Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Mechanismus rozpoznávání substrátů mitochondriální „processing“ peptidasou

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Tomáš Kučera

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.
Školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.
Studijní obor: Biochemie

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury."

V Praze dne 6. června 2006 .....

Tomáš Kučera

Mé poděkování je směrováno Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za odborné vedení a za možnost vypracovat tuto bakalářskou práci v Laboratoři biologie sekundárních metabolitů MBÚ AV. Děkuji Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za záštitu, kterou mi poskytla.

Dále děkuji Anně Matuškové za odborné vedení, cenné rady i připomínky a zvláště pak za trpělivost a ochotu kdykoli poradit.

O B S A H

SOUHRN
SUMMARY
CÍLE PRÁCE

1. ÚVOD 9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 10
   2.1 Transport proteinů do mitochondrie 10
      2.1.1 Kotranslační transport 11
      2.1.2 Posttranslační transport 11
   2.2 Mitochondriální „processing" peptidasa 13
      2.2.1 Biochemické vlastnosti 13
      2.2.2 Evoluční souvislosti 14
      2.2.3 β-podjednotka MPP 15
      2.2.4 α-podjednotka MPP 17
   2.3 Signální sekvence substrátů 19
      2.3.1 Primární struktura sekvence 19
      2.3.2 Sekundární struktura sekvence 21
   2.4 Mechanismus proteolytické úpravy substrátů 23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 25
   3.1 Materiály 25
      3.1.1 Bakteriální kmeny 25
      3.1.2 Vektory 25
      3.1.3 Použité oligonukleotidy 26
      3.1.4 Chemikálie, roztoky a enzymy 26
      3.1.5 Komerční soupravy 28
   3.2 Přístrojová technika 29
   3.3 Metody 30
      3.3.1 Kultivace *E. coli* 30
      3.3.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* 30
      3.3.3 Transformace buněk *E. coli* plazmidovou DNA 30
      3.3.4 Izolace plazmidové DNA 31
      3.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) 32
      3.3.6 Enzymatické úpravy DNA 32
      3.3.7 Agarosová elektroforéza DNA 33

4. VÝSLEDKY A DIKUSE 34
4.1 Výsledky 34
4.1.1 Strategie záměny signální sekvence 34
4.1.2 Postup záměny signální sekvence 36
4.1.2.1 Amplifikace DNA se signální sekvencí 36
4.1.2.2 Včlenění PCR produktu do pJAKO 37
4.1.2.3 Přenesení sekvence z pJAKO do pYpMDHH+39
4.2 Diskuse 41
5. ZÁVĚR 43
6. SEZNAM LITERATURY 44
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 49

S O U H R N

V teoretické části této bakalářské práce bylo pojednáno o transportu proteinových prekurzorů do mitochondrie a o struktuře signálních sekvencí těchto prekurzorů. Dále byla popsána struktura samotné mitochondriální „processing" peptidasy a navržený mechanismus proteolytické úpravy proteinových prekurzorů mitochondriální „processing" peptidasou.

Praktická část pak byla zaměřena na přípravu expresního vektoru nesoucího gen pro prekurzor mitochondriální malátdehydrogenasy *Saccharomyces cerevisiae* se signální sekvencí mitochodnriální malátdehydrogenasy *Citrullus lanatus*.

S U M M A R Y

The theoretical part of this bachelor thesis deals with transport of protein prekursors into the mitochondria and with structure of signal presequences of these prekursors. Futher, it summarizes the structure of mitochondrial processing peptidase and the proposed mechanism of processing of precursors by mitochondrial processing peptidase.

The experimental part deals with preparing the expression vector carrying the gen for *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial malatedehydrogenase prekursor with signal presequence of *Citrullus lanatus* mitochondrial malatedehydrogenase.

CÍLE PRÁCE

V Laboratoři biologie sekundárních metabolitů Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, kde byla tato práce vypracována, se provádí výzkum mechanismu rozpoznávání substrátů mitochondriální „processing" peptidasou, zahrnující přípravu různých mutantních forem tohoto enzymu a jeho substrátů. Aktuálně se studuje vliv délky signální sekvence substrátů na rozsah pohybu dvou domén α-podjednotky s cílem dokázat, že pohyb těchto domén je závislý pouze na délce signální sekvence. Celkem bude připravena série tří substrátů s různou délkou signální sekvence, ale stejných po odštěpení této sekvence.

Tato bakalářská práce shrnuje současný stav poznatků o funkci mitochondriální „processing" peptidasy s ohledem na výsledky vztahující se k mechanismu rozpoznávání proteinových substrátů mitochonriální „processing" peptidasou. Experimentální část je pak zaměřena na přípravu expresního vektoru nesoucího gen pro prekurzor mitochondriální malátdehydrogenasy *Saccharomyces cerevisiae* nesoucí na svém N-konci signální sekvenci mitochondriální malátdehydrogenasy *Citrullus lanatus*.

Základní vytyčené cíle práce mohou být shrnuty do následujících bodů:

1. provedení rešerše literatury
2. laboratorní příprava expresního vektoru

1. ÚVOD

Důsledkem evoluce eukaryotických buněk je jejich kompartmentace, která jim dovoluje fungovat mnohem efektivněji. Těmito kompartmenty se rozumí například jádro, peroxisomy, mitochondrie nebo v případě rostlin též chloroplasty. Přestože mitochondrie a chloroplasty nesou vlastní genetickou informaci, má tato DNA jen malou informační kapacitu a kóduje jen malé množství proteinů těchto organel. Proto je většina mitochondriálních a chloroplastových proteinů kódována jadernými geny, které jsou překládány do proteinů na cytosolických ribozómech a dále transportovány do mitochondrií nebo chloroplastů.

