli* použitý jako recipientní kmen pro transformaci plazmidy (pro izolaci plazmidové DNA, transformace teplotním šokem nebo elektroporací).

BL21(DE3) (Novagen)

F' ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁺) gal dcm

Kmen *E. coli* s profágen λ nesoucím gen pro T7 RNA polymerasu (DE3) byl transformován plazmidem pGroESL a použit pro heterologní expresi proteinů.

4.1.2 Kvasinkové kmeny

EGY48 (Clontech)

MAT_A, ura3, his3, trp1, LexA_{op(λ6)}-LEU2

Kmen *S. cerevisiae* použitý jako recipientní kmen pro kvasinkové plazmidy pro testování proteinových interakcí. Je deficentní v produkci histidinu, leucinu, tryptofanu a uracylu.

4.1.3 Vektory

Vektory odvozené od pJAKO

pJAKO je klonovací vektor připravený v naší laboratoři (J. Janata, J. Kopecký). Jde o pBluescript II KS+ (Stratagene) s modifikovaným polylinkerem, který obsahuje např. restrikční místa NdeI a NcoI, které usnadňují přenosy inzertů mezi používanými klonovacími a expresními vektory. Obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu. Umožňuje tzv. modrobílou selekci klonů nesoucích rekombinantní plazmid.

- **JATV** - nese gen pro α-HPP (vložen do míst NcoI, XhoI).
- **JBTV** - nese gen pro β-HPP (vložen do míst EcoRI, XhoI).
- **pJAKYA** - nese gen pro α-MPP (vložen do míst NcoI, XhoI).

- **pJAKYB** - nese gen pro β -MPP (vložen do míst NcoI, Xhol).

Vektory odvozené od pGEM-T Easy (Promega)

pGEM-T Easy jsou konvenční vektory pro klonování PCR produktů.

- **GAKTV** - nese gen pro prekurzor hydrogenosomální adenylátkinasu (pAK) *T. vaginalis* (vložen do míst NdeI, Xhol) a gen pro rezistenci k ampicilinu. Konstrukt byl připraven ve skupině Doc. Tachezyho.

Expresní vektory pET (Novagen)

Série expresních vektorů, v nichž je exprese pod kontrolou T7 promotoru. Nesou gen pro rezistenci (kanamycin, ampicilin).

Odvozené vektory:

- **PATV** - nese gen pro α -HPP v pET28b (vložen do míst NcoI, Xhol), nese rezistenci pro kanamycin.
- **PBT_V** - nese gen pro β -HPP v pET42b(+) (vložen do míst NdeI, Xhol), nese rezistenci pro kanamycin.
- **PBT_{VB}** - nese gen pro β -HPP s His-kotvou (6x His) na C-konci (vložen do míst NdeI, Xhol) v pET42b(+), nese rezistenci pro kanamycin.

pGroESL (Du Pont)

Tento plazmid nese geny *groES* a *groEL* a chloramfenikolovou rezistenci. Umožňuje nadprodukci proteinů GroES a GroEL v *E. coli*.

Kvasinkové vektory (Clontech)

Série vektorů použitých pro testování proteinových interakcí.

- **p8op-lacZ** - nese *lacZ* reportérový gen pod kontrolou osmi lexA operátorů a minimální TATA oblast z *GAL1* promotoru. Obsahuje selekční *URA3* marker.
- **pLexA** - tento vektor je používán pro přípravu fúzních proteinů zkoumaného proteinu a DNA-vazebného proteinu (202 AK dlouhý LexA protein). Exprese je kontrolována silným kvasinkovým *ADH1* promotorem a obsahuje selekční *HIS3* marker.

- **pB42AD** - tento vektor je používán pro přípravu fúzních proteinů zkoumaného proteinu a 88AK dlouhé aktivační domény. Exprese je pod kontrolou inducibilního *GAL1* promotoru a obsahuje *TRP1* selekční marker.
- **pLexA-Pos, pLexA-53, pLexA-Lam a pB42AD-T** je série kontrolních vektorů odvozených od pLexA nebo pB42AD vektoru.

4.1.4 Chemikálie

Název	Zkratka	Firma
1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan	bis-tris propan	Sigma
2'-deoxynukleosid-5'-trifosfátová směs	dNTP	Top-Bio
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina	HEPES	American
5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid	X-gal	Serva
adenosin-5'-trifosfát	ATP	Sigma
agar		Oxoid
agar kvasinkový		Clontech
agarosa		Promega, Serva
akrylamid	AA	Bio-Rad
aminokyseliny		
ampicilin	amp	Serva
bromfenolová modř	BPB	Bio-Rad
Coomasie Brilliant Blue R250	CBB	
D-glukosa	Glc	Lachema
dodecylsulfát sodný	SDS	Serva
etanol	EtOH	Lachema
ethidium bromid	EtBr	
ethylendiamintetraacetát	EDTA	
glycerol		Merc
chloramfenikol	Cm	Serva
imidazol		
isopropanol		Lachema
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	IPTG	Sigma
kanamycin	kan	Serva
lithium acetát	LiAc	Sigma
močovina		Sigma
N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin	TEMED	Serva
N,N'-methylen-bisakrylamid	bisAA	Bio-Rad
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O		Sigma
NaH ₂ PO ₄		Sigma
peroxidisíran sodný	APS	Sigma
rafinosa	Raf	Sigma
síran amonný		Sigma
tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Serva
Triton X-100		Sigma
trypton		Difco

Dalšími použitými chemikáliemi byly běžně dostupné látky analytické čistoty.

4.1.5 Enzymy

- restrikční endonukleasy NdeI, XhoI, EcoRI (New England Biolabs)
- T4 DNA ligasa (New England Biolabs nebo Fermentas)
- alkalická fosfatasa CIP (New England Biolabs)
- RNAsa A (Fermentas)

4.1.6 Pufry a roztoky

Obecné pufry a roztoky:

TE pufr	- 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TE ⁻¹ pufr	- 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
1x TAE pufr	- 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,0
10x DNA vzorkový	- 40% sacharosa, 0,25% BPB, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0

40% glucosa, sterilizace filtrací

40% galaktosa + 20% rafinosa, sterilizace filtrací

10x BU - 70g.l⁻¹ Na₂HPO₄.7H₂O, 30g.l⁻¹ NaH₂PO₄

IPTG - 100 mM IPTG

Různé pufry lišící se hodnotou pH (6,0 – 9,0) a koncentrací NaCl (0-500mM):

- pro pH 7,6-8,6 20 mM Tris
- pro pH 7,0-8,0 50 mM HEPES
- pro pH 6,2-7,2 a 8,6-9,6 20 mM bis-Tris propan

denaturační pufr - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 8 M močovina, pH 7,4

Roztoky antibiotik:

- ampicilin - 100 mg.ml⁻¹ (1000x)
- kanamycin - 30 mg.ml⁻¹ (1000x)
- chloramfenikol - 34 mg.ml⁻¹ (1000x)

Pro izolaci plazmidové DNA alkalickou lyzí z *E. coli*:

- roztok I - 25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM glukosa, 10 mM EDTA
- roztok II - 1 ml 10% SDS, 1 ml 2 M NaOH, 8 ml H₂O
- připravovat vždy čerstvý

- roztok III - 3 M CH₃COOK pH 4,8
 - pH upravovat ledovou CH₃COOH

Pro přípravu kompetentních buněk *E.coli*:

médium A - LB medium; 0,2% glukosa; 10mM MgSO₄

médium B - LB medium; 36% glycerol; 12% PEG 7500; 12mM MgSO₄

- sterilizace filtrací

Pro elektroforézu (SDS-PAGE):

startovací gel (3%) - 0,45 ml 40% AA/ 1,7% bisAA

- 0,625 ml 1 M Tris-HCl pH 8,9

- 0,125 ml 4% SDS

- 3,5 ml H₂O

- 10 µl 30% APS

- 10 µl TEMED

rozdělovací gel - X ml 40% AA/ 1,7% bisAA

- X=3,5 pro 7% gel

- X=5 pro 10% gel

- X=6 pro 12% gel

- 4 ml 1,875 M Tris-HCl pH 8,9

- 0,5 ml 4% SDS

- (15,5-X) ml H₂O

- 20 µl 30% APS

- 20 µl TEMED

10x elektrodový pufr - 30 g Tris, 144 g glycin, 10 g SDS, doplnit H₂O do 1 l

2x SDS vzorkový pufr - 6,25 ml 1 M Tris-Cl pH 6,8

- 25 ml 4% SDS

- 10 ml 98% glycerol

- 2,5 ml merkaptoethanol

- 1 mg BPB

- 6,25 ml H₂O

fixační roztok - 10% CH₃COOH, 10% isopropanol

barvící roztok - 10% CH₃COOH, 10% isopropanol, 0,25% CBB

odbarvovací roztok - 10% CH₃COOH, 10% CH₃OH

Pro transformaci *S. cerevisiae*:

nosičová DNA z pohlavních žláz sledě - 10mg.ml⁻¹

50% PEG 4000

100% DMSO

10x TE - 0,1M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7,5

10x LiAc - 1M lithium acetát, pH upravit kyselinou octovou na hodnotu 7,5

Pro metaloafinitní purifikaci:

0,1M NiSO₄

4.1.7 Kultivační média a agary

LB médium - 10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, H₂O do 1000 ml, pH 7,5

LB agar - 1000 ml LB médium, 15 g agar

SOC médium - 2 g trypton, 0,55 g kvasničný extrakt, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 1 ml 2 M Mg²⁺, 1 ml 2 M glukosa, H₂O do 100 ml, pH 7

YPD médium - 20g Difco pepton, 10g kvasničný extrakt, 950ml H₂O, pH 5,8, autoklávovat a poté přidat 50ml 40% glucosa

YPD agar - 1l YPD médium, 20g kvasinkový agar

SD médium - 6,7g „yeast nitrogen base“ bez aminokyselin, 850ml H₂O, 100ml 10xDO, pH 5,8, autoklávovat a poté přidat 50ml 40% glucosa

SD agar - 1l SD médium, 20g kvasinkový agar

SD indukční agar - 6,7g „yeast nitrogen base“ bez aminokyselin, 850ml H₂O, 100ml 10xDO, 50ml 40% galaktosa + 20% rafinosa, 100ml 10x BU, 4ml 20mg.ml⁻¹ X-Gal

10x DO - v roztoku chybí jedna nebo několik složek:

- L-isoleucin 300mg.l⁻¹

- L-valin	1500mg.l ⁻¹
- L-adenin hemisulfát	200mg.l ⁻¹
- L-arginin HCl	200mg.l ⁻¹
- L-histidin HCl monohydrát	200mg.l ⁻¹
- L-leucin	1000mg.l ⁻¹
- L-lysin HCl	300mg.l ⁻¹
- L-methionin	200mg.l ⁻¹
- L-fenylalanin	500mg.l ⁻¹
- L-threonin	2000mg.l ⁻¹
- L-tryptofan	200mg.l ⁻¹
- L-tyrosin	300mg.l ⁻¹
- L-uracil	200mg.l ⁻¹

4.1.8 Komerční soupravy

Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci DNA z bakteriální kultury byly používány následující soupravy:

- DNA Purification System Midipreps (Promega)
- DNA Purification Systém SV Minipreps (Promega)

Pro přečišťování DNA (izolace z agarosového gelu po elektroforéze, výměna pufrů pro restriktasy) byly používány následující soupravy:

- SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- DNA Clean-Up System (Promega)

Standardy molekulových hmotností

agarosová elektroforéza DNA - „1 kb Plus DNA ladder“ (Gibco), který obsahuje 20 fragmentů DNA od 100 bp do 12000 bp

Při nanesení 5 µl obsahuje fragment o velikosti 1650 bp 40 ng DNA, čehož bylo využíváno při přibližném odhadu množství a koncentrace vzorku.

SDS-PAGE elektroforéza - SDS-PAGE Calibration Kit (Pharmacia Biotech), obsahuje šest proteinů o molekulových hmotnostech 94; 67; 43; 30; 20,1 a 14,4 kDa.

Při nanesení 10 µl představuje standard o velikosti 67 kDa 1 µg proteinu, čehož bylo využíváno při přibližném odhadu množství a koncentrace vzorku.

4.1.9 Software

PyMOL

Pro vizualizace proteinových struktur a pro stavbu modelů pro molekulární dynamiku byl používán program PyMOL verze 0.99 (DeLano Scientific).

Clone

Pro vytváření map jednotlivých rekombinančních vektorů byl používán program Clone verze 4.01 (Scientific and Education Software).

DNAStar

Pro práci se sekvencemi byly používány programy Edit Sequence a Seqman z balíčku DNAStar verze 4.03.

AMBER

Pro molekulární dynamiku byl používán program AMBER verze 8 nebo 9 (The Scripps Research Institute).

VMD

Pro vizualizaci a analýzu výsledků molekulární dynamiky byl používán program VMD Molecular Graphics verze 1.8.5.

EndNote

Pro práci s citacemi při sepisování této práce byl používán program EndNote verze 9 (Thomson).

4.2 Metody

4.2.1 Práce s buňkami

4.2.1.1 Kultivace *E. coli*

Všechny použité kmeny *E. coli* byly kultivovány na LB agaru při teplotě 37 °C. Pro selekci buněk nesoucí požadovaný plazmid byly do LB agaru (při ochladnutí na 55 °C) přidány roztoky odpovídajících antibiotik. Pro selekci buněk nesoucí plazmid pJAKO či konstrukty od něj odvozené byl přidán ampicilin, pro selekci buněk nesoucí konstrukty plazmidů odvozených od pET28b nebo pET42b(+) pak kanamycin a pro selekci buněk nesoucích plazmid pGroESL chloramfenikol.

Kultivace pro zpracování buněk probíhala v LB médiu s příslušným antibiotikem (stejným jako v případě kultivace na LB agaru) na rotační třepačce při 200 ot.min⁻¹ a 37 °C po dobu 12 až 18 h.

4.2.1.2 Kultivace *S. cerevisiae*

Buňky kmene EGY48 byly kultivovány na YPD agaru nebo na SD agaru s glukosou bez určitých aminokyselin (to v případě, že buňky nesly některý plazmid/některé plazmidy) při 30 °C zpravidla po dobu 2-5 dní. Pro testování interakcí studovaných proteinů byly buňky pěstovány na selekčním SD agaru s pufrovacími solemi a s galaktosou a rafinosou jako zdrojem energie.

4.2.1.3 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

250 ml média A bylo inokulováno přes noc produkovanou bakteriální kulturou tak, aby výsledná OD₅₅₀ byla ~0,1. Buňky byly dále kultivovány na rotační třepačce při 37 °C a 200 ot.min⁻¹ do dosažení OD₅₅₀ 0,6-0,8. V této fázi byla kultura zchlazena 10 min na ledu a následně centrifugována při 1500 g a 4 °C po dobu 10 min. Sediment byl opatrně resuspendován v 1ml média A a následně bylo přidáno 5 ml média B. Suspenze byla rozdělena na alikvoty po 100 µl, které byly uchovávány při -70 °C.