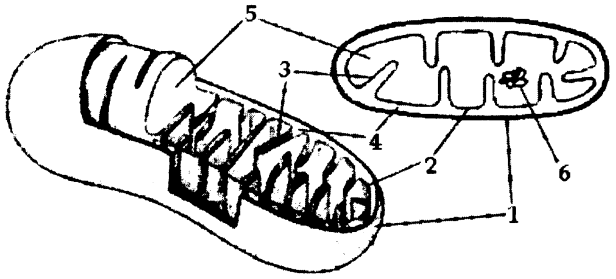
Protože organizace, obsah a funkce těchto organel je přesně definována, je nutné, aby existoval specifický transportní systém pro import těchto proteinů. Většina proteinů určených pro mitochondrie je syntetizována ve formě proteinových prekurzorů nesoucích signální sekvenci aminokyselin. Jakmile jsou tyto proteinové prekurzory jednou transportovány do mitochondrie, není signální sekvence již dále potřeba a je specificky odštěpována mitochondriálními endopeptidasami. Protein pak nabývá své nativní konformace a může plnit funkci, pro kterou byl syntetizován.

Proteolytické úpravy mitochondriálních proteinů se účastní celkem tři peptidasy. Mitochondriální „processing" peptidasa štěpí většinu proteinových prekurzorů, zatímco mitochondriální „intermediate" peptidasa a peptidasa vnitřní membrány štěpí jen specifickou podmnožinu proteinových prekurzorů v závislosti na destinaci proteinu.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Transport proteinů do mitochondrie

Mitochondrie jsou membránové organely eukaryotických buněk, které zajišťují celou řadu dějů pro buňku životně nezbytných. V mitochondriích rozlišujeme vnitřní a vnější membránu, mezimembránový prostor a matrix (Obr. 1). Mitochondrie jsou nejen energetickým centrem buňky, ale je zde také lokalizováno velké množství dalších esenciálních metabolických drah. Na všech těchto dějích participuje mnoho mitochondriálních proteinů, často sdružených do celých proteinových komplexů, jejichž lokalizace je v mitochondrii přesně definována.



Obr. 1. Schéma mitochondrie
1 – vnější membrána
2 – vnitřní membrána
3 – kristy
4 – mezimembránový 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 [1] a zbývajících 400-500 potřebných proteinů je kódováno jadernými geny [2], syntetizováno na ribozómech endoplazmatického retikula v cytosolu a transportováno do mitochondrie.

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

Proteiny určené pro mitochondrie jsou syntetizovány jako dlouhé peptidové prekurzory nesoucí aminokyselinovou signální sekvenci [3]. V závislosti na tom, zda je tato sekvence štěpitelná, respektive neštěpitelná, rozlišujeme dva druhy transportů, a to transport posttranslační, respektive kotranslační.

2.1.1 Kotranslační transport

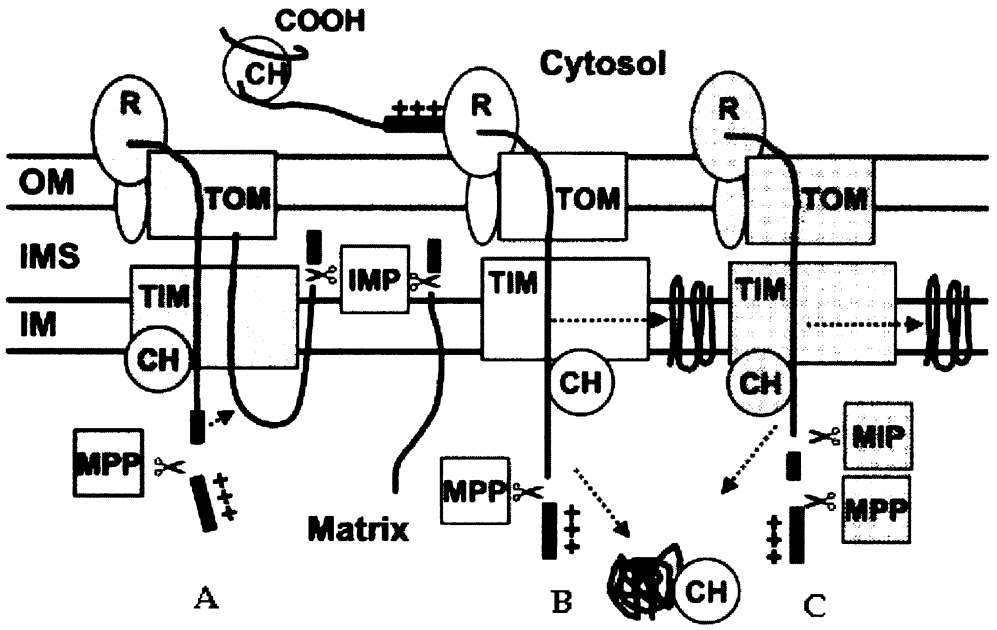
Jak je ze samotného názvu zřejmé, ke kotranslačnímu transportu proteinu dochází již během syntézy proteinu v cytosolu, kdy dochází ke vzniku vazby mezi ribozómem a mitochondrií. Tyto proteiny nesou neštěpitelnou N-koncovou, C-koncovou nebo vnitřní signální sekvenci [3], která je rozpoznávána komplexem integrálních bílkovin vnější membrány (TOM, translocase of the outer membrane) [4] a dále pak komplexem vnitřní membrány (TIM, translocase of the inner membrane) [5]. Kotranslačně jsou transportovány především proteiny vnější mitochondriální membrány a „carrier" proteiny vnitřní membrány mitochondrie [6].

2.1.2 Posttranslační transport

Postranslačním transportem se rozumí transport proteinů až po dokončení jejich syntézy na ribozómech. Pro tyto proteiny je charakteristická odštěpitelná N-koncová signální sekvence, která sestává až ze 120 aminokyselinových zbytků. Má potenciální schopnost tvořit v hydrofóbním prostředí nestabilní α-helix a díky přítomnosti bazických aminokyselin je kladně nabitá. Za touto sekvencí může následovat druhá signální sekvence, sestávající z osmi aminokyselin [7-10].

V cytoplasmě je signální sekvence důležitá pro rozeznání transportovaného proteinového prekurzoru specifickými chaperony, které zabraňují agregaci a degradaci proteinu a udržují jej v import-kompetentní konformaci [11-12]. Vlastní transport je zahájen interakcí signální sekvence s TOM komplexem (Obr. 2), konkrétně s jeho podjednotkou Tom20 (Obr. 8, 2.3.2), jejíž domény nesou záporný náboj díky kyselým aminokyselinám. Transport přes vnitřní membránu vyžaduje elektrochemický potenciál ($\Delta\psi$) [14], interakci s TIM komplexem a je doprovázen hydrolýzou ATP [15-17]. 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. 2).



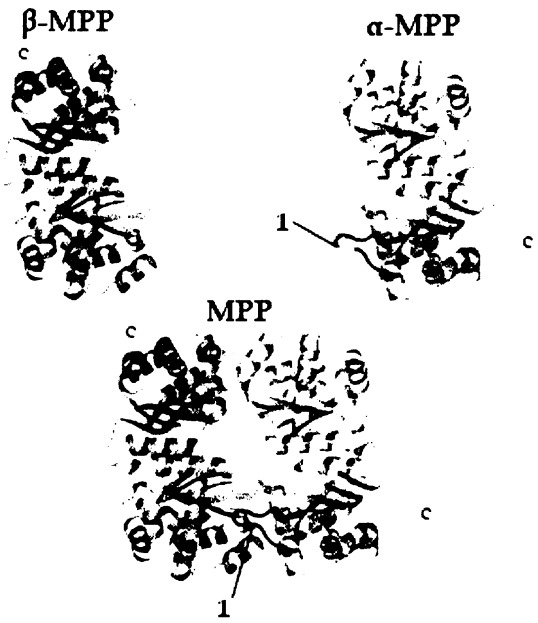
Obr. 2. Proteolytické úpravy mitochondriálních proteinových prekurzorů.
Signální sekvence je znázorněna jako pozitivně nabitá doména. CH, cytosolické a mitochondriální chaperony; R, receptor vnější membrány asociovaný s TOM, translokasou vnější membrány; TIM, translokasa vnitřní membrány; OM, vnější membrána; IMS, mezimembránový prostor; IM, vnitřní membrána; MPP, mitochondriální „processing" peptidasa; IMP, peptidasa vnitřní membrány; MIP, mitochondriální „intermediate" peptidasa. [13]

Signální sekvence většiny proteinových prekurzorů odštěpuje v matrix mitochondrie mitochondriální „processing" peptidasa (MPP, EC 3.4.24.64) [18-19], která proteolyticky upravuje prekurzory transportované do matrix (Obr. 2-B). U mnoha prekurzorů směrovaných do mezimembránového prostoru je hlavní signální sekvence doprovázena druhou signální sekvencí, tzv. intramitochondriální třídící sekvencí [7, 10]. Hlavní signální sekvence je pak odštěpována MPP, zatímco druhá je štěpena mitochondriální „intermediate"peptidasou (MIP, EC 3.4.24.59; Obr. 2-C) [20]. Signální sekvence další skupiny proteinových prekurzorů jsou sekvenčně štěpeny nejprve MPP a dále pak peptidasou vnitřní membrány (IMP, EC 3.4.9), peptidasou lokalizovanou ve vnitřní membráně mitochondrie (Obr. 2-A) [7].

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

2.2 Mitochondriální „processing" peptidasa

MPP je esenciální mitochondriální heterodimerní endopeptidasa (Obr. 3) typická pro všechny eukaryotické buňky [18], jejíž funkce tkví ve specifickém odštěpování signálních sekvencí mitochondriálních proteinových prekurzorů syntetizovaných na ribozómech v cytosolu a posttranslačně transportovaných do daného mitochondriálního subkompartmentu.



Obr. 3. Mitochondriální „processing" peptidasa. Struktura na základě rentgenostrukturní analýzy.
1 – glycinové místo, 2.2.3; C značí C-konec řetězce. [21]

2.2.1 Biochemické vlastnosti

Mitochondriální „processing" peptidasa byla poprvé izolována z *Neurospora crassa* [22], *Saccharomyces cerevisiae* [23] a krysích jater [24], později pak z rajčete [25], hovězích jater [26] a špenátu [27], 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 [28].

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+} [29-31]. Ačkoli prvotně nebyl žádný kovový ion

asociovaný s MPP detekován, později bylo zjištěno, že MPP obsahuje ion Zn^{2+} v aktivním centru (Obr. 5) [32].

Od roku 2001 je známa krystalová struktura MPP [21]. Ta ukázala, že každá podjednotka je tvořena dvěma doménami (N a C-doména, každá se skládá z ~210 aminokyselin) propojenými flexibilním linkerem (~20 aminokyselin), přičemž zinek-vazebný motiv je lokalizován v β-podjednotce.

2.2.2 Evoluční souvislosti

Lokalizace MPP v mitochondrii se liší dle druhu organismu. Například u savců a kvasinky je mitochondriální „processing" peptidasa lokalizována v matrix [23, 28, 25], u *N. crassa* [22], *Euglena* [33] a *Potylomella* [33] 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 [27, 34-36], 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 [25, 27, 37]. U rostlin je tedy MPP integrální součástí komplexu redukujícího cytochrom c v dýchacím řetězci a plní dvě funkce zároveň [38].

U některých organismů (kvasinka, savci) došlo k funkčnímu i fyzickému oddělení mitochondriální „processing" peptidasy od bc_1 komplexu, nicméně funkční souvislost je mezi nimi nadále zřejmá, jak ukazuje práce [39], 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 izolované podjednotky MPP), ale po jejich částečném opracování 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.