4.2.1.4 Příprava kompetentních buněk *S. cerevisiae*

Kompetentní buňky *S. cerevisiae* bylo potřeba vždy připravovat čerstvé. 1 ml YPD nebo SD média (v případě, že buňky již obsahují některý z plazmidů) byl inokulován několika koloniemi (2-3 mm v průměru), buňky důkladně resuspendovány a suspenze převedena do 50ml YPD nebo SD média. Kultura byla inkubována při 30 °C a 250 ot.min⁻¹ pod dobu 16-18 hodin („overnight“ kultura)

V dalším kroku bylo inokulováno 300 ml YPD média „overnight“ kulturou tak, aby výsledná OD₆₀₀ = 0,2-0,3. Kulturu byla inkubována při 30 °C a 230 ot.min⁻¹ po dobu 3 hodin (OD₆₀₀ by měla být 0,5 ±0,1). Poté byla kultura centrifugována v 50ml kultivačních zkumavkách (Falkon) při laboratorní teplotě a 1000 g po dobu 5 min. Sediment byl resuspendován ve 30ml TE pufru a suspenze opět centrifugována. Sediment byl nakonec resuspendován v 1,5 ml 1x TE/LiAc roztoku, čímž byla příprava kompetentních buněk zakončena a buňky byly připraveny k použití po dobu 2-3 hodin.

4.2.1.5 Transformace buněk *E. coli*

Transformace teplotním šokem

Při transformaci teplotním šokem bylo k zmraženému alikvotu kompetentních buňek přidáno odpovídající množství plazmidové DNA (50 až 100 ng), event. ligační směsi (15-20 µl) a suspenze byla inkubována 30 min na ledu. Buňky byla následně podrobeny teplotnímu šoku ve 42 °C po dobu maximálně 60 s a následně chlazený v ledu po dobu 2 min. Ke směsi byl přidán 1 ml LB média předehřátého na 37 °C a směs byla inkubována ve vodní lázni 1 h při 37 °C, což zabezpečilo plnou expresi rezistence k antibiotiku. Buňky byly krátce centrifugovány na centrifuze, LB médium bylo odstraněno a buňky resuspendovány ve zbývajících cca 100 µl LB média.

Následně byly buňky vysety na plotnu s LB agarem obsahujícím příslušné antibiotikum. Plotny byly inkubovány zpravidla po dobu 12 až 18 h při 37 °C.

Transformace elektroporací

K zmraženému alikvotu kompetentních buňek bylo přidáno 5 µl ligační směsi a suspenze byla ponechána 20 min na ledu. Vlastní transformace probíhala při 300 V, 32 µF a max mA. Elektrošok trval obvykle 1-2 s. Po elektrošoku byly buňky přeneseny do 1 ml chlazeného SOC média a ponechány po dobu 10 min na ledu. Suspenze poté byla kultivována 1-2 hodiny (2 hodiny pro transformaci ligační směsí) na rotační třepačce při 200 ot.min⁻¹ a 37 °C.

Následně byly buňky vysety na plotnu s LB agarem obsahujícím požadované antibiotikum. Plotny byly poté inkubovány zpravidla po dobu 12 až 18 h při 37 °C.

4.2.1.6 Transformace buněk *S. cerevisiae*

Byl připraven čerstvý PEG/LiAc roztok (8 ml 50% PEG 4000 + 1 ml 10x TE + 1ml 10x LiAc). Do zkumavky byly přidány požadované plazmidy (100-200 ng od každého) a 10 µl nosičové DNA z pohlavních žláz sledě, která byla nejdříve 20 min vařena na vodní lázni a poté prudce zchlazena na ledu. Obsah zkumavky byl důkladně promíchán a bylo přidáno 100 µl kompetentních buněk. Suspenze byla důkladně promíchána. Poté bylo přidáno 600 µl PEG/LiAc roztoku, suspenze byla opět důkladně promíchána inkubována při 30 °C a 200 ot.min⁻¹ po dobu 30 min.

K suspenzi bylo přidáno 70 µl DMSO a suspenze byla lehce promíchána. Byl proveden teplotní šok ve 42 °C po dobu 15 min. Poté byla suspenze zchlazena na ledu a krátce (5s) centrifugována. Supernatant byl opatrně odebrán a sediment resuspendován v 500 µl 1x TE pufru.

Na dvě plotny (průměr 100 mm) s SD agarem bylo vyseváni 200 µl suspenze a 200 µl 10x zředěné suspenze buňek. Plotny byly inkubovány ve 30 °C po dobu 2-5 dní (dokud kolonie nevyrostly do 2-5 mm v průměru).

4.2.2 Práce s DNA

4.2.2.1 Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí

Bakteriální kultura (2 až 10 ml v závislosti na druhu izolovaného plazmidu) kultivovaná přes noc na rotační třepačce při 37 °C a 200 ot.min⁻¹ byla centrifugována při 3000 g po dobu 15 min za laboratorní teploty. Sediment byl resuspendován ve 100 µl roztoku I a následně bylo přidáno 200 µl roztoku II. Suspenze byla opatrně promíchána převracením. Následně bylo přidáno 150 µl roztoku III a suspenze byla opatrně promíchána. Suspenze byla centrifugována při 13000 g po dobu 15 min za laboratorní teploty.

K supernatantu byl přidán 2,5 objemový násobek 96% ledového ethanolu a roztok byl ponechán 3 min na laboratorním stole. Následně byl roztok centrifugován při 13000 g po dobu 15 min za laboratorní teploty. Supernatant byl odebrán a sediment promyt 1 ml 80% ledového ethanolu. Vysrážená DNA byla oddělena opět centrifugací a vysušena (45 °C, 2-8 min).

Sediment byl rozpuštěn v požadovaném objemu (\pm 30 µl) destilované vody s RNAsou A (20 µg.ml⁻¹) pro degradaci RNA. Roztok DNA byl inkubován 30 min za laboratorní teploty a nakonec zmražen ve -20 °C pro další použití.

Izolace plazmidové DNA pomocí komerčních souprav

Komerční soupravy byly používány v případě, kdy bylo třeba získat plazmidovou DNA v čistotě odpovídající dalšímu použití (restrikce, ligace). Všechny izolace probíhaly ve třech stupních. Nejdříve bylo nutné buňky lyzovat a vysrážet většinu proteinů a chromosomální DNA.

Druhý krok spočíval v dalším čištění plazmidové DNA vazbou na „skleněné mléko“ (Promega). Při používání komerčních souprav byly dodržovány pokyny výrobce.

Izolace plazmidové DNA z agarosového gelu

Pro izolaci požadovaného fragmentu z agarosového gelu po elektroforéze byla používána komerční souprava SV Gel and PCR Clean-up System firmy Promega. Byly dodržovány pokyny výrobce.

4.2.2.2 Enzymové úpravy DNA

Restrikce DNA

Při práci s restrikčními endonukleasami bylo vždy postupováno dle doporučení výrobce. Pro testování připravených konstruktů byl celkový objem 10 až 20 µl, pro přípravu konstruktů až 100 µl. Množství přidaného enzymu se obvykle pohybovalo mezi 5-10 U na 1 µg DNA.

Ligace DNA

Pro ligace byl dodržován celkový objem reakce 20 µl. Mezi vektorem a fragmentem byl dodržován molární poměr 1:10-20. Byla používána T4 DNA ligasa a do reakce bylo přidáváno ATP v konečné koncentraci 1 mM. Reakční směs byla inkubována 2-3 h při laboratorní teplotě.

Defosforylace DNA

Defosforylace konců linearizovaného plazmidu by měla zabránit opětnému spojení jeho konců za vzniku kruhové molekuly neobsahující vkládaný fragment. K těmto účelům byla požívána alkalická fosfatasa CIP. Reakce probíhaly při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. Enzym a pufr byl odstraněn komerční soupravou určenou pro tyto účely.

4.2.2.3 Agarosová elektroforéza DNA

Elektroforetické rozdělování fragmentů DNA je založeno na rozdílné pohyblivosti, resp. velikosti molekul DNA. Byl používán agarosový gel koncentrace od 0,8% do 2% v závislosti na velikosti separovaných fragmentů a pufr TAE (1x). Do gelu byl přidáván ethidium bromid pro vizualizaci DNA pod UV světlem (konečná koncentrace cca 0,005%).

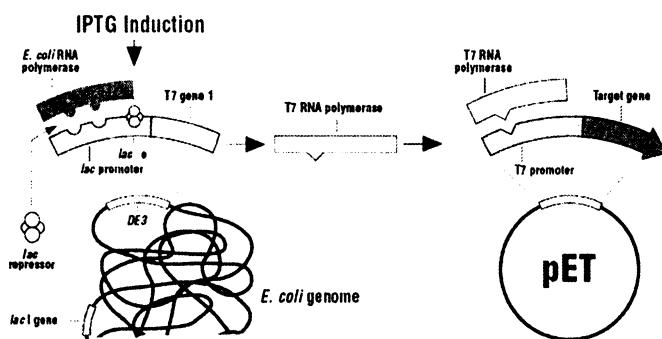
Před nanesením DNA byl ke vzorkům přidán vzorkový pufr v poměru cca 1:5. Elektroforéza probíhala při 3-5 V na 1 cm délky gelu. Jako standard bylo nanášeno 5 µl „1 kb Plus DNA ladder“.

4.2.3 Práce s proteiny

4.2.3.1 Heterologní exprese proteinů

Heterologní exprese probíhá v buňkách jiného organismu. Pro produkci prekurzoru hydrogenosomální AK *Trichomonas vaginalis* byl používán kmen *E. coli* BL21(DE3), pro produkci α- a β-podjednotek HPP *T. vaginalis* byl používán ten samý kmen s plazmidem pGroESL.

Byl používán pET expresní systém (Novagen, Obr. 12). pET vektory jsou konstruovány tak, že po přidání IPTG se spustí syntéza T7-RNA polymerasy, jejíž gen se nachází na chromosomu hostitelské buňky pod kontrolou *lac* operátoru. Ta poté začne transkripcí z T7 promotoru na pET vektoru, za kterým je vložen studovaný gen, který je navíc též pod kontrolou *lac* operátoru. V hostitelské buňce je dále přítomen *lac* represor, který je kódován též pET vektorem (brání expresi vloženého genu bez IPTG).



Obr. 12 Schéma exprese proteinu v pET expresním systému. Obrázek převzat z [101].

Přes noc kultivované buňky na LB agaru (přidán kanamycin a chloramfenikol pro selekci klonů s oběma plazmidy) byly smyty LB médiem a bylo jimi inokulováno LB médium s kanamycinem a případně chloramfenikolem tak, aby výsledná OD₅₅₀ byla ~0,1. Kultura byla kultivována obvykle při 37 °C a 230 ot.min⁻¹ do dosažení OD₅₅₀ 0,6-0,8. Bylo odebráno 5 ml (pro porovnání indukované a neindukované frakce) a poté byl přidán roztok IPTG do výsledné

koncentrace 0,4 mM. Kultivace probíhala za stejných podmínek 1 hodinu a buňky byly následně sklizeny centrifugací 15 min při 4000 g a 4 °C.

Buňky byly promyty dvakrát v příslušném pufru (po každém promytí následovala centrifugace 3000 g, 4 °C, 10 min), resuspendovány v tomtéž pufru a sonikovány. Rozpustná a nerozpustná frakce byly odděleny centrifugací při 13 000 g, 4 °C po dobu 20 min. Exprese proteinu byla kontrolována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE).

4.2.3.2 Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro analýzu byla používána vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS. Elektroforéza probíhala v SDS elektrodovém pufru při konstantním napětí 180 V v zaostřovacím gelu (3%) a při 280 V v gelu rozdělovacím.

Ke vzorkům (100 µl) byl přidán SDS vzorkový pufr a směs byla povařena 10 min. 20 µl takto připravených vzorků bylo naneseno na gel spolu se standardem molekulových hmotností.

Před vlastním barvením byly gely 10 minut fixovány ve fixačním roztoku. Poté byly gely barveny 10 min v horkém barvícím roztoku a několikrát odbarvovány horkým odbarvovacím roztokem.

4.2.3.3 Purifikace proteinů z inkluzních tělisek

Proteiny (α - a β -HPP) byly exprimovány z pET vektorů v buňkách BL21(DE3) a před zpracováním promyty pu frem (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6) a resuspendovány v tomtéž pufru. Suspenze byla následně sonikována 6x 10s za stálého chlazení na ledu a poté centrifugována při 16000 g a 4 °C po dobu 30 min. Sediment byl promyt týmž pufru a centrifugace byla opakována.

K inkluzním těliskům byl přidán denaturační pufr v poměru 1:5 a denaturace byla prováděna při 37 °C a 200 rpm po dobu 20 min. Následovala centrifugace při 16000 g a laboratorní teplotě po dobu 30 min. Rozpuštěné proteiny v supernatantu byly renaturovány dialýzou přes noc proti různým

pufrům (objem pufru byl minimálně 100x více než objem supernatantu). Vysrážené proteiny byly poté odstraněny centrifugací při 16000 g a 4 °C po dobu 30 min.

Všechny kroky byly kontrolovány na SDS-PAGE.

4.2.3.4 Spojení podjednotek α- a β-HPP

Pro testování aktivity bylo třeba spojit obě podjednotky HPP renaturované z inkluzních tělisek. α- a β-HPP byly smíchány v molárním poměru přibližně 1:1 za přítomnosti 10 mM MnCl₂. Směs byla ponechána 30 min na ledu a následně centrifugována při 16000 g a 4 °C po dobu 30 min. Supernatant byl zkontovalán na SDS-PAGE a poté byl použit pro testování aktivity HPP.

4.2.3.5 Metaloafinitní purifikace proteinů

Na N-konci fúzních proteinů (pAK, β-HPP), produkovaných v rozpustné frakci, se nachází histidinová kotva (6x His), která umožňuje jejich purifikaci pomocí metaloafinitní chromatografie na kolonkách HiTrap Chelating s niklovou náplní (Amersham Biosciences). Tato metoda využívá schopnosti histidinové kotvy vázat se na nikelnaté ionty, které jsou prostřednictvím chelatačního činidla neseny Sepharosou v koloně. Navázaný protein je poté uvolněn z vazby na kolonu pufry se zvyšujícími se koncentracemi imidazolu.

Postupovali jsme dle pokynů výrobce a jednotlivé frakce jsme analyzovali na SDS-PAGE. Frakce obsahující žádaný protein byly spojeny a následně dočištěny gelovou chromatografií.

4.2.3.6 Gelová chromatografie

Po metaloafinitní purifikaci proteinů jsem získali sice čisté proteiny, avšak frakce obsahovaly vždy vysoké koncentrace imidazolu. Gelová chromatografie byla využita pro odstranění imidazolu. Odsolení bylo vždy spojeno s výměnou pufru.

Používali jsem HiTrap Desalting (Amersham Biosciences) a postupovali dle pokynů výrobce. Frakce byly odebírány po 1 ml a přítomnost proteinu ve frakcích

byla testována na nitrocelulosové membráně (Sigma; barvení Ponceau S; odbarvení vodou). Pozitivní frakce pak byly analyzovány na SDS-PAGE.

4.2.3.7 Stanovení aktivity HPP

Aktivitou HPP se rozumí schopnost odštěpit signální sekvenci substrátu. Hledání podmínek aktivity bylo jedním z cílů této diplomové práce a jako pokusný substrát byla zvolena adenylátkinasa.

Jako výchozí protokol byl zvolen protokol pro sledování aktivity MPP: 30 °C, pufr obsahující 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4. Aktivita byla sledována po 2, 4, 8, 16 a 32 min reakce.

Aktivita HPP byla posuzována na základě vizuální SDS-PAGE analýzy. Do reakcí bylo dáváno vždy stejné množství substrátu a enzymu. Reakce byla ukončena po 16 min přidáním 6x vzorkového pufru pro SDS-PAGE a následně byla provedena SDS-PAGE analýza.