Podjednotky MPP vykazují vysoký stupeň homologie mezi sebou (~20-30% [40-41]) a významná je též homologie podjednotek MPP mezi různými organismy. Mezi α-MPP *S. cerevisiae* a *N. crassa* byla nalezena ~43% identita [42] a 36% shoda v sekvenci těchto dvou proteinů s krysí α-MPP [28]. Pro β-MPP je procento homologie ještě větší a činí ~45-52% mezi krysí, *S. cerevisiae* a *N. crassa* podjednotkou [40, 43].

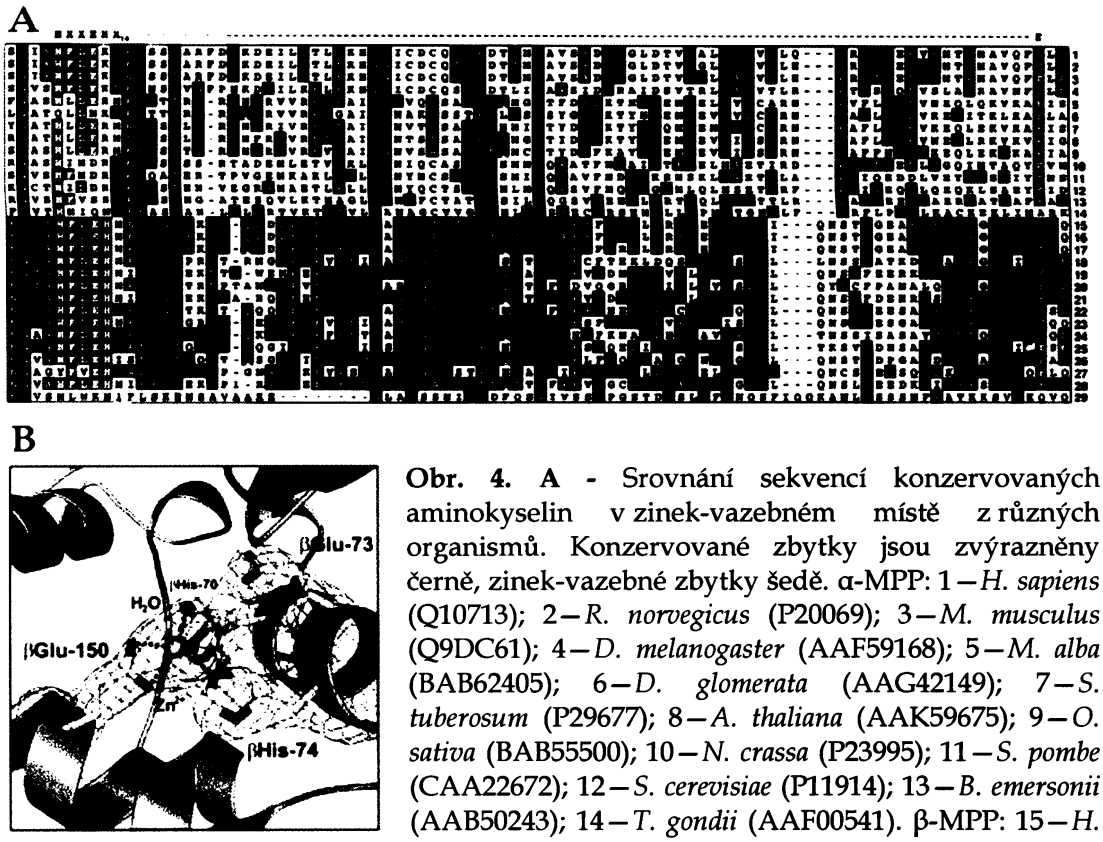
Na základě výše uvedeného byl vytvořen model odrážející tyto skutečnosti [44]. Časně v evoluci se mitochondriální „processing" peptidasa začala vyvíjet z bakteriální proteasy a stala se součástí bc_1 komplexu (stav v současnosti typický pro rostliny). V některých organismech (*S. cerevisiae*, savci) 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 bc_1 komplexu ze strukturálních důvodu - byly nezbytné pro funkci tohoto komplexu. Bifunkční role bc_1 komplexu rostlin tedy představuje situaci, která byla kdysi společná mitochondriím všech organismů [45].

2.2.3 β-podjednotka MPP

β-podjenotka mitochondriální „processing" peptidasy (Obr. 3) *S. cerevisiae* je menší (442 aminokyselin) než α-MPP a vykazuje vysoký stupeň homologie s endopeptidasami třídy pitrilysinu *Escherichia coli* (proteasa III) a s inzulin-degradujícím enzymem savců a hmyzu (IDE) [46]. Jsou zde lokalizovány zinek-vazebné aminokyseliny, přičemž vlastní katalytické centrum se nachází v dutině mezi podjednotkami.

Zinek-vazebné aminokyseliny (Obr. 4-A) vytváří plně konzervovaný motiv H-X-X-E-H-X_{76}-E (Obr. 4-B), který je invertovaným motivem H-E-X-X-H přítomným v zinek-dependentní protease thermolysin. Tento motiv je přítomen ve všech dosud známých β-MPP; méně konzervovaný je v core I podjednotce

bc_1 komplexu [40, 52]. Nahrazení jakéhokoli aminokyselinového zbytku v zinek-vazebném motivu vedlo k úplné ztrátě schopnosti vázat zinek a došlo tak ke kompletní ztrátě proteolytické aktivity MPP [53-55]. Významnost tohoto motivu byla později potvrzena krystalografickou studií, která ukázala, že ion zinku je koordinován dvěma histidinovými zbytky a distální glutamovou kyselinou, přičemž proximální kyselina glutamová funguje jako základna pro molekulu vody, která se jako čtvrtý ligand koordinuje na ion zinku [21].