4.2.3.8 Stanovení stability

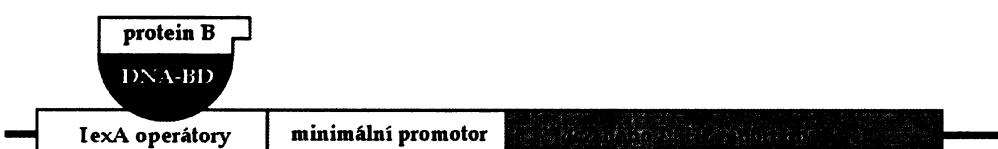
Stanovením stability se rozumí schopnost proteinu neagregovat (pAK) nebo neztráct aktivitu (HPP) při daných podmínkách skladování. Testovány byly teploty -70, -20, 6, 37 °C a laboratorní teplota.

4.2.4 Kvasinkový dvouhybridový systém

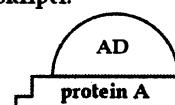
Kvasinkový dvouhybridový systém je založen na modulárním charakteru eukaryotických transkripčních faktorů. Ty se skládají minimálně ze dvou strukturně odlišných a funkčně nezávislých domén: DNA vazebné domény (DNA-BD), vázající se ke specifické promotorové sekvenci a aktivační domény (AD), aktivující RNA polymerasu II. Jestliže jsou domény fyzicky odděleny metodami genového inženýrství, tak třebaže jsou exprimovány ve stejném hostitelském buňce, nejsou schopny aktivovat transkripci reportérových genů [103]. Pouze interakce mezi hybridními proteiny, zprostředkovaná testovanými proteiny, přiblíží DNA-BD a AD domény k sobě, což jim umožní aktivovat transkripci reportérového genu (Obr. 13).

A

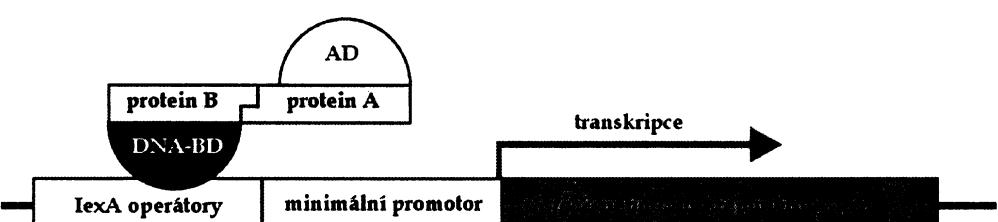
Hybridní protein tvořený DNA-BD doménou a testovaným proteinem se váže na LexA operátory, ale nedokáže aktivovat transkripcí bez AD.

**B**

Samotný hybridní protein tvořený AD a testovaným proteinem se nemůže vázat na LexA operátory a tak aktivovat transkripcí.

**C**

Interakce mezi oběma hybridními蛋白aktivuje transkripcí reportérového genu.



Obr. 13 Schéma kvasinkového dvouhybridového systému. Obrázek převzat z [102].

Jako DNA vazebná doména slouží protein LexA, jehož přirozenou funkcí je represe SOS genů *E. coli* vazbou na lexA operátory [104] a jako aktivační doména slouží 88 aminokyselin dlouhý zbytek kyselého peptidu (B42) z *E. coli*, který aktivuje transkripcí v kvasinkách [105].

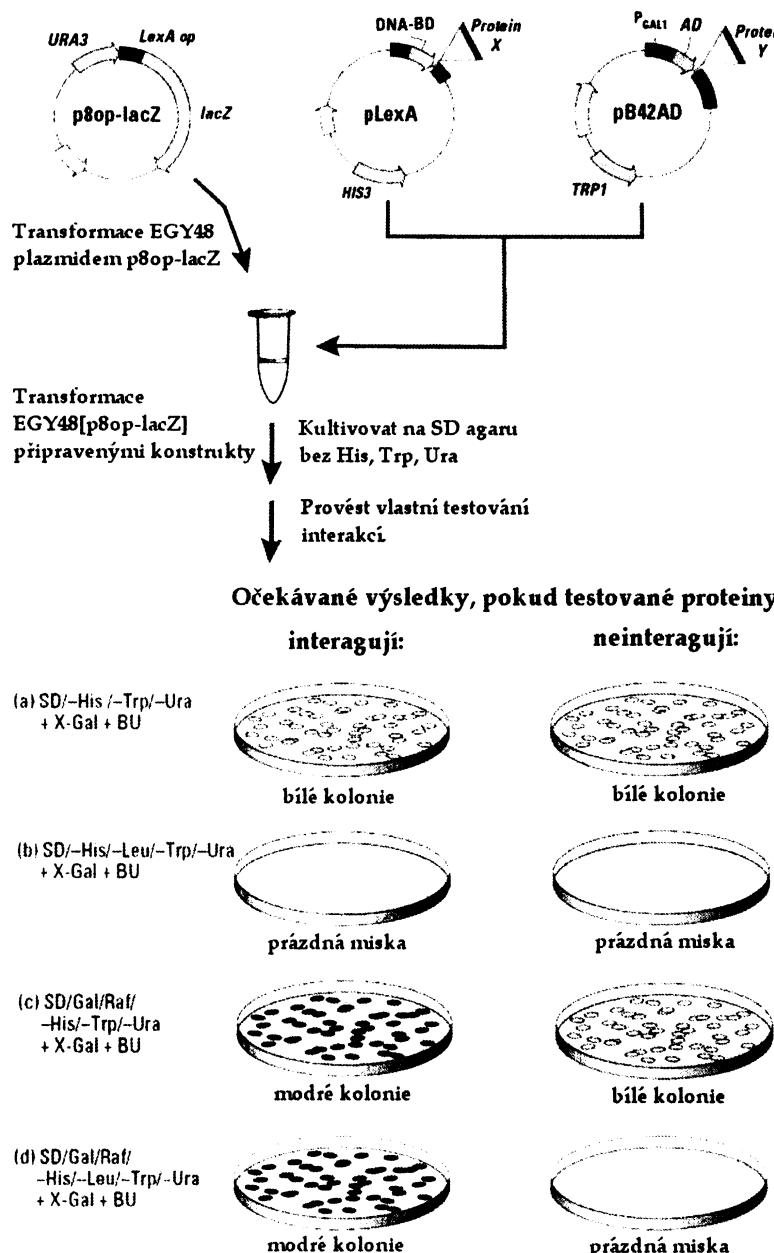
Pro vytvoření hybridních proteinů DNA-BD doména + studovaný protein a AD doména + studovaný protein jsou použity dva odlišné vektory (pLexA a pB42AD). Hybridní proteiny jsou pak současně exprimovány v kvasinkách. Indukce transkripce hybridního proteinu obsahujícího kyselou aktivační doménu je pod kontrolou GAL-1 promotoru (indukce galaktosou).

Uvedený systém používá dva odlišné reportérové geny. Chromosomální gen *LEU2* (kmen EGY48), který komplementuje auxotrofii testovacího kmene na leucin a reportérovým plazmidem p8op-lacZ nesený gen *lacZ* pro produkci β -galaktosidasy, která je fenotypicky detekovatelná štěpením X-gal přítomného v médiu.

4.2.4.1 Testování interakcí

Kmen EGY48 byl nejprve transformován reportérovým plazmidem p8op-lacZ a následně dvěma připravenými konstrukty (jeden odvozený od pLexA, druhý od pB42AD). Buňky byly kultivovány na SD agarech postrádajících uracyl, histidin a tryptofan. Kultivace probíhala při 30 °C několik dní, dokud kolonie nebyly dobře patrné (2-5 mm v průměru). Následně bylo náhodně vybráno vždy 5 kolonií, které byly přeneseny na různé indukční agary a bylo provedeno vlastní testování proteinových interakcí (viz Obr. 14).

Paralelně s vlastním testováním proteinových interakcí byly prováděny stejným způsobem různé pozitivní a negativní kontroly.



Obr. 14 Testování proteinových interakcí. Popis metody v textu. Obrázek převzat z [102].

4.2.5 Molekulární dynamika

Obecný mechanismus funkce MPP je již dobře popsán, ale stále zůstávají nedořešeny podstatné detaile. Aktuálně se zabýváme následujícími nejasnostmi:

- mechanismem prvotního kontaktu substrátu s MPP a
- mechanismem vtahování substrátu do aktivního centra.

Ke studiu těchto nejasností v mechanismu funkce MPP byly využity metody molekulární dynamiky.

Molekulární dynamika využívá principů klasické mechaniky, kdy časový vývoj systému je generován integrací Newtonových pohybových rovnic. Výsledkem je trajektorie, která ukazuje prostorovou změnu a změnu rychlosti částic systému v čase. Ta nám umožňuje detailně studovat proteinové interakce a usuzovat tak na možný mechanismus funkce.

Pro výpočty jsme využívali program AMBER verze 8 a 9.

4.2.5.1 Stavba výchozího modelu

Při stavbě výchozího modelu jsme vycházeli z našich minulých výsledků [67], kdy metodami molekulární dynamiky byla zkoumána interakce glycinové smyčky se signální sekvencí krysí aldehyddehydrogenasy (ALDH). Model MPP byl tehdy postaven na základě krystalové struktury [60] a struktura signální sekvence byla převzata ze známé NMR struktury receptoru Tom20 [65].

Signální sekvence krysí ALDH v glycinovém místě byla ručně mutována v PyMOLu na signální sekvenci kvasinkové malátdehydrogenasy (MDH) tak, že pozice arginu v pozici -2 byla zachována a na N-konec byl přidán leucin.

Takto připravená struktura byla načtena do programu *t leap* (součást programu Amber). Silové pole bylo zvoleno *parm99* (Hornak & Simmerling) modifikované o nestandardní rezidua a jako explicitní solvatační model byl zvolen *TIP3PBOX*. Následně byla vygenerována topologie a koordináty, které byly postoupeny vlastnímu výpočtu v programu *sander* (taktéž součást programu Amber).

4.2.5.2 Volná dynamika

Volná dynamika byla využita při studiu prvního kontaktu substrátu s MPP. Předpokládáme, že první kontakt je zprostředkován hydrofóbní interakcí mezi tzv. glycinovou smyčkou a hydrofobními rezidui signální sekvence [67] a cílem bylo ověřit tuto hypotézu s dalším substrátem.

Protokol volné dynamiky jsme zvolili následující:

- minimalizace vodíků proteinu, kdy protein je fixní
- minimalizace vod a iontů, kdy protein a vodíky jsou fixní
- krátká 10ps dynamika; volné jsou pouze vody
- minimalizace celého systému s postupně klesajícími „restrains“ (1000, 500, 125, 25, 0)
- 100ps dlouhá termalizace systému (generování iniciálních rychlostí)
- produkční fáze, kolekce dat (NpT simulace – T = 298 K, p = 1 atm)

4.2.5.3 Cílená dynamika

Metoda cílené dynamiky byly použita ve snaze poohlít možný mechanismus vtahování signální sekvence do aktivního centra MPP.

Pro cílenou dynamiku jsou potřeba dvoje koordináty - výchozí a cílové (nebo též referenční). Algoritmus výpočtu se pak snaží převést systém z výchozích koordinát na koordináty cílové, čímž vzniká trajektorie, kterou lze následně analyzovat. Pro výchozí koordináty byly využity výsledky volné dynamiky MPP a MDH v glycinovém místě a cílové koordináty byly generovány na základě krystalové struktury MPP [60].

Bylo testováno několik protokolů, které se lišily v časovém intervalu, po který cílená dynamika probíhala. Konečná RMSD (relativní odchylka vzdáleností čtverců) mezi výchozími a cílovými koordináty byla stanovena na 0, teplota a tlak během simulace byly udržovány na konstantních hodnotách 298 K a 1 atm.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Výsledky

5.1.1 Příprava a funkční testování prekurzoru AK

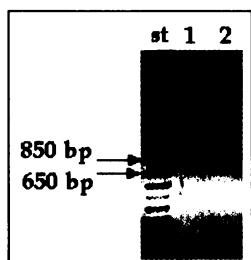
5.1.1.1 Příprava expresního konstraktu

Gen pro prekursor adenylátkinasy (pAK) bylo nutné přenést do expresního pET vektoru, konkrétně do pET42b(+) do míst NdeI/XhoI. Výsledkem exprese vloženého genu je protein s His-kotvou na svém N-konci, která umožňuje metaloafinitní purifikaci proteinu.

Fragment 689 bp nesoucí gen pro pAK již byl připraven Annou Matuškovou a stejně tak fragment 5015 bp z pET42b(+) opracovaný CIP.

Ligační reakce probíhala 1,5 hod při laboratorní teplotě. Též byla prováděna negativní kontrola, kdy reakce probíhala bez fragmentu GAKTV. 10 µl poté bylo odebráno a byla provedena transformace buněk JM109 elektroporací. Buňky byly vysety na plotny s LB agarem obsahujícím kanamycin.

Přes noc vyrostla pouze jedna kolonie, z níž byl izolován plazmid, který byl podroben restrikční kontrole enzymy NdeI/XhoI (Obr. 15). DNA kódující N-konec AK byla nakonec ověřena sekvenací. Připravený konstrukt byl označen pAKTVSC.



Obr. 15 Restrikční kontrola pAKTVSC
2% gel. St - standard, 1 - pAKTVSC, fragment 689 bp z pAKTVSC (vyštěpený enzymy NdeI/XhoI).

5.1.1.2 Produkce prekurzoru AK

Expresní vektor pAKTVSC byl transformován teplotním šokem do buňek BL21(DE3) a testování exprese bylo provedeno při 37 °C ve 20 ml LB média s kanamycinem. Před přidáním IPTG bylo odebráno 5 ml kultury jako negativní kontrola.

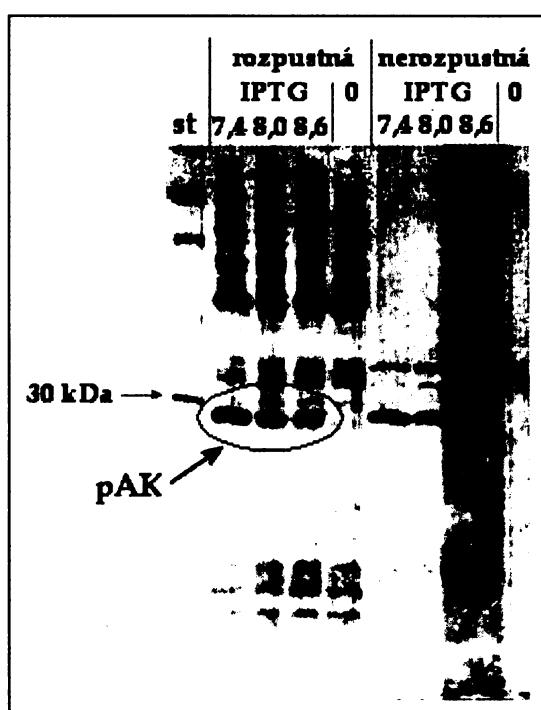
Suspenze byla poté rozdělena na 3x 5 ml a centrifugována a buňky resuspendovány v 5 ml třech různých pufrech lišících se hodnotou pH:

pufr A - 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,4

pufr B - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,0

pufr C - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6

Buňky negativní kontroly byly resuspendovány v pufru A. Suspenze byly znovu centrifugovány a resuspendovány ve 300 µl příslušného pufru (výsledný objem 500 µl). Následovala sonikace 4x 10 s za chlazení na ledu a centrifugace při 4 °C a 16000 g po dobu 20 min. Supernatant byl oddělen a pelet promyt puforem a resuspendován v 500 µl příslušného pufru a frakce byly podrobeny analýze na SDS-PAGE (Obr. 16).



Obr. 16 SDS-PAGE analýza exprese pAK.
8% gel. St - standard, IPTG značí přídavek
IPTG během exprese, nula pak značí
negativní kontrolu. pAK - prekurzor
adenylátkinasy (25,6 kDa).