Obr. 4. 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. [13] **B** - struktura zinek-vazebného motivu založená na rentgenostrukturní analýze [21].

Srovnání sekvencí β-MPP izolovaných z různých organismů dále ukázalo několik konzervovaných kyselých aminokyselin (asp, glu), které se nachází na α-helixu nasměrováném do dutiny mezi podjednotkami. Tyto interagují

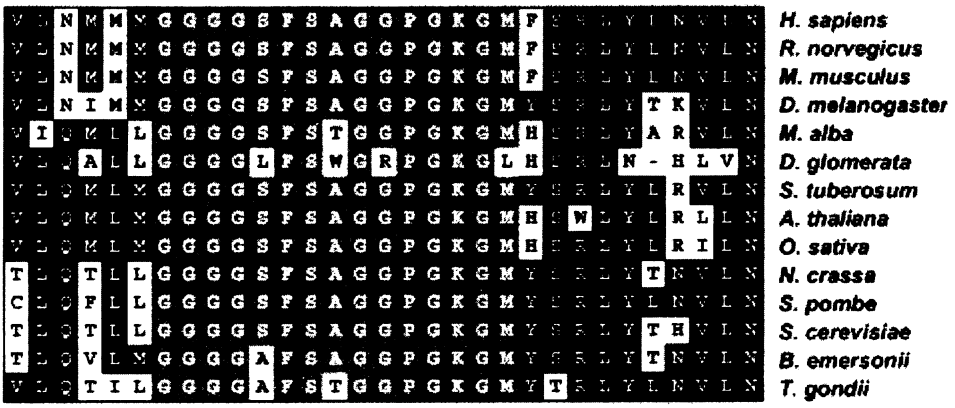
s bazickými aminokyselinami signální sekvence substrátu a účastní se vazby substrátu v rozvolněné konformaci (Obr. 9, 2.4) v aktivním centru MPP.

2.2.4 α-podjednotka MPP

α-podjednotka (Obr. 3) mitochondriální „processing" peptidasy *S. cerevisiae* je veliká 469 aminokyselin a zprostředkovaně díky homologii s β-MPP vykazuje též vysoký stupeň homologie s proteasou III a s IDE [46].

Studie zavádějící do α-MPP různé aminokyselinové záměny nebo delece ukázaly, že α-podjednotka přímo nezasahuje do vlastního procesu proteolýzy, ale že její význam spočívá především v rozeznávaní substrátu, pravděpodobně v prvotním kontaktu se substrátem, nebo při jeho uvolňování po odštěpení signální sekvence [21, 48-50, 79].

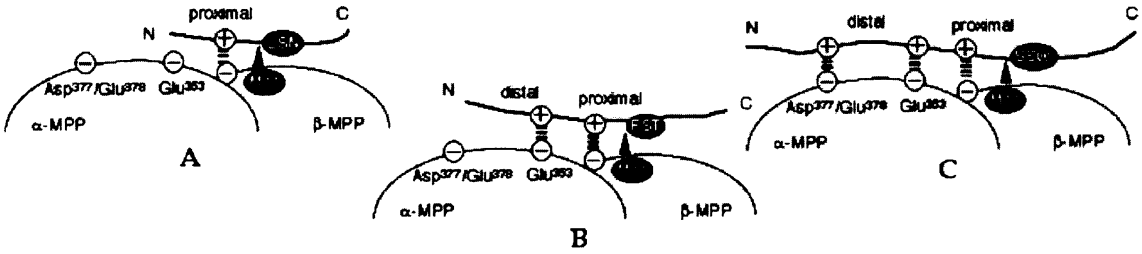
Krystal mitochondriální „processing" peptidasy [21] ukázal, že katalytické centrum enzymu se nachází v dutině mezi podjednotkou α a β. U vstupu do této dutiny se nachází vysoce konzervovaná sekvence aminokyselin α-podjednotky skládající se z mnoha zbytků glycinu (glycinové místo, Obr. 5), která vytváří smyčku (glycinová smyčka, Obr. 3). Glycinové místo je vůbec nejkonzervovanější sekvencí aminokyselin α-podjednotky (téměř absolutně konzervovanou mezi nejrůznějšími organismy) a je esenciální pro funkci MPP [50]. Tato smyčka může na první pohled bránit vstupu substrátu do aktivního centra MPP, nicméně bylo ukázáno, že substituce a delece, ať už částečná (Δ289-291) nebo delece celé



Obr. 5. Srovnání sekvencí konzervovaných aminokyselin v glycinovém místě z různých organismů. Konzervované zbytky jsou zvýrazněny černě, glycinové místo šedě. [13]

smyčky, v této oblasti mají za následek významný pokles afinity enzymu k substrátu a též pokles proteolytické aktivity [49-50]. 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.

Další studie ukázaly význam flexibilního C-konce α-MPP. Delece v této oblasti měly za následek významný pokles proteolytické aktivity u substrátů s delšími sekvencemi [51]. Shimokata a kol. [49] předpokládal, že C-konec α-podjednotky interaguje s distálními bazickými aminokyselinami signální sekvence, zatímco β-podjednotka s bazickými aminokyselinami v okolí místa proteolýzy (Obr. 6). Tuto představu vytvořili ještě v době, kdy nebyla známa krystalová struktra MPP [21]. Dnes je tato představa překonaná, nicméně naměřené údaje, z nichž Shimokata vycházel, lze interpretovat jinak, v souladu s krystalografickou studií (2.4).



Obr. 6. Modely interakcí mezi různě dlouhými signálními sekvencemi a podjednotkami mitochondriální „processing" peptidasy.
A – krátká sekvence pouze s proximálním argininem. B – delší sekvence s proximálním argininem a jednou distální bazickou aminokyselinou. C – dlouhá sekvence s proximálním argininem a dvěma distálními bazickými aminokyselinami. [49]

Oproti β-podjednotce má α-podjednotka volnější terciární strukturu. Při vazbě substrátu dochází k vzájemnému pohybu domén α-MPP [51], které je třeba určitým způsobem stabilizovat. Zdá se, že tímto stabilizačním elementem by mohl být právě C-konec α-podjednotky.

2.3 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 sekvencí, které jsou hodně variabilní. Délka signálních sekvencí se mění od 8 do 121 aminokyselinových zbytků, průměrná délka je pak 32 aminokyselin. Signální sekvence jsou delší u rostlinných proteinových prekurzorů, kde je třeba rozlišit proteiny určené pro mitochondrie od proteinů určených pro chloroplasty.

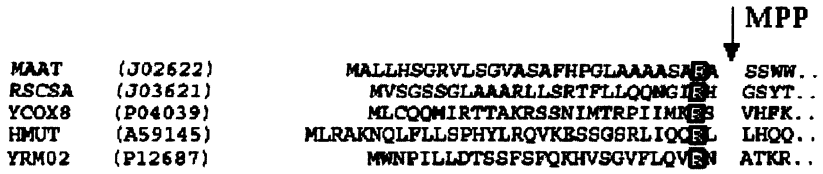
Do konceptu proteolyticky odštěpovaných signálních sekvencí však zcela nezapadají některé studie. Ukázalo se, že MPP též proteolyticky upravuje polypeptidové substráty, tedy takové substráty, jejichž proteolýzou vzniká více, v tomto případě dva, nativní proteiny. MPP nejprve odštěpuje signální sekvenci a následně rozštěpí polypeptidový substrát na dva proteiny, které se v matrix „sbalí „do své nativní konformace [47]. Podobně se vymyká dvoukrokové štěpení frataxinu, jehož se také účastní mitochondriální „processing" peptidasa [81].

Signální sekvence navíc vykazují jen málo společných rysů ve své primární struktuře. Ukázalo se však, že existují tři rysy společné všem signálním sekvencím rozpoznávaným mitochondriální „processing" peptidasou, a to sice:

- nese pozitivní náboj [56]
- má schopnost vytvářet amfifilní α-helix [10, 57-58]
- přítomnost argininu v pozici -2 od místa proteolýzy [8, 10]

2.3.1 Primární struktura sekvence

Přestože se signální sekvence liší v délce a v aminokyselinové sekvenci, podařilo se porovnáním sekvencí [59-60] (Obr. 7) 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 [61]. Toto pravidlo však není absolutní, některé substráty mají arginin v pozici -3, jiné jej nemají vůbec a přesto jsou substráty mitochondriální „processing" peptidasy.



Obr. 7. Místa proteolýzy 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, 60 S ribosomální protein L2 *S. cerevisiae*. V závorkách jsou uvedeny GenBank přístupové klíče. [13]

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 [8, 10, 26, 62-64].

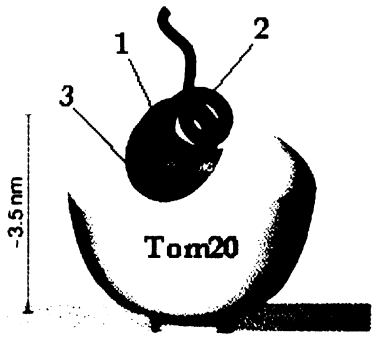
Experimenty s delecemi a substitucemi v signální sekvenci dále ukázaly význam bazických aminokyselin pro efektivní proteolytickou úpravu mitochondriální „processing" peptidasou [26, 63, 65-69]. Kyselé zbytky se téměř nevyskytují, a tak sekvence nese kladný náboj. Význam pozitivního náboje naznačuje také krystalová studie enzym-substrát [21].

Přítomnost zbytků glycinu a prolinu mezi proximálním a distálním argininem, respektive mezi proximálním argininem a distálním bazickým zbytkem, zajišťuje signální sekvenci jistou dávku flexibility, která tak může interagovat s příslušnými aminokyselinami podjednotek MPP [56].

Do jedné z posledních významných pozic, do pozice +1, jsou často situovány objemné hydrofóbní zbytky fenylalaninu, leucinu nebo isoleucinu [63]. Poslední významnou pozicí v signální sekvenci je pak pozice +2 a/nebo +3, kde se vyskytují malé hydrofilní zbytky serinu nebo threoninu [70-71], přičemž rostlinné signální sekvence mají větší obsah serinu [9, 72].

2.3.2 Sekundární struktura sekvence

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 [73-74].



Obr. 8. Interakce podjednotky Tom20 se signální sekvencí. Model cytosolické domény podjednotky Tom20 TOM komplexu s navázanou sekvencí v konformaci amfifilního α-helixu. Signální sekvence se váže svou hydrofóbní stranou (1) do hydrofóbního záhybu (3), přičemž pozitivně nabitá strana sekvence (2) je orientována na opačnou stranu. Model vytvořen na základě NMR [75].

Schopnost signálních sekvencí tvořit amfifilní α-helix je velmi významná skutečnost. α-helixy sekvencí substrátů MPP mají na jedné straně exponovány hydrofóbní aminokyseliny a na straně druhé aminokyseliny kladně nabité. Tato schopnost se projevuje především 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. Tvorba α-helixu je podmíněna přítomností hydrofóbního prostředí, které podjednotka Tom20 vytváří expozicí svých nepolárních a hydrofobních zbytků aminokyselin do „zálivu", kde dochází k vlastní interakci se signální sekvencí (Obr. 8) [6, 15, 75]. Zdá se, že nepolární prostředí mitochondriálních membrán pak dále tento α-helix stabilizuje. Proto předpokládáme, že α-helix signální sekvence se uplatňuje pravděpodobně též v prvotním kontaktu s α-podjednotkou MPP v tzv. glycinovém místě [76].

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 protelytickou 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 [74, 77].