5.1.1.3 Metaloafinitní purifikace prekurzoru AK

Prekurzor adenylátkinasy se produkuje při 37 °C v rozpustné formě, což usnadňuje jeho purifikaci. Exprese byla prováděna ve 100 ml, kultura centrifugována, resuspendována v 5 ml 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,4 a sonikována 6x 10 s za stálého chlazení na ledu. Zjistili jsme, že chlazení suspenze v případě pAK je velmi důležité, neboť peptidasová aktivita přítomná v bezbuněčném extraktu z *E.coli* degraduje heterologní protein a na SDS-PAGE jsou pak vidět dva proužky (Obr. 17).

Část supernatantu byla odebrána pro analýzu a zbytek byl podstoupen metaloafinitní purifikaci. Pelet byl promyt pufrem a část odebrána pro analýzu.

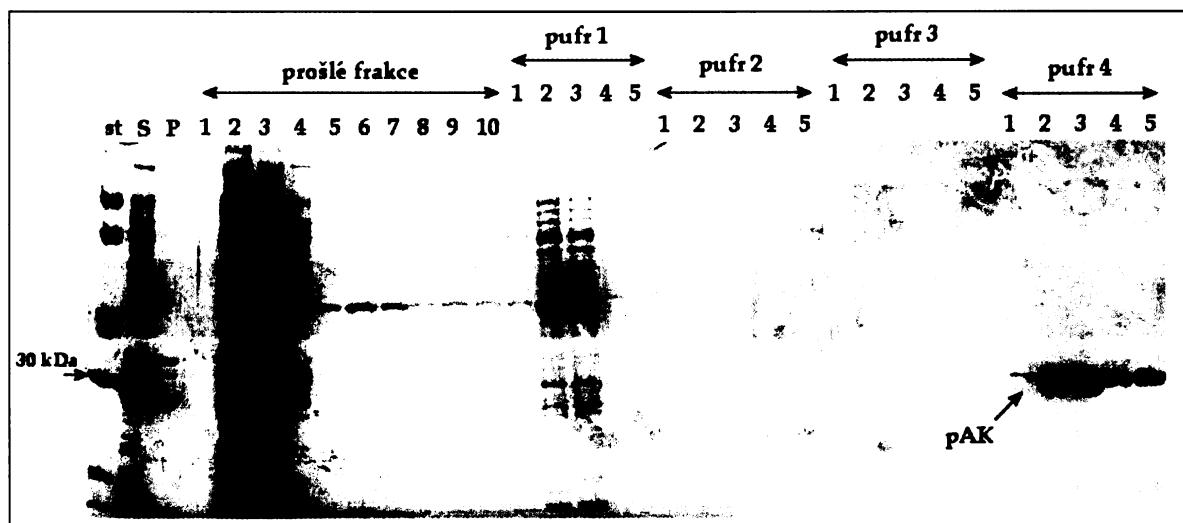
Kolonka HiTrap Chelating byla připravena dle pokynů výrobce. Po nanesení supernatantu na kolonku byly navázané proteiny vytěsněny postupně čtyřmi pufry se stoupající koncentrací imidazolu. Byly jímány frakce po 1 ml, které byly následně analyzovány na SDS-PAGE (Obr. 17).

pufr 1 - 30 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,5% Triton X-100, pH 7,4

pufr 2 - 50 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,5% Triton X-100, pH 7,4

pufr 3 - 100 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,5% Triton X-100, pH 7,4

pufr 4 - 250 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,5% Triton X-100, pH 7,4



Obr. 17 SDS-PAGE analýza frakcí z metaloafinitní purifikace pAK. 8% gel. St - standard. pAK - prekurzor adenylátkinasy (25,6 kDa). S - supernatant, P - pelet.

5.1.1.4 Odsolení prekurzoru AK

Frakce obsahující prekurzor adenylátkinasy byly spojeny a odsoleny na kolonce HiTrap Desalting. Při práci s kolonkami byly dodržovány pokyny výrobce.

Vzorek pAK byl odsolen do pufru 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8, kde byl uchováván při -20 °C i po několik týdnů.

5.1.1.5 Stanovení stability prekurzoru AK

Pro uchovávání pAK byly testovány různé pufry lišící se hodnotou pH a koncentrací NaCl. Jako nejlepší se jeví 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8. V tomto pufru je pAK stabilní při 8 a -20 °C i po měsíci, přičemž nepatrná část proteinu se postupně sráží. Při laboratorní teplotě nebo 37 °C se pAK postupně rozkládá.

5.1.2 Hydrogenosomální „processing“ peptidasa

Tato část výsledků se zabývá optimalizací protokolů pro expresi a purifikaci a stanovením podmínek aktivity hydrogenosomální „processing“ peptidasy (HPP).

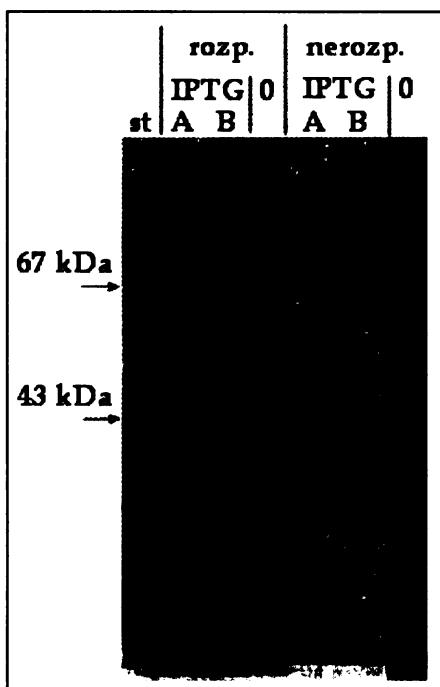
5.1.2.1 Renaturace HPP z inkluzních tělisek

Exprese HPP bez chaperonů

Expresní vektory pro produkci α - a β -podjednotky HPP (PATV a PBTV) byly transformovány teplotním šokem do BL21(DE3) a testování exprese probíhalo v 10 ml LB média s kanamycinem při 37 °C. Exprese pro testování aktivity byla prováděna v 500 ml média.

Před přidáním IPTG bylo odebráno 5 ml kultury jako negativní kontrola. Suspenze byly centrifugovány, pelet byl promyt v pufru 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 a nakonec resuspendován ve 300 μ l téhož pufru.

Frakce poté byly analyzovány SDS-PAGE (Obr. 18). Obě podjednotky se produkovaly jako nerozpustné ve formě inkluzních tělisek.



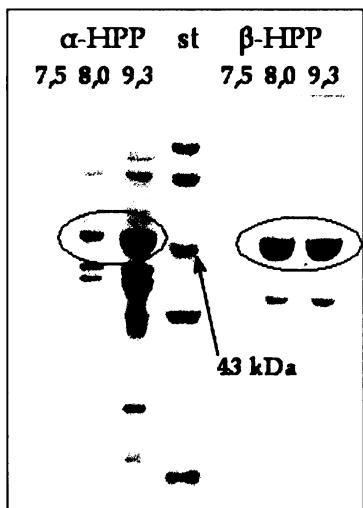
Obr. 18 SDS-PAGE analýza exprese PATV a PBTV. 8% gel. St - standard, IPTG značí přídavek IPTG během exprese, nula pak značí negativní kontrolu. A značí α -HPP (46 kDa), B pak β -HPP (46 kDa). Rozp. - rozpustná, nerozp. - nerozpustná frakce.

Izolace HPP z inkluzních tělisek

Obě podjednotky HPP se produkovaly v nepřítomnosti pGroESL v nerozpustné formě v podobě inkluzních tělisek. Kultury byly centrifugovány, buňky resuspendovány v 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 (50 µl pufru na 1ml kultury), sonikovány 6x 15 s a suspenze byla centrifugována při 16000 g a 4 °C po dobu 20 min. Pelet obsahoval inkluzní tělíska.

Inkluzní tělíska získaná z 500ml kultury byla denaturována v 2 ml denaturačního pufru a denaturované proteiny byly renaturovány dialýzou přes noc proti čtyřem různým různým pufrům (Obr. 19):

- pufr 1 - 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,5
- pufr 2 - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,0
- pufr 3 - 20 mM Tris-NaOH, 20 mM NaCl, pH 8,6
- pufr 4 - 20 mM bis-Tris propan, 20 mM NaCl, pH 9,3



Obr. 19 SDS-PAGE analýza denaturovaných proteinů. 8% gel. St - standard. Čísla v záhlaví značí pH pufru, proti kterému byla prováděny dialýza.

Dialýzou renaturované podjednotky byly použity pro testování aktivity, avšak s negativním výsledkem.

5.1.2.2 Purifikace HPP v nativní formě

„Koexpress“ HPP se chaperony

Expresní vektory PATV a PBTVB (pro β-HPP s His-kotvou na C-konci) byly transformovány teplotním šokem do BL21(DE3) s plazmidem pGroESL, neboť jsme zjistili, že při „koexpresi“ podjednotek HPP s chaperony se podjednotky produkují v rozpustné frakci. Exprese pro produkci podjednotek probíhala po

přidání IPTG přes noc při 24 °C (podmínky exprese optimalizovány Annou Matuškovou) a následovala metaloafinitní purifikace.

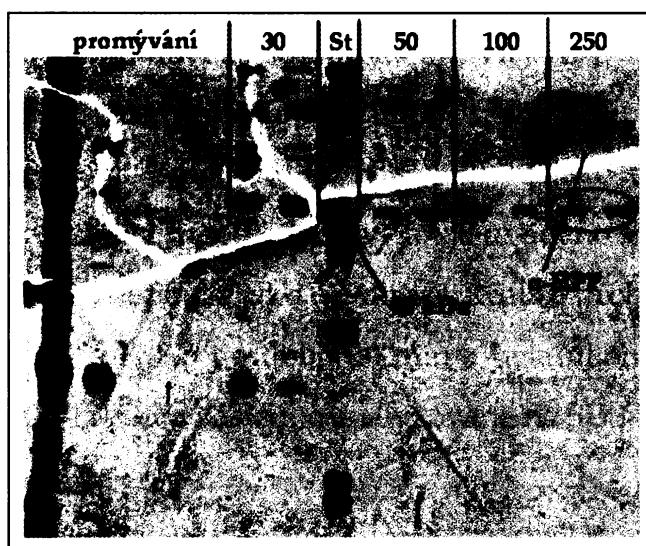
Metaloafinitní purifikace HPP

Kultury pro přípravu α- (bez His-kotvou) a β-podjednotky (s His-kotvou na C-konci; β-HPP+) byly centrifugovány, buňky byly resuspendovány v 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 (50 µl pufru na 1ml kultury), sonikovány 6x 15 s za chlazení na ledu a suspenze byla centrifugována při 16000 g a 4 °C po dobu 20min.

α-HPP a β-HPP+ produkované v rozpustné formě byly spojeny v molárním poměru 5:1 za přítomnosti 2 mM MnCl₂ a ponechány 30 min na ledu. Vzorek byl centrifugován při 16000g a 4 °C po dobu 20 min a supernatant postoupen metaloafinitní purifikaci na kolonce s niklovou náplní.

Kolonka HiTrap Chelating byla připravena dle pokynů výrobce. Dále byla kolonka ekvilibrována puforem 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 a poté byl na kolonku aplikován vzorek. Kolonka se vzorkem byla promyta ekvilibračním puforem a bylo jímáno 10 frakcí po 1 ml. Následovala eluce 4 různými puframi se stoupající koncentrací imidazolu (jímáno bylo vždy 5 frakcí po 1 ml; Obr. 20):

- pufr 1 - 20 mM Tris-HCl, 20 mM, 30mM imidazol, pH 8,6
- pufr 2 - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 50mM imidazol, pH 8,6
- pufr 3 - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100mM imidazol, pH 8,6
- pufr 4 - 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 250mM imidazol, pH 8,6



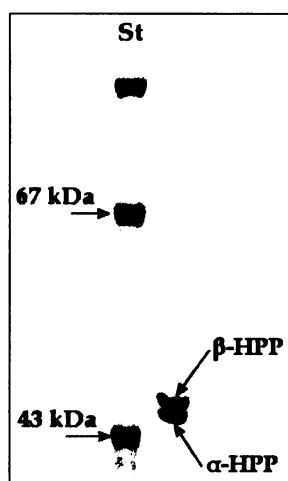
Obr. 20 SDS-PAGE analýza frakcí po metaloafinitní purifikaci αβ-dimeru HPP. 10% gel. Čísla v záhlaví obrázku odpovídají koncentraci imidazolu (mM) v elučním pufru. Kvalita obrázku nedovoluje dostatečné rozlišení α- a β-HPP (viz Obr. 21).

Frakce, kde se nacházel $\alpha\beta$ -dimer HPP (eluce 250 mM imadazolem) byly odsoleny pomocí gelové chromatografie.

Odsolení dimeru $\alpha\beta$ -HPP

Frakce obsahující $\alpha\beta$ -dimer HPP byly spojeny a odsoleny na kolonce HiTrap Desalting. Při práci s kolonkami byly dodržovány pokyny výrobce.

Vzorek byl odsolen do pufru 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 (Obr. 21), ve kterém byl uchováván při -70 °C i po několik týdnů.



Obr. 21 SDS-PAGE analýza purifikace $\alpha\beta$ -dimeru HPP.
7% gel. St - standard.

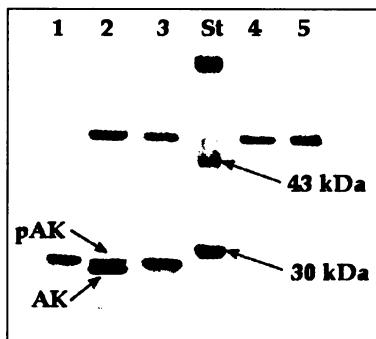
5.1.2.3 Stanovení stability HPP

$\alpha\beta$ -dimer HPP byl uchováván v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 při -70 °C. Při testech s pAK jako substrátem je takto uchovávaná HPP aktivní i po měsíci, avšak při testech s fluorogenním substrátem dochází ke snížení aktivity již po 2-3 týdnech (zjištěno Annou Matuškovou).

5.1.2.4 Stanovení podmínek aktivity HPP

HPP je aktivní jako $\alpha\beta$ -dimer

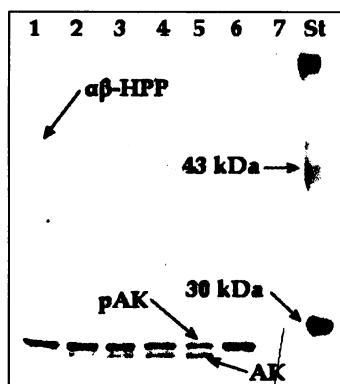
Testovali jsme, zda je HPP aktivní jako $\alpha\beta$ -dimer nebo zda jsou pro aktivitu dostačující β -podjednotky, jak je uváděno v publikaci [100]. Bylo zjištěno, že HPP je aktivní pouze jako $\alpha\beta$ -dimer. Reakce probíhala v pufru 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,6 po dobu 30 min a byla ukončena přidáním vzorkového pufru pro SDS-PAGE a následně analyzována na SDS-PAGE (Obr. 22).



Obr. 22 SDS-PAGE analýza. 7% gel. 1 - pouze pAK, 2 - $\alpha\beta$ -HPP + pAK, β -HPP + pAK, 4 - pouze β -HPP, 5 - pouze $\alpha\beta$ -HPP. St - standard. pAK, -prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

Hledání optimálních podmínek pro aktivitu HPP

Dále jsme měnili různé podmínky reakce a snažili se najít optimální podmínky pro aktivitu $\alpha\beta$ -HPP (viz 3.3.3.7). Výsledky jsou uvedeny ve formě obrázků, které byly vytvořeny na základě výsledků SDS-PAGE analýzy aktivity HPP po 16 minutách reakce. Na Obr. 23 je pak ukázka celého průběhu reakce.

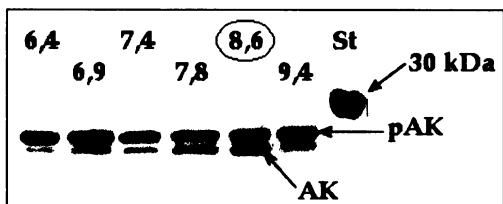


Obr. 23 Ukázka SDS-PAGE analýzy aktivity $\alpha\beta$ -HPP pro hledání optimálních podmínek aktivity. 12% gel. 1 - $\alpha\beta$ -HPP + pAK po 2 min reakce, 2 - po 4 min, 3 - po 8 min, 4 - po 16 min, 5 - po 32 min, 6 - pouze pAK, 7 - pouze $\alpha\beta$ -HPP. St - standard. pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

Při hledání optimálních podmínek pro aktivitu HPP jsme postupovali tak, že nejdříve jsme optimalizovali jednu podmínsku a při hledání dalších podmínek byl pufr pro reakci volen s ohledem na již optimalizované podmínky.

Vliv pH na aktivitu HPP

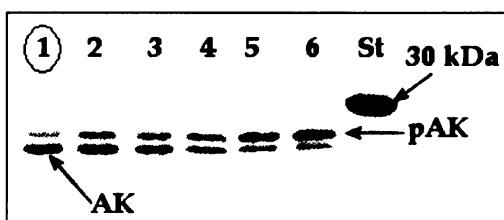
Při pH 8,6 je zřetelně vidět, že poměr intenzit proužků AK/pAK je nejvyšší a že při tomto pH je HPP nejaktivnější (Obr. 24).



Obr. 24 Vliv pH na aktivitu HPP. 12% gel. Čísla v záhlaví obrázku představují hodnoty pH. St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

Vliv koncentrace NaCl na aktivitu HPP

Při 10 mM koncentraci NaCl je vidět, že poměr intenzit proužků AK/pAK je nejvyšší a že při této koncentraci je HPP nejaktivnější (Obr. 25). Při koncentracích NaCl nad 200 mM dochází k úplné ztrátě aktivity.

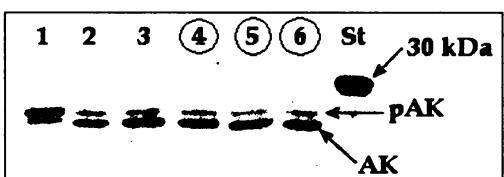


Obr. 25 Vliv koncentrace NaCl na aktivitu HPP. 12% gel. 1 - 10 mM NaCl, 2 - 20 mM, 3 - 40 mM, 4 - 60 mM, 5 - 80 mM, 6 - 100 mM NaCl. St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

Vliv iontů přechodných kovů na aktivitu HPP

- MnCl₂

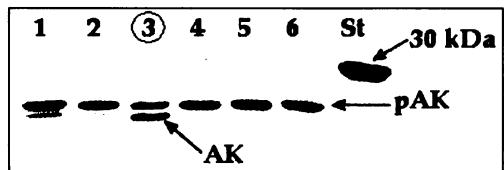
Od 1 mM a vyšší koncentrace MnCl₂ je vidět, že poměr intenzit proužků AK/pAK je nejvyšší a že při těchto koncentracích je HPP nejaktivnější (Obr. 26).



Obr. 26 Vliv koncentrace MnCl₂ na aktivitu HPP. 12% gel. 1 - 0 mM MnCl₂, 2 - 0,25 mM, 3 - 0,5 mM, 4 - 1 mM, 5 - 1,5 mM, 6 - 2 mM MnCl₂. St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

- ZnCl₂

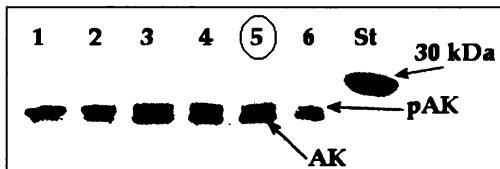
Při 1 µM koncentraci ZnCl₂ je zřetelně vidět, že poměr intenzit proužků AK/pAK je nejvyšší a že při této koncentraci je HPP nejaktivnější (Obr. 27).



Obr. 27 Vliv koncentrace ZnCl₂ na aktivitu HPP. 12% gel. 1 - 0 mM ZnCl₂, 2 - 100 nM, 3 - 1 µM, 4 - 10 µM, 5 - 100 µM, 6 - 1 mM ZnCl₂. St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

- CoCl_2

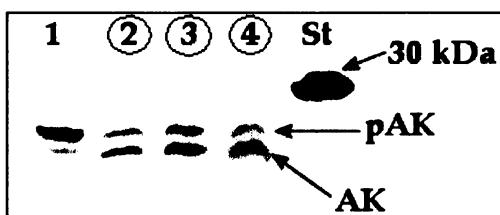
Při 100 μM koncentraci CoCl_2 je vidět, že poměr intenzit proužků AK/pAK je nejvyšší a že při této koncentraci je HPP neaktivnější (Obr. 28).



Obr. 28 Vliv koncentrace CoCl_2 na aktivitu HPP. 12% gel. 1 - 0 mM CoCl_2 , 2 - 100 nM, 3 - 1 μM , 4 - 10 μM , 5 - 100 μM , 6 - 1 mM CoCl_2 . St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

Porovnání vlivu MnCl_2 , ZnCl_2 a CoCl_2

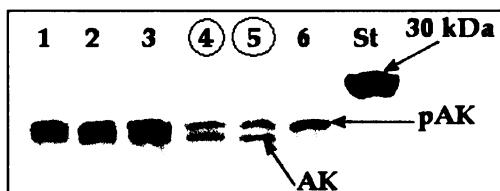
Aktivita HPP je při všech těchto koncentracích přechodných kovů srovnatelná, nepatrne vyšší je v přítomnosti 100 μM CoCl_2 (Obr. 29).



Obr. 29 Vliv koncentrace MnCl_2 , ZnCl_2 a CoCl_2 na aktivitu HPP. 12% gel. 1 - bez iontů, 2 - 2 mM MnCl_2 , 3 - 1 μM ZnCl_2 , 4 - 100 μM CoCl_2 . St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

Vliv teploty na aktivitu HPP

Při teplotě 33 a 37 °C je zřetelně vidět, že poměr intenzit proužků AK/pAK je nejvyšší a že při těchto teplotách je HPP neaktivnější (Obr. 30).



Obr. 30 Vliv teploty na aktivitu HPP. 12% gel. 1 - 20 °C, 2 - 25 °C, 3 - 30 °C, 4 - 33 °C, 5 - 37 °C, 6 - 44 °C. St - standard, pAK - prekurzor adenylátkinasy, AK - adenylátkinasa s odštěpenou signální sekvencí.

5.1.3 Kvasinkový dvouhybridový systém

5.1.3.1 Příprava plazmidových konstruktů

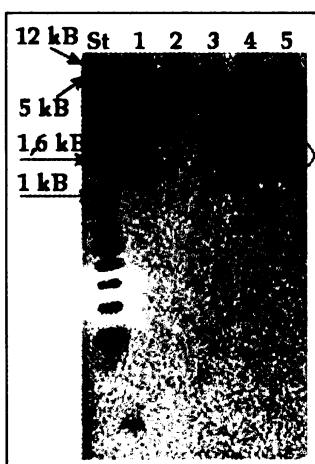
Pro testování interakcí podjednotek MPP a HPP byla připravena série plazmidových konstruktů, viz Tabulka 1.

α -HPP	pLexTVA	pB42TVA	JATV	
β -HPP	pLexTVB	pB42TVB	JBTV	
α -MPP	pLexYA *	pB42YA *	pJAKYA	
β -MPP	pLexYB *	pB42YB	pJAKYB	

Tabulka 1 Značení připravených a použitých konstruktů. Konstrukty značené * již byly připraveny dříve (Alexander Gakh). pJAKO je klonovaný vektor připravený v naší laboratoři.

Restrikce vektorů

Všechny vektory (pLexA, pB42AD, JATV, JBTV a pJAKYB) byly štěpeny restrikčními enzymy EcoRI a XhoI. Štěpeno bylo vždy cca 10 µg vektoru ve 200 µl reakci. Směs byla poté rozdělena agarosové elektroforéze (Obr. 31) a příslušné fragmenty byly izolovány. Jako reakční pufr byl zvolen NeBuffer pro EcoRI a do reakce bylo přidáno BSA („bovine serum albumin“) do výsledné koncentrace 100 µg.ml⁻¹. Fragmenty pLexA a pB42AD byly dále opracovány CIP.



Obr. 31 Restrikce vektoru EcoRI/XhoI. 1% gel. 1 - pLexA, 2 - pB42AD, 3 - JATV, 4 - JBTV, 5 - pJAKYB, St - standard. Zakroužkovány jsou fragmenty DNA, které byly izolovány z gelu.

Vložení fragmentů do kvasinkových vektorů

Fragmenty (1275bp pro JATV, 1272bp pro JBTV a 1382bp pro pJAKYB) nesoucí geny pro příslušné podjednotky MPP nebo HPP byly vloženy do kvasinkových vektorů pLexA a pB42AD.

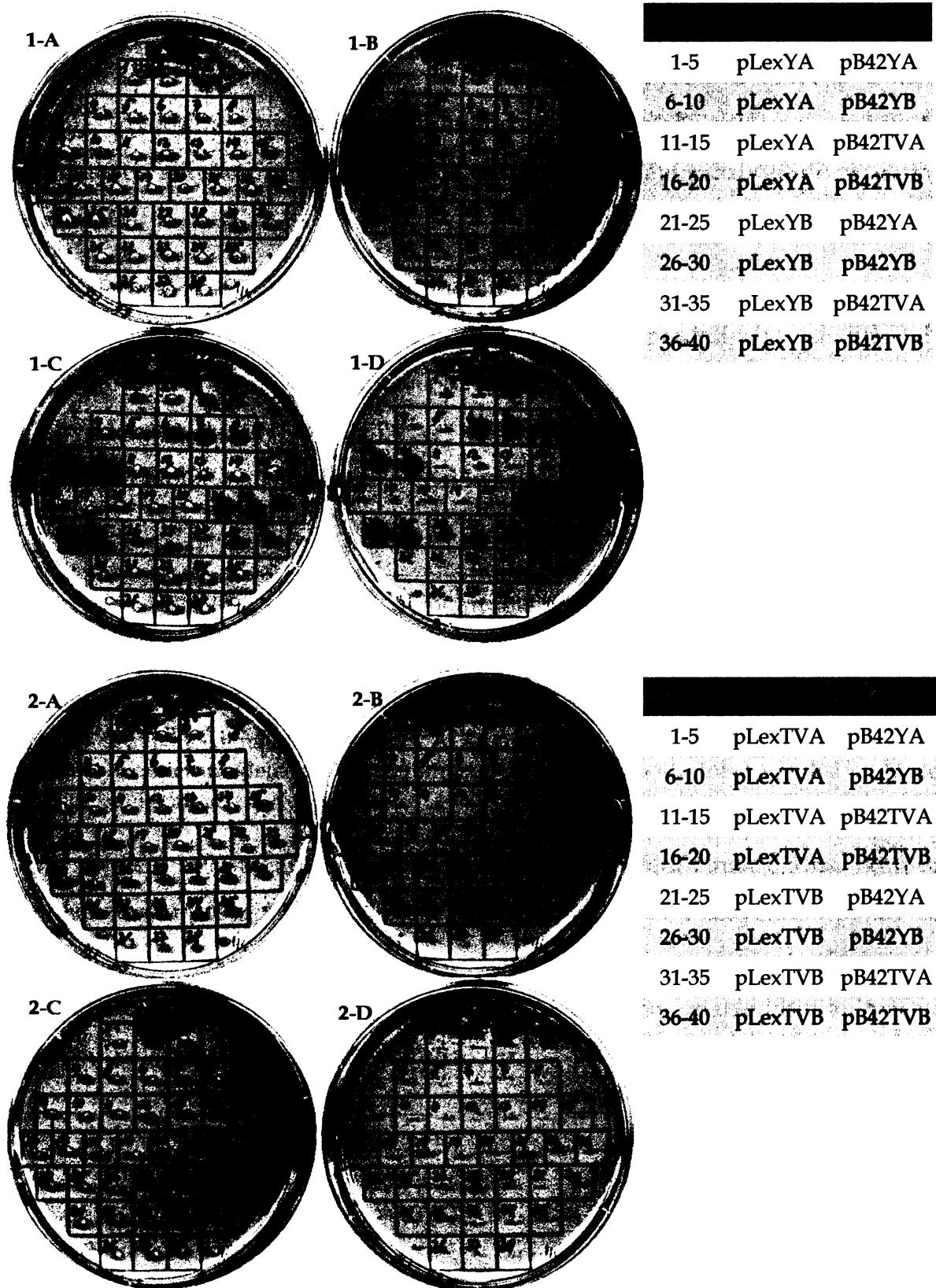
Legační reakce probíhala 1,5 hod při laboratorní teplotě. Též byla prováděna negativní kontrola, kdy reakce probíhala bez fragmentu. 10 µl poté bylo odebráno a byla provedena transformace buněk JM109 elektroporací. Buňky byly vysety na plotny s LB agarem obsahujícím ampicilin.

Přes noc vyrostlo několik desítek kolonií. Z pěti z nich byl izolován plazmid, který byl podroben restrikční kontrole enzymy EcoRI/XhoI. Vždy byl vybrán jeden konstrukt s pozitivní kontrolou, který byl označen dle Tabulky 1 uvedené výše.

5.1.3.2 Testování interakcí podjednotek MPP A HPP

Byly testovány interakce podjednotek MPP a HPP. Byla připravena série konstruktů pro tyto podjednotky odvozených od plazmidů pLexA a pB42AD (kapitola 5.1.3.1) a testování proteinových interakcí bylo provedeno tak, jak je uvedeno v kapitole 4.2.4.1.

Nebyly nalezeny žádné interakce podjednotek HPP, pouze byly potvrzeny známé interakce mezi podjednotkami MPP (Obr. 32), které tak *de facto* sloužily jako další kontroly. Paralelně byly prováděny negativní a pozitivní kontroly.



Obr. 32 Testování interakcí podjednotek HPP a MPP. Značení misek A-D odpovídá značení indukčních agarů (viz Obr.14 v 3.3.4.1). Zkratky v tabulkách značí kvasinkové (Y) nebo *T. vaginalis* (TV) podjednotky MPP (A pro α , B pro β) v příslušných plazmidech pro kvasinkový dvouhybridový systém (pLex pro pLexA, pB42 pro pB42AD).

5.1.4 Mitochondriální „processing“ peptidasa

Metodami molekulární dynamiky byla studována glycinová smyčka α -MPP (GRL), konkrétně mechanismus interakce signálních sekvencí substrátů s glycinovou smyčkou, a dále pak mechanismus vtahování substrátů do aktivního centra MPP.