Byla připravena mutantní forma MPP (bez proteolytické aktivity) se syntetickými peptidy analogickými ke skutečným substrátům návazanými v aktivním centru [21]. V těchto komplexech je zachycena konformace krátce před vlastní proteolýzou signální sekvence. Ukázalo se, že sekvence je v aktivním centru vázána v rozvolněné formě, nikoli v konformaci α-helixu (Obr. 9). Předpokládáme, že přeměnu z konformace α-helixu do rozvolněné formy provádí sama mitochondriální „processing" peptidasa, přičemž tato přeměna je spojena se vzájemným pohybem domén α-podjednotky [51]. 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 Mechanismus proteolytické úpravy substrátů

Shrnutí poznatků a vytvoření pracovní hypotézy

S tím, jak se rozšiřovaly znalosti o struktuře mitochondriální „processing" peptidasy a o struktuře signálních sekevnecí, se vyvíjely i modely mechanismu proteolytické úpravy. V současnosti, kdy je známa krystalová struktura enzymu a komplexu enzym-substrát [21], je proces vlastní proteolýzy velmi dobře popsán, nicméně stále zůstává nejasný mechanismus prvního kontaktu enzymu se substrátem, dále pak jeho nasměrování do dutiny mezi podjednotkami a též zůstává nejasný mechanismus uvolňování produktů proteolýzy z aktivního centra. Mnoho skutečností již bylo naznačeno v předešlém textu, zde to jen shrneme a doplníme o pracovní hypotézu o nejasných částech mechanismu proteolytické úpravy mitochondriálních proteinových prekurzorů..

Každá podjednotka MPP je tvořena dvěma doménami, které jsou propojené flexibilním linkerem. Interakce substrátu (proteinového prekurzoru) s α-podjenotkou způsobí významný vzájemný pohyb jejích obou domén. Míra tohoto pohybu je dána délkou signální sekvence, jak bylo prokázáno měřením tryptofanové fluorescence α-MPP v přítomnosti substrátu [51]. Toto společně s nezbytností glycinového místa [50] naznačuje, že místem prvotního kontaktu je glycinové místo α-podjednotky. V glycinovém místě jsou zbytky glycinu prokládány hydrofóbními aminokyselinami, které jsou exponovány na povrch. To naznačuje význam glycinového místa a možný mechanismus rozpoznávání substrátů, neboť hydrofóbní aminokyseliny obvykle bývají v důsledku hydrofóbního efektu nasměrovány do nitra proteinu. Glycinová smyčka tak může vytvářet hydrofóbní mikrookolí, které by mohlo evokovat vytváření α-helikální konformace signální sekvence obdobně jako hydrofóbní záliv na povrchu Tom20 [75]. α-helix sekvence totiž funguje jako rozpoznávací element při transportu proteinového prekurzoru přes vnější membránu mitochondrie (2.3.2) a zdá se, že podobný mechanismus by mohl fungovat i během prvotního kontaktu signální sekvence substrátu s mitochondriální „processing" peptidasou.

Předpokládáme, že v důsledku interakce se signální sekvencí dochází ke konformační změně α-podjednotky, konkrétně glycinové smyčky [76], 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 k její fixaci v dutině. Během vtahování do dutiny dochází ke skenování strukturních elementů v primární struktuře signální sekvence (hledání R-2 motivu, 2.3.1). Ta je nakonec v dutině uchycena v rozvolněné konformaci tak, že místo proteolýzy se nachází v blízkosti zinek-vazebného motivu (Obr. 9).

Obr. č. 9. Struktura signální sekvence vázané v aktivním centru MPP. Dva různě orientované pohledy. Model na základě rentgenostrukturní analýzy [21].

Jakmile je signální sekvence uchycena odpovídajícím způsobem v aktivním centru, dojde k vlastní proteolýze za účasti iontu zinku a maturovaný protein uvolněný z dutiny MPP nabývá v matrix mitochondrie za účasti chaperonů své nativní konformace [12]. Odštěpená sekvence je pak enzymaticky degradována v matrix. Přesný mechanismus uvolňování produktů z aktivního centra není znám, předpokládá se však opět účast glycinového místa α-podjednotky.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Bakteriální kmeny

JM109 (Stratagene)

e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K^- m_K^+) *supE44 relA1 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacI^{q}ZΔM15]*

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

DH5α (Invitrogen)

F- ø80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K^-, m_K^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-*

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

XL1-blue (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´proAB lacI^{q}ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c

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

3.1.2 Vektory

pYpMDHH+ (6019 bp)

Expresní vektor nesoucí gen pro prekurzorovou mitochondriální malátdehydrogenasu *S. cerevisiae* (YpMDH) fúzovanou s His-kotvou (YpMDHH+) na C-konci umožňující metaloafinitní purifikaci. Vektor je odvozen od pET42b(+) (Novagen), v němž je exprese pod kontrolou T7 promotoru. Nese gen pro rezistenci ke kanamycinu a byl použit jako templát pro PCR.

pJAKO (2961 bp)

Vektor připravený v naší laboratoři (J. Janata, J. Kopecký). Jde o pBluescript II KS+ (Stratagene) s modifikovaným polylinkerem, usnadňující přenosy inzertů mezi používanými klonovacími a expresními vektory. Obsahuje gen pro rezistenci

k ampicilinu. Umožnuje tzv. modrobílou selekci klonů nesoucích rekombinantní plazmid.

3.1.3 Použité oligonukleotidy

preWfor

„Forward" primer pro PCR. **Tučně** vyznačeno restrikční místo NdeI (CATATG) a BglII (AGATCT), podtržením je vyznačena signální sekvence MDH melounu (*Citrullus lanatus*).