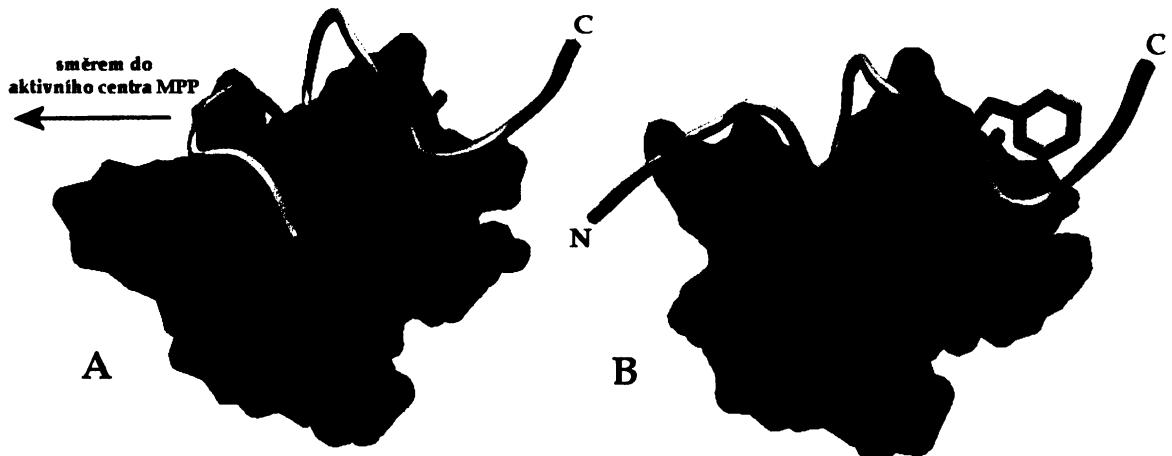
5.1.4.1 Volná dynamika výchozího modelu MPP

Při stavbě výchozího modelu jsme vycházeli z našich předešlých výsledků, kdy byla simulována interakce glycinové smyčky α -MPP se signální sekvencí potkaní aldehyddehydrogenasy (pALDH) [67]. pALDH byla mutována v programu PyMOL na signální sekvenci kvasinkové malátdehydrogenasy (pMDH; Obr. 33).

GPRKIRI	LEYK	- signální sekvence krysí ALDH	
MESIVAVRA	TSST	- signální sekvence kvasinkové MDH	
2	9	13	- pozice reziduů v pMDH

Obr. 33 Srovnání signálních sekvencí ALDH a MDH. Šedě jsou zvýrazněna rezidua přítomná v našich modelech. Podrtžením jsou zvýrazněna hydrofobní rezidua směřující směrem ke glycinové smyčce MPP.

Systém byl stabilní po celou dobu simulace, která činila 8,3 ns. Po 6 ns simulace došlo postupně k odklonění fenylalaninu signální sekvence v pozici 10, rozvolnění 2^o struktury a současně k nasměrování N-konce signální sekvence do aktivního centra MPP (Obr. 34). V Přílohách na CD jsou k nahlédnutí animace a PDB soubory použitých a získaných struktur.



Obr. 34 Grafické znázornění modelů pro testování interakce glycinové smyčky α -MPP (zvýrazněna šedě, rezidua 283-303) se signální sekvencí MDH (zvýrazněna žlutě; rezidua 2-13). V signální sekvenci jsou zvýrazněna hydrofobní rezidua alaninu a fenylalaninu. N a C značí příslušný konec signální sekvence. A - výchozí model, B - model po 8,3ns dlouhé simulaci, kdy dochází k odklonění fenylalaninu a naorientování N-konce směrem do aktivního centra MPP. V Přílohách na CD jsou k nahlédnutí animace a PDB soubory použitých a získaných struktur.

5.1.4.2 Translokace substrátu do aktivního centra MPP

Mechanismus translokace substrátu z GRL do aktivního centra MPP byl studován metodou cílené dynamiky.

Příprava výchozích koordinát

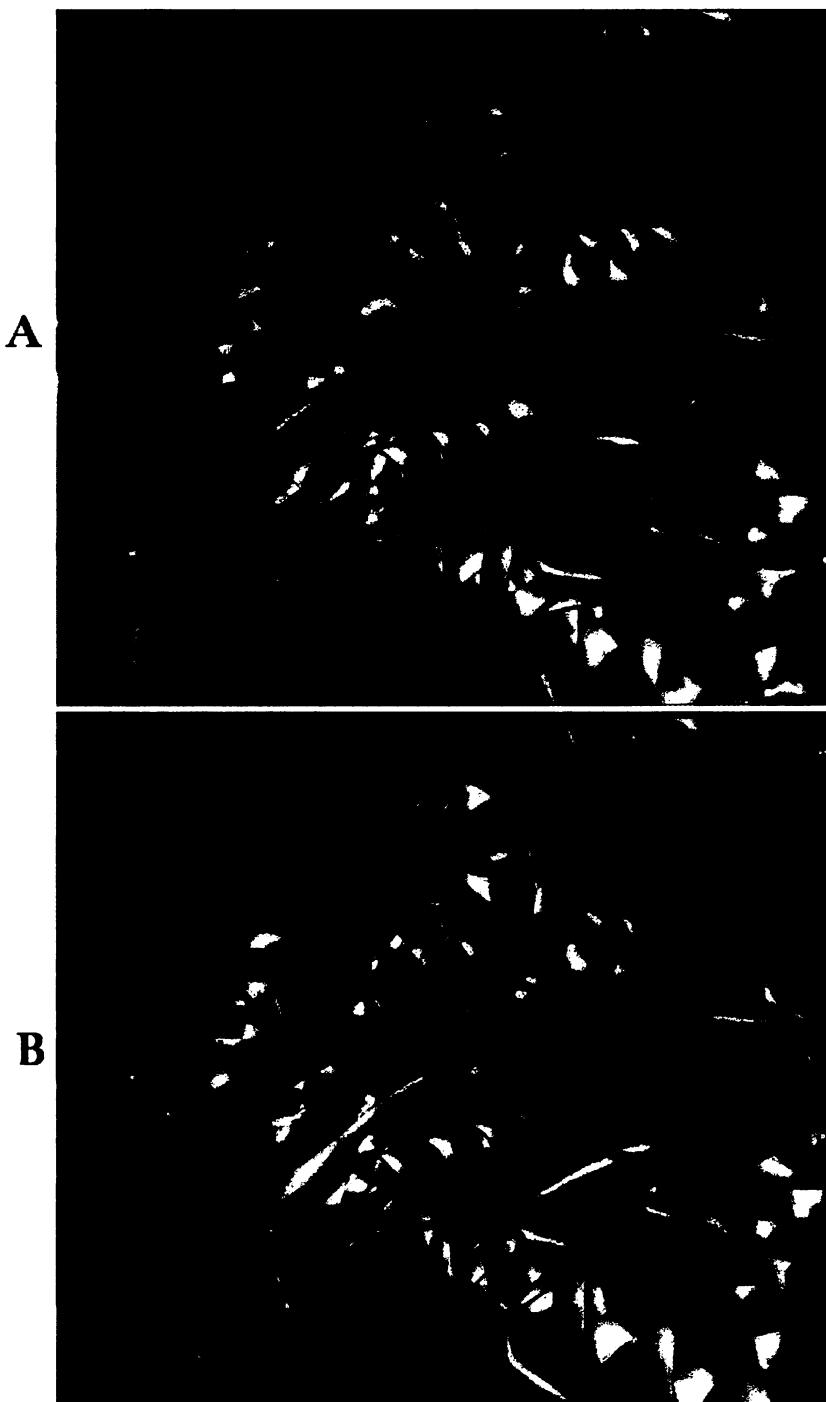
Výchozí koordináty byly převzaty z výsledků volné dynamiky výchozího modelu po 1 ns dlouhé simulaci, tj. po relaxaci systému.

Příprava cílových koordinát

Cílové koordináty byly generovány na základě krystalové struktury MPP. V této krystalové struktuře se však nachází jen část signální sekvence pMDH v aktivním centru (rezidua 2-9). Proto bylo nutné na C-konec přidat rezidua 10-13. Struktura těchto čtyř C-koncových reziduí byla převzata z výsledků volné dynamiky. Takto vytvořený model MPP se signální sekvencí v aktivním centru byl ponechán relaxovat volnou dynamikou po dobu 0,5 ns a následně byly vygenerovány jeho cílové koordináty pro cílenou dynamiku.

Vlastní cílená dynamika

Bylo testováno několik protokolů, které si lišily v časovém intervalu, po který cílená dynamika probíhala (0,5 ns, 1,0 ns a 1,6 ns), avšak dosažené výsledky byly srovnatelné. Během vtahování signální sekvence dochází ke konformační změně glycinové smyčky, která se tak orientuje serinem v pozici 290 směrem do aktivního místa – viz Obr. 35 a jeho popis. V Přílohách na CD jsou k nahlédnutí animace a PDB soubory použitých a získaných struktur.

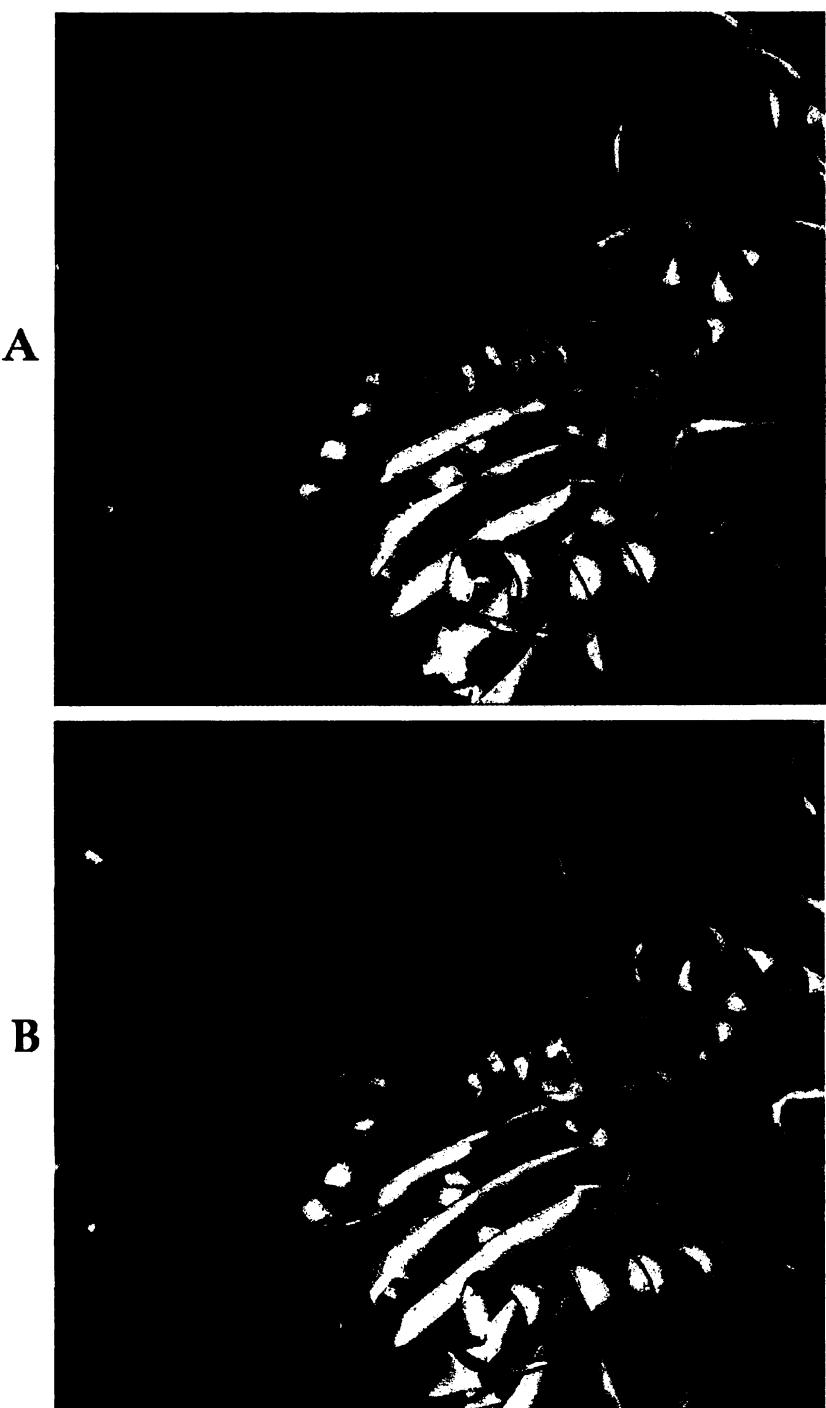


Obr. 35 Grafické znázornění výsledků 1 ns dlouhé cílené dynamiky. Oranžově je zvýrazněna α -MPP, červeně GRL (rezidua 283-303), žlutě β -MPP, zeleně C-konec signální sekvence (rezidua 2-9) a fialově odštěpovaný N-konec signální sekvence (rezidua 10-13). V signální sekvenci jsou zvýrazněna hydrofobní rezidua fenylalaninu a alaninu. V GRL jsou zvýrazněna rezidua methioninu, lizinu a serinu. V β -MPP je zvýrazněn zinekovazebný motiv H-X-X-E-H-X₇₆-E a bílou sférou je zvýrazněn ion zinku. A - signální sekvence interagují s GRL na základě hydrofobní interakce mezi zvýrazněnými příslušnými rezidui. GRL je stabilizována dvěma vodíkovými vazbami mezi lysinem a serinem (bílé tečkované čáry). B - signální sekvence je uchycena v aktivním centru MPP. GRL výrazně změnila svou konformaci a vodíkové vazby mezi lysinem a serinem v GRL jsou zrušeny. V Přílohách na CD jsou k nahlédnutí animace a PDB soubory.

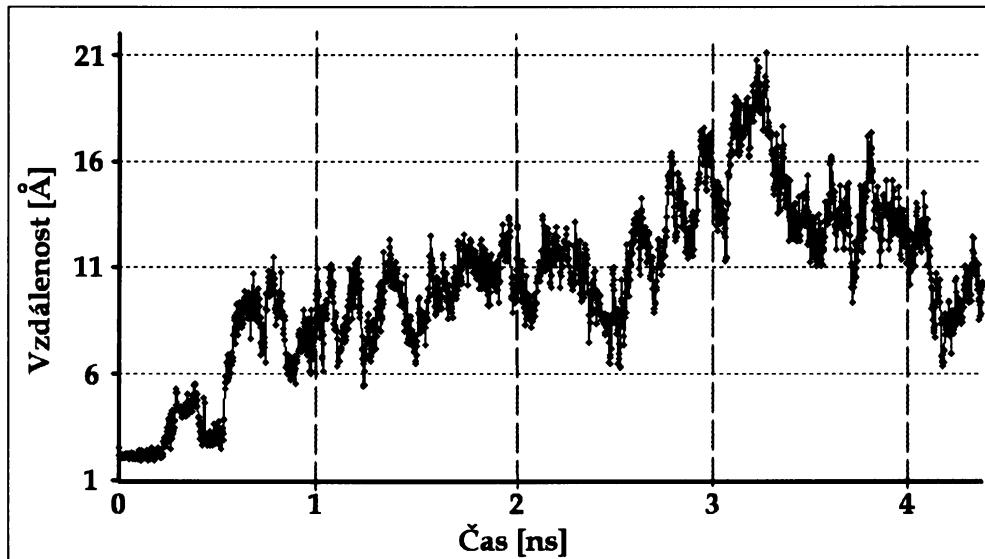
4.1.4.3 Volná dynamika po proteolýze substrátu v aktivní centru MPP

Model pro volnou dynamiku po proteolýze signální sekvence v aktivním místu MPP byl vytvořen na základě cílových koordinát pro cílenou dynamiku. Peptidová vazba mezi rezidui 9 a 10 signální sekvence byla v programu PyMOL rozštěpena a systém byl postoupen volné dynamice.

Během simulace došlo k velmi výraznému oddálení peptidového N- a C-konce až na 21 Å, které vznikly po rozštěpení signální sekvence mezi rezidui 9 a 10 (Obr. 37). Zároveň došlo ke změně konformace glycinové smyčky (Obr. 36), která tak získala podobnou konformaci, jakou měla během volné dynamiky s interagující signální sekvencí (Obr. 35). Současně s oddalováním N- a C-konce peptidové vazby v místě proteolýzy dochází u reziduí 2-9 signální sekvence ke ztrátě stabilní konformace a tento peptid se stává nestrukturovaným. V Přílohách na CD jsou k nahlédnutí animace a PDB soubory použitých a získaných struktur.



Obr. 36 Grafické znázornění výsledků volné dynamiky po proteolýze signální sekvence v aktivním centru MPP. Oranžově je zvýrazněna α -MPP, červeně GRL (rezidua 283-303), žlutě β -MPP, zeleně C-konec signální sekvence (rezidua 2-9) a fialově odštěpený N-konec signální sekvence (rezidua 10-13). V signální sekvenci jsou zvýrazněna hydrofobní rezidua fenylalaninu a alaninu. V GRL jsou zvýrazněna rezidua methioninu, lysinu a serinu. V β -MPP je zvýrazněn zinek-vazebný motiv H-X-X-E-H-X₇₆-E a bílou sférou je zvýrazněn ion zinku. A - výchozí stav na začátku simulace. B - konečný stav po 2,5 ns dlouhé simulaci, kdy došlo k výraznému oddálení N- a C-konce v místě proteolýzy signální sekvence (Graf 1) a zároveň ke změně konformace GRL. Odštěpená signální sekvence ztrácí svoji původní konformaci. V Přílohách na CD jsou k nahlédnutí animace a PDB soubory získaných a použitých struktur.



Obr. 37 Oddalování N- a C-konce v místě proteolýzy signální sekvence mezi rezidui 9 a 10.

5.2 Diskuse

V naší laboratoři je studován mechanismus rozpoznávání a proteolytické úpravy substrátů peptidasami mitochondriálního typu, konkrétně mitochondriální (*S. cerevisiae*) a hydrogenosomální „processing“ peptidasou (*T. vaginalis*).

Přestože je MPP studována od 80. let 20. století a jedná se tak již o poměrně dobře popsaný enzym, stále zůstávají nejasné některé části mechanismu proteolytické úpravy substrátů. Jedním takovým nejasným okamžikem je mechanismus prvotního kontaktu substrátu s MPP a dále pak mechanismus vtahování substrátu do aktivního centra MPP. Proto jde v případě MPP o snahu detailně objasnit tyto fáze v procesu proteolytické úpravy substrátů MPP.

Výrazným elementem α-podjednotky MPP je tzv. glycinová smyčka, která je mezidruhově téměř absolutně konzervovaná a je esenciální pro funkci MPP [85]. Nachází se zde absolutně konzervované zbytky Lys 296 a Met 298, které jsou exponovány na povrch, což u hydrofobních reziduí nebývá obvyklé. Měřením tryptofanové fluorescence bylo prokázáno, že během interakce α-podjednotky se substrátem dochází ke konformační změně právě v oblasti glycinové smyčky [69]. Tyto poznatky nás vedly k myšlence, že místem prvotního kontaktu je právě glycinová smyčka, a že se zde uplatňuje princip rozpoznávání totožný s mechanismem, kterým receptor Tom20 rozpoznává signální sekvence proteinů během jejich transportu přes vnější membránu mitochondrie. Za účelem potvrzení této hypotézy byly použity metody molekulární dynamiky, kterými byla úspěšně testována interakce glycinové smyčky se signální sekvencí potkaní ALDH [67]. Jedním z cílů této diplomové práce bylo ověřit tyto výsledky, respektive ověřit interakci glycinové smyčky se signální sekvencí kvasinkové MDH, a dále pak simulovat mechanismus vtahování signální presekvence do aktivního centra MPP. MDH byla zvolena proto, že jde o modelový substrát, se kterým experimentálně pracujeme v laboratoři, a dále také proto, že byla publikována krystalová struktura komplexu MPP se signální sekvencí MDH v aktivním centru [60].

Naše úroveň poznání funkce HPP je oproti MPP nesrovnatelně nižší. O HPP existuje pouze jedna publikace [100], kde autoři shrnují, že HPP je aktivní jako $\beta\beta$ -dimer (jako substrát používají fluorogenní peptid odvozený od signální sekvence pAK). Sekvenční data však ukazují na přítomnost hydrogenosomálního proteinu *T. vaginalis* s vysokou homologií s α -MPP, zvláště pak v oblasti glycinové smyčky (GRLP z anglického „glycine rich loop-like protein“). Tyto výsledky jsou proto z logického pohledu poněkud zarážející a překvapivé. Nicméně v porovnání s glycinovou smyčkou α -MPP je hypotetická glycinová smyčka GRLP kratší a neobsahuje konzervovaný Lys 296 i některá další rezidua. Chtěli jsme proto prověřit hypotézu, zda GRLP *T. vaginalis* nemůže plnit funkci α -podjednotky podobně jako v případě MPP, která je aktivní pouze jako $\alpha\beta$ -dimer.

Nutným prvním krokem pro prokázání, že HPP funguje jako $\alpha\beta$ -dimer, byla příprava substrátu. Jako modelový substrát byla zvolena adenylátkinasa *T. vaginalis* (pAK), protože bylo prokázáno, že nese signální sekvenci nutnou pro transport do hydrogenosomů. Dalším důvodem bylo, že autoři publikace [100] používají ve svých experimentech jako substrát pro své pokusy peptid odvozený od signální sekvence AK.

Gen pro pAK byl vložen do expresního vektoru a byla provedena exprese. Během purifikace pAK se však nedařilo získat pAK zcela čistou, na SDS-PAGE byly vždy patrné dva proužky blízko sebe. Proto byly měněny různé podmínky při metaloafinitní purifikaci, neboť jsme se domnívali, že se jedná o nespecifickou interferenci cizího proteinu podobné velikosti jako pAK. Interferující protein se však podařilo tímto způsobem eliminovat jen z části. Když však byla prováděna purifikaci rychle a důsledně za chladu, podařilo se interferující protein téměř eliminovat. Usoudili jsme, že během purifikace dochází k částečné proteolýze heterologního proteinu nedefinovou peptidasou z buněk *E. coli*. Proto byly během purifikace testovány různé inhibitory proteas (leupeptin, PMSF), čímž byl získán protein v čisté formě. Nicméně purifikace pAK pro testování aktivity HPP byla prováděna bez inhibitorů, avšak důsledně za chladu.

Také při optimalizaci podmínek pro přípravu a testování podjednotek HPP bylo nutné překonat jisté potíže. Nejprve byla prováděna purifikaci podjednotek z inkluzních tělisek, neboť obě podjednotky se produkovaly v nerozpustné frakci. Inkluzní tělíska byla denaturována, poté renaturována dialýzou proti několika různým pufrům - α -podjednotka se však během dialýzy opakovaně z ~50% vysrážela, β -podjednotka nikoli. Při vyšších hodnotách pH bylo možné α -podjednotky získat více. Následně byla testována aktivita takto připravených podjednotek s pAK jako substrátem, ale podmínky pro získání aktivní HPP nebyly nalezeny.

Nakonec byl vypracován způsob přípravy podjednotek HPP v rozpustné frakci (protokol vypracován Annou Matuškovou). Na základě našich zkušeností s purifikací MPP bylo rozhodnuto, že HPP budeme purifikovat stejným způsobem. Proto byla β -podjednotku připravena s His-kotvou na C-konci. Před vlastní purifikací byly smíseny obě rozpustné frakce obsahující exprimované podjednotky. Tento způsob purifikace předpokládá schopnost interakce α - a β -podjednotky, které je tak možné díky His-kotvě β -podjednotky metaloafinitně purifikovat. HPP byla skutečně tímto způsobem purifikována, čímž byla mj. prokázána schopnost interakce jejích podjednotek. Tento výsledek byl prvním prokázaným rozporom s výsledky uváděnými v publikaci [100], kde autoři píší, že α - a β -podjednotka spolu neinteragují.

Kromě prokázání interakce α - a β -podjednotky bylo zjištěno, že v tomto experimentálním uspořádání je HPP aktivní pouze jako $\alpha\beta$ -dimer. β -podjednotka sama o sobě aktivitu s pAK jako substrátem nevykazuje, což je opět v rozporu s výsledky autorů publikace [100].

Interakce α - a β -podjednotky HPP byla následně testována za využití kvasinkového dvouhybridového systému. Zde se jednoznačnou interakci naopak nepodařilo prokázat. Kvasinkový dvouhybridový systém však není jednoznačnou metodou pro testování proteinových interakcí. Negativní výsledky mohly být zapříčiněny například špatnou expresí fúzních proteinů v buňkách *S. cerevisiae*.

Jinou, z našeho pohledu ale zajímavější možností je, že interakce α - a β -podjednotky je v porovnání s podjednotkami MPP velmi slabá, v důsledku čehož není detekovatelná touto metodou. Tuto možnost podporují naše další výsledky, kdy interakce podjednotek HPP byla testována gelovou chromatografií - na gelové chromatografii putuje každá podjednotka HPP zvlášť (zjištěno Annou Matuškovou), což potvrzuje, že interakce podjednotek není silná.

Ve spolupracující skupině Doc. Tachezyho byla nedávno charakterizována další peptidasa mitochondriálního typu [Ondřej Šmíd, osobní sdělení]. Konkrétně se jedná o peptidasu z mitosomů *Giardia intestinalis* (GPP, z anglického „*Giardia processing peptidase*“). Mitosomy jsou velmi redukované organely mitochondrialního typu a GPP je signální peptidasa, která je aktivní pouze jako β -podjednotka s konzervovaným HXXEHX₇₆E motivem a α -podjednotka není vůbec přítomna.

Přítomnost α -podjednotky, síla interakce peptidasových podjednotek a struktura glycinové smyčky tak, zdá se, odráží množství importovaných proteinů a variabilitu jejich signálních sekvencí, respektive odráží množství funkcí, které dané organely zajišťují. Přispět k objasnění evolučních vztahů mezi těmito peptidasami a příslušnými organelami může proto detailní pochopení funkce glycinové smyčky.

Funkce glycinové smyčky byla studována na modelu MPP pomocí metod molekulární dynamiky. Na základě našich předešlých výsledků [67] byla vytvořena modelová situace, kdy je signální sekvence MDH v interakci s glycinovou smyčkou α -podjednotky MPP a kde se uplatňují hydrofobní rezidua obou interagujících partnerů (Met 298 a Lys 296 v glycinové smyčce a Ala 6 a Phe 10 v signální sekvenci). Naše předešlé výsledky [67] byly potvrzeny. Během simulace došlo k „nasměrování“ N-konce signální sekvence směrem do aktivního místa a zároveň došlo k odklonění fenylalaninu v pozici 10 signální sekvence, což naznačuje, že interakce není vůbec silná, ale má přechodný charakter.

Zajímavých výsledků bylo dosaženo využitím cílené dynamiky, kdy bylo simulováno vtahování signální sekvence do aktivního centra MPP. Na pohyb signální sekvence glycinová smyčka reaguje velmi výraznou změnou své konformace, kdy dochází v oblasti Ser 290 k jejímu „vyklopení“ směrem do aktivního místa. Dochází k přerušení tří vodíkových vazeb mezi Ser 290, Ala 291 a Lys 296, které jinak stabilizují glycinovou smyčku, ale nedochází k přerušení vodíkových vazeb mezi zbytky glycinu glycinové smyčky a sousedících β -listů a- a β -podjednotky, jak navrhovala jedna z našich hypotéz. Stabilizace zmíněnými třemi vodíkovými vazbami však není silná, během volné dynamiky samotné MPP dochází k jejich periodickému rušení a opětovnému ustanovování, což vysvětluje flexibilitu glycinové smyčky.

Následně byla simulována situace po proteolýze signální sekvence. Zatímco před proteolýzou je signální sekvence pevně uchycena v aktivním centru v dané konformaci, po proteolýze ztrácí signální sekvence svoji původní konformaci a relativně rychle se stává nestrukturovanou. Zároveň se změnou konformace odštěpené signální sekvence dochází k další konformační změně glycinové smyčky, která částečně získává svoji původní konformaci, již měla před simulováním vtahování signální sekvence do aktivního centra.

Výsledky molekulární dynamiky tak naznačují možný mechanismus rozpoznávání a translokace signálních sekvencí, avšak k plnému pochopení celého procesu máme ještě daleko. Je však jisté, že glycinová smyčka se v tomto procesu uplatňuje jako velmi citlivě vyvážený a velmi flexibilní element.

6. ZÁVĚR

Z výsledků získaných v diplomové práci vyplývá, že její cíle byly splněny. Konkrétně bylo zjištěno:

1. Byla nalezena interakce α - a β -podjednotky HPP a bylo zjištěno, že podobně jako MPP je i HPP aktivní jako $\alpha\beta$ -dimer. To je v rozporu s výsledky autorů Brown a kol. [100]. Byly optimalizovány podmínky purifikace HPP, a též byla sledována stabilita enzymu za různých podmínek skladování.
2. Jako substrát pro HPP byl zvolen prekurzor adenylátkinasy. Za tímto účelem byl připraven expresní vektor, byly optimalizovány podmínky exprese a purifikace a též byla sledována stabilita substrátu za různých podmínek skladování.
3. Aktivita HPP byla sledována za různých podmínek a byly optimalizovány podmínky pro maximální aktivitu HPP s pAK jako substrátem.
4. Interakce α - a β -podjednotek HPP a MPP byla dále testována za využití kvasinkového dvouhybridového systému. Proto byly připraveny příslušné plazmidové konstrukty a bylo provedeno testování interakcí zmíněných podjednotek. Interakci podjednotek HPP v tomto experimentálním uspořádání nebyly nalezeny, což naznačuje, že interakce podjednotek HPP je slabší než v případě podjednotek MPP.
5. Pomocí metod molekulární dynamiky byl studován mechanismus rozpoznávání substrátů MPP v GRL, a dále byl studován mechanismus vtahování substrátů do aktivního centra MPP. Též byla studována situace po proteolýze signální sekvence v aktivním centru MPP.

7. SEZNAM LITERATURY

1. Margulis, L. and D. Bermudes, *Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory*. *Symbiosis*, 1985. 1: p. 101-24.
2. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. *Science*, 1999. 283(5407): p. 1476-81.
3. Andersson, S.G., *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. *Nature*, 1998. 396(6707): p. 133-40.
4. Dyall, S.D., M.T. Brown, and P.J. Johnson, *Ancient invasions: from endosymbionts to organelles*. *Science*, 2004. 304(5668): p. 253-7.
5. Andersson, S.G. and C.G. Kurland, *Origins of mitochondria and hydrogenosomes*. *Curr Opin Microbiol*, 1999. 2(5): p. 535-41.
6. Andersson, S.G., *Bioenergetics of the obligate intracellular parasite Rickettsia prowazekii*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1365(1-2): p. 105-11.
7. Martin, W. and M. Muller, *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*. *Nature*, 1998. 392(6671): p. 37-41.
8. Moreira, D. and P. Lopez-Garcia, *Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis*. *J Mol Evol*, 1998. 47(5): p. 517-30.
9. Lopez-Garcia, P. and D. Moreira, *Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes*. *Trends Biochem Sci*, 1999. 24(3): p. 88-93.
10. Bernard, C. and T.O.M. Fenchel, *Chemosensory Behaviour of Strombidium purpureum, an Anaerobic Oligotrich with Endosymbiotic Purple Non-Sulphur Bacteria*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1994. 41(4): p. 391-396.
11. Vellai, T., K. Takacs, and G. Vida, *A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes*. *J Mol Evol*, 1998. 46(5): p. 499-507.
12. Fenchel, T. and C. Bernard, *A purple protist*. *Nature*, 1993. 362: p. 300.
13. Foury, F., *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1998. 440(3): p. 325-31.
14. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. *Science*, 1996. 274(5287): p. 546, 563-7.
15. Hartl, F.U., Pfanner, N., Nicholson, D. W., Neupert, W., *Mitochondrial protein import*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. 988(1): p. 1-45.
16. Cerkasovova, A., Cerkasov, J., Kulda, J., Reischig, J., *Circular DNA and cardiolipin in hydrogenosomes, microbody-like organelles of trichomonads*. *Folia Parasitol (Praha)*, 1976. 23(1): p. 33-7.
17. Lindmark, D.G. and M. Muller, *Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate Tritrichomonas foetus, and its role in pyruvate metabolism*. *J Biol Chem*, 1973. 248(22): p. 7724-8.
18. Muller, M., *The hydrogenosome*. *J Gen Microbiol*, 1993. 139(12): p. 2879-89.
19. Boxma, B., et al., *An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen*. *Nature*, 2005. 434(7029): p. 74-9.
20. Sutak, R., et al., *Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(28): p. 10368-73.

21. Embley TM, H.D., Hirt RP, *Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria?* Trends Ecol Evol, 1997. 12: p. 437-441.
22. Germot, A., H. Philippe, and H. Le Guyader, *Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in Trichomonas vaginalis suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(25): p. 14614-7.
23. Hashimoto, T., et al., *Secondary absence of mitochondria in Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 6860-5.
24. Hirt, R.P., et al., *A mitochondrial Hsp70 orthologue in Vairimorpha necatrix: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria.* Curr Biol, 1997. 7(12): p. 995-8.
25. Roger, A.J., C.G. Clark, and W.F. Doolittle, *A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist Trichomonas vaginalis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(25): p. 14618-22.
26. Roger, A.J., et al., *A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in Giardia lamblia: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(1): p. 229-34.
27. Muller, M., *Evolutionary origins of trichomonad hydrogenosomes.* Parasitol Today, 1997. 13(5): p. 166-7.
28. Dietmeier, K., et al., *Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore.* Nature, 1997. 388(6638): p. 195-200.
29. Dekker, P.J., et al., *The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44.* Embo J, 1997. 16(17): p. 5408-19.
30. Duby G. and B. M., *Mitochondrial protein import machinery and targeting information.* Plant Science, 2002. 162(4): p. 477-490.
31. Moriwaki, K., T. Ogishima, and A. Ito, *Analysis of recognition elements for mitochondrial processing peptidase using artificial amino acids: roles of the intervening portion and proximal arginine.* J Biochem, 1999. 126(5): p. 874-8.
32. Hendrick, J.P., P.E. Hodges, and L.E. Rosenberg, *Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(11): p. 4056-60.
33. Murcha, M.W., et al., *The N-terminal extension of plant mitochondrial carrier proteins is removed by two-step processing: the first cleavage is by the mitochondrial processing peptidase.* J Mol Biol, 2004. 344(2): p. 443-54.
34. Schneider, G., et al., *Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides.* Proteins, 1998. 30(1): p. 49-60.
35. von Heijne, G., J. Steppuhn, and R.G. Herrmann, *Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides.* Eur J Biochem, 1989. 180(3): p. 535-45.
36. Endo, T., et al., *Binding of mitochondrial presequences to yeast cytosolic heat shock protein 70 depends on the amphiphilicity of the presequence.* J Biol Chem, 1996. 271(8): p. 4161-7.
37. Fink, A.L., *Chaperone-mediated protein folding.* Physiol Rev, 1999. 79(2): p. 425-49.
38. Martin, J., K. Mahlke, and N. Pfanner, *Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences.* J Biol Chem, 1991. 266(27): p. 18051-7.

39. Horst, M., et al., *What is the driving force for protein import into mitochondria?* Biochim Biophys Acta, 1997. **1318**(1-2): p. 71-8.
40. Pfanner, N. and N. Wiedemann, *Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases.* Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(4): p. 400-11.
41. Gakh, O., P. Cavadini, and G. Isaya, *Mitochondrial processing peptidases.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 63-77.
42. Cavadini, P., O. Gakh, and G. Isaya, *Protein import and processing reconstituted with isolated rat liver mitochondria and recombinant mitochondrial processing peptidase.* Methods, 2002. **26**(4): p. 298-306.
43. Fenton W.A. and K. F., *Proteolytic processing of mitochondrial precursor proteins.* Adv Mol Cell Biol, 1996. **17**: p. 163-191.
44. Isaya, G. and F. Kalousek, *Mitochondrial intermediate peptidase.* Methods Enzymol, 1995. **248**: p. 556-67.
45. Oshima, T., et al., *Recognition and processing of a nuclear-encoded polyprotein precursor by mitochondrial processing peptidase.* Biochem J, 2005. **385**(Pt 3): p. 755-61.
46. Alper, G. and V. Narayanan, *Friedreich's ataxia.* Pediatr Neurol, 2003. **28**(5): p. 335-41.
47. Allison, D.S. and G. Schatz, *Artificial mitochondrial presequences.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(23): p. 9011-5.
48. Roise, D. and G. Schatz, *Mitochondrial presequences.* J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4509-11.
49. Ogishima, T., et al., *Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidase.* J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30322-6.
50. Mukhopadhyay, A., et al., *Precursor protein is readily degraded in mitochondrial matrix space if the leader is not processed by mitochondrial processing peptidase.* J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37266-75.
51. Gavel, Y. and G. von Heijne, *Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides.* Protein Eng, 1990. **4**(1): p. 33-7.
52. Horwich, A.L., F. Kalousek, and L.E. Rosenberg, *Arginine in the leader peptide is required for both import and proteolytic cleavage of a mitochondrial precursor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 4930-3.
53. Song, M.C., et al., *Role of basic amino acids in the cleavage of synthetic peptide substrates by mitochondrial processing peptidase.* J Biochem, 1996. **120**(6): p. 1163-6.
54. Horwich, A.L., et al., *The ornithine transcarbamylase leader peptide directs mitochondrial import through both its midportion structure and net positive charge.* J Cell Biol, 1987. **105**(2): p. 669-77.
55. Horwich, A.L., et al., *Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: definition of critical regions and residues in the leader peptide.* Cell, 1986. **44**(3): p. 451-9.
56. Mooney, D.T., D.B. Pilgrim, and E.T. Young, *Mutant alcohol dehydrogenase (ADH III) presequences that affect both in vitro mitochondrial import and in vitro processing by the matrix protease.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(6): p. 2801-8.
57. Niidome, T., et al., *Arginine residues in the extension peptide are required for cleavage of a precursor by mitochondrial processing peptidase. Demonstration using synthetic peptide as a substrate.* J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24719-22.
58. Nishi, T., et al., *Import and processing of precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase. Structure-function relationships of the presequence.* J Biol Chem, 1989. **264**(11): p. 6044-51.

59. Ou, W.J., et al., *Structural requirement for recognition of the precursor proteins by the mitochondrial processing peptidase*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24673-8.
60. Taylor, A.B., et al., *Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences*. Structure, 2001. **9**(7): p. 615-25.
61. Shimokata, K., et al., *Substrate recognition by mitochondrial processing peptidase toward the malate dehydrogenase precursor*. J Biochem, 1997. **122**(5): p. 1019-23.
62. Song, M.C., T. Ogishima, and A. Ito, *Importance of residues carboxyl terminal relative to the cleavage site in substrates of mitochondrial processing peptidase for their specific recognition and cleavage*. J Biochem, 1998. **124**(5): p. 1045-9.
63. Hammel, P.K., D.G. Gorenstein, and H. Weiner, *Structure of the signal sequences for two mitochondrial matrix proteins that are not proteolytically processed upon import*. Biochemistry, 1994. **33**(28): p. 8610-7.
64. Thornton, K., et al., *Import, processing, and two-dimensional NMR structure of a linker-deleted signal peptide of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19906-14.
65. Abe, Y., et al., *Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20*. Cell, 2000. **100**(5): p. 551-60.
66. Saitoh, T., et al., *Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states*. Embo J, 2007. **26**(22): p. 4777-87.
67. Dvořáková Holá, K., *Molecular dynamics of proteins with substrate or ligand: mitochondrial processing peptidase and FixL oxygen sensor*. Disertační práce. PřF UK. 2007.
68. Jarvis, J.A., et al., *Solution structure of the acetylated and noncleavable mitochondrial targeting signal of rat chaperonin 10*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1323-31.
69. Janata, J., et al., *Substrate evokes translocation of both domains in the mitochondrial processing peptidase alpha-subunit during which the C-terminus acts as a stabilizing element*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 211-7.
70. Hawlitschek, G., et al., *Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein*. Cell, 1988. **53**(5): p. 795-806.
71. Yang, M., et al., *Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes*. Embo J, 1988. **7**(12): p. 3857-62.
72. Ou, W.J., et al., *Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria*. Embo J, 1989. **8**(9): p. 2605-12.
73. Braun, H.P., et al., *The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain*. Embo J, 1992. **11**(9): p. 3219-27.
74. Eriksson, A.C., S. Sjoling, and E. Glaser, *Characterization of the bifunctional mitochondrial processing peptidase (MPP)/bc1 complex in Spinacia oleracea*. J Bioenerg Biomembr, 1996. **28**(3): p. 285-92.
75. Kleiber, J., et al., *The general mitochondrial matrix processing protease from rat liver: structural characterization of the catalytic subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7978-82.
76. Conboy, J.G., W.A. Fenton, and L.E. Rosenberg, *Processing of pre-ornithine transcarbamylase requires a zinc-dependent protease localized to the mitochondrial matrix*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **105**(1): p. 1-7.

77. McAda, P.C. and M.G. Douglas, *A neutral metallo endoprotease involved in the processing of an F1-ATPase subunit precursor in mitochondria*. J Biol Chem, 1982. **257**(6): p. 3177-82.
78. Schmidt, B., et al., *Processing peptidase of Neurospora mitochondria. Two-step cleavage of imported ATPase subunit 9*. Eur J Biochem, 1984. **144**(3): p. 581-8.
79. Luciano, P., et al., *The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase*. J Mol Biol, 1998. **280**(2): p. 193-9.
80. Paces, V., et al., *The beta subunit of the mitochondrial processing peptidase from rat liver: cloning and sequencing of a cDNA and comparison with a proposed family of metallopeptidases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5355-8.
81. Schulte, U., et al., *A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis*. Nature, 1989. **339**(6220): p. 147-9.
82. Kitada, S., et al., *A putative metal-binding site in the beta subunit of rat mitochondrial processing peptidase is essential for its catalytic activity*. J Biochem, 1995. **117**(6): p. 1148-50.
83. Luciano, P. and V. Geli, *The mitochondrial processing peptidase: function and specificity*. Experientia, 1996. **52**(12): p. 1077-82.
84. Striebel, H.M., et al., *Mutational analysis of both subunits from rat mitochondrial processing peptidase*. Arch Biochem Biophys, 1996. **335**(1): p. 211-8.
85. Nagao, Y., et al., *Glycine-rich region of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is essential for binding and cleavage of the precursor proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34552-6.
86. Shimokata, K., et al., *Role of alpha-subunit of mitochondrial processing peptidase in substrate recognition*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25158-63.
87. Braun, H.P. and U.K. Schmitz, *Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease?* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(5): p. 171-5.
88. Berry, E.A., L.S. Huang, and V.J. DeRose, *Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of higher plants. Isolation and characterization of the bc1 complex from potato tuber mitochondria*. J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 9064-77.
89. Braun, H.P., V. Kruft, and U.K. Schmitz, *Molecular identification of the ten subunits of cytochrome-c reductase from potato mitochondria*. Planta, 1994. **193**(1): p. 99-106.
90. Brumme, S., et al., *New insights into the co-evolution of cytochrome c reductase and the mitochondrial processing peptidase*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13143-9.
91. Glaser, E. and P. Densi, *Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(3): p. 259-74.
92. Mitchell, P., *Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems*. J Theor Biol, 1976. **62**(2): p. 327-67.
93. Deng, K., et al., *Reconstitution of mitochondrial processing peptidase from the core proteins (subunits I and II) of bovine heart mitochondrial cytochrome bc(1) complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6499-505.
94. Braun, H.P., L. Jansh, and U.K. Schmitz, *Proteolysis and protein turn-over*. kniha: Proteolysis in cell function, 1997: p. 290.
95. Deng, K., et al., *Activation of a matrix processing peptidase from the crystalline cytochrome bc1 complex of bovine heart mitochondria*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 20752-7.
96. Muto, T., et al., *NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences*. J Mol Biol, 2001. **306**(2): p. 137-43.

97. Stahl, A., et al., *Two novel targeting peptide degrading proteases, PrePs, in mitochondria and chloroplasts, so similar and still different.* J Mol Biol, 2005. **349**(4): p. 847-60.
98. Dolezal, P., et al., *Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10924-9.
99. Bradley, P.J., et al., *Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist Trichomonas: similarities with mitochondrial protein import.* Embo J, 1997. **16**(12): p. 3484-93.
100. Brown, M.T., et al., *A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry.* Mol Microbiol, 2007. **64**(5): p. 1154-63.
101. Novagen, *pET System Manual*, 11th edition.
102. Clontech, *Matchmaker LexA Two-Hybrid System*, User Manual PT3040-1.
103. Brent, R., Ptashne, M., *A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor.* Cell, 1985. **43**: p.729-36.
104. Ebina Y, Takahara Y, Kishi F, Nakazawa A, Brent R., *LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene.* J Biol Chem, 1983. **258**(21): p. 13258-61.
105. Ma J, Ptashne M., *A new class of yeast transcriptional activators.* Cell, 1987. **51**(1): p. 113-9.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratky použitých vektorů jsou uvedeny v sekci 4.1.3.

Zkratky použitých chemikálií jsou uvedeny v sekci 4.1.4.

Zkratky pufrů, kultivačních médií apod. jsou uvedeny v sekci 4.1.6 a 4.1.7.

MPP	- mitochondriální „processing“ peptidasa (EC 3.4.24.64)
α -MPP	- α -podjednotka MPP
β -MPP	- β -podjednotka MPP
GRL	- glycinová smyčka α -MPP
IMP	- peptidasa vnitřní membrány (EC 3.4.99)
MIP	- mitochondriální „intermediate“ peptidasa (EC 3.4.24.59)
HPP	- hydrogenosomální „processing“ peptidasa
α -HPP	- α -podjednotka HPP
β -HPP	- β -podjednotka HPP
β -HPP+	- β -podjednotka HPP s His-kotvou na C-konci
TOM	- komplex translokasy vnější membrány
TIM	- komplex translokasy vnitřní membrány
NMR	- nukleární magnetická rezonance
MDH	- malátdehydrogenasa
pMDH	- prekurzor MDH (MDH se signální sekvencí)
AK	- adenylátkinasa
pAK	- prekurzor adenylátkinasy (AK se signální sekvencí)
ALDH	- potkaní aldehydehydrogenasa

9. PŘÍLOHY

Přílohy jsou k dispozici na přiloženém CD.

9.1 Molekulární dynamika

Animace a PDB soubory použitých a získaných struktur.

9.2 Programy

BsPlayer pro přehrávání videa a PyMOL pro vizualizaci PDB souborů

9.3 Seznam literatury pro EndNote

Databáze citovaných článků pro program EndNote.