5´AACTGCAG**CATATG**AAGGCCTCAATTCTC**AGATCT**GTTCGTTCCGCCGTT TCCAGATCCTCATCGTCGAATCGCCTCTTGAGCCGTAGCTTTTCCTCTACAG TTGCCAA **3´**

YMDHHindIIIrev

„Reverse" primer použitý pro PCR nasedá až za HindIII místem (Schéma 1, sekce 4.1.1).

5´ ATCGGTGGCAACACCTTTTG **3´**

3.1.4 Chemikálie, roztoky a enzymy

Chemikálie

Název chemikálie	**Zkratka**	**Výrobce**
adenosin-5´-trifosfát	ATP	Sigma
ethylendiamintetraacetát	EDTA	
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	IPTG	Sigma
ampicilin	amp	Serva
kanamycin	kan	Serva
bromfenolová modř	BPB	Bio-Rad
5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid	X-gal	Serva
dodecylsulfát sodný	SDS	Serva
agarosa		Promega, Serva
akrylamid	AA	Bio-Rad
trypton		Difco
2´-deoxynukleosid-5´-trifosfátová směs	dNTP	Top-Bio
etanol	EtOH	Lachema
ethidium bromid	EtBr	
D-glukosa	glu	Lachema
Coomasie Brilliant Blue R250	CBB	
glycerol		Merc

N,N´-methylen-bisakrylamid	bisAA	Bio-Rad
isopropanol		Lachema
N, N, N´, N´-tetramethylethylendiamin	TEMED	Serva
peroxodisíran sodný	APS	Sigma
tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Serva

Dalšími použitými chemikáliemi byly běžně dostupné látky analytické čistoty.

Roztoky a pufry

IPTG - 100 mM IPTG

X-gal - 0,5 M v EtOH

antibiotika

- ampicilin - 100 $mg.ml^{-1}$ (1000x)
- kanamycin - 30 $mg.ml^{-1}$ (1000x)

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

TS1 pufr - 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 9,2

1x TAE pufr - 40mM 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

izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí

- 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 H_2O
  - připravovat vždy čerstvý
- roztok III - 3 M CH_3COOK pH 4,8
  - pH upravovat ledovou CH_3COOH

Kultivační média

LB médium - 10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, H_20 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 Mg^{2+}, 1 ml 2 M glukosa, H_20 do 100 ml, pH 7

Enzymy

restrikční endonukleasy NdeI, HindIII, BglII (New England Biolabs)

Taq DNA polymerasa (New England Biolabs)

T4 DNA ligasa (New England Biolabs)

alkalická fosfatasa CIP (New England Biolabs)

3.1.5 Komerční soupravy

Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci DNA z bakteriální kultury byly používány následující kity:

- Plasmid MINI Kit 2000 (JETstar)
- DNA Purification System Midipreps (Promega)
- PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega)

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

- 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.

3.2 Přístrojová technika

Při praktické části byly použity následující přístroje:

- centrifugy - Eppendorf 5415R
  - Microspin 24S DuPont
  - Jouan Mir 23i
  - Jouan Br4i
  - SpeedVac® System SPD1010
- vodní lázeň Huber Polystat cc1
- rotační třepačka Infors Unitron
- předvážky Denver Instrument MXX-212
- analytické váhy Owa Labor
- UV fotosystém Kodak Digital Science
- elektrické zdroje pro elektroforézu Consort E835 a E-C Apparatus Corp. EC-103
- PCR - T Gradient Biometra
  - T1 ThermoCycler Biometra
- spektrofotometr Helios Unicam
- automatické pipety 2, 20, 50, 100, 200 a 1000 µl Pipetman Gilson
- elektroporátor Electrophoresis Power Supply EPS 500/400
- lednice a mrazící boxy
- mikrovlnná trouba
- vakuový kompresor

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace *E. coli*

Všechny použité kmeny *E. coli* byly kultivovány na LB agaru při teplotě 37 ^{0}C. Pro selekci buněk nesoucí požadovaný plazmid byly do LB agaru (při zchladnutí na 55 ^{0}C) přidány roztoky odpovídajících antibiotik. Pro selekci buněk nesoucí plazmid pJAKO či konstrukty od něj odvozené byl přidán ampicilin, pro selekci buněk nesoucí konstrukty plazmidu pET42b(+) pak kanamycin.

Kultivace pro zpracování buněk probíhala v LB médiu s daným antibiotikem (stejným jako v případě kultivace na LB agaru) na rotační třepačce při 200 rpm a 37 ^{0}C po dobu 12 až 18 h.

3.3.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

250 ml SOC média bylo inokulováno přes noc produkovanou bakteriální kulturou tak, aby výsledná OD_{550} byla ± 0,1. Buňky byly dále kultivovány na rotační třepačce při 37 ^{0}C do dosažení OD_{550} 0,6-0,8. V této fázi byla kultura chlazena 10 min na ledu a následně centrifugována při 1500 g a 4 ^{o}C po dobu 10 min. Sediment byl dvakrát promyt 10% glycerolem. Nakonec byly buňky resuspendovány v 1 ml 10% glycerolu a suspenze byla rozdělena na alikvoty po 50 µl. Buňky byly uchovávány při -70 ^{0}C.

3.3.3 Transformace buněk *E. coli* plazmidovou DNA

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 42 ^{0}C po dobu maximálně 60 s a následně chlazeny v ledu po dobu 2 min. Ke směsi byl přidán 1 ml LB média předehřátého na 37 ^{0}C a směs byla inkubována ve vodní lázni 1 h při 37 ^{0}C. Buňky byly stočeny na centrifuze, LB médium bylo slito a buňky resuspendovány ve zbývajících cca 100 µl LB média. Následně byly buňky vysety na plotnu s LB

agarem obsahujícím požadované antibiotikum, případně též roztoky IPTG a X-gal pro tzv. modrobílou selekci buněk. Plotny byly inkubovány zpravidla po dobu 12 až 18 h při 37 ^{0}C.

Transformace elektroporací

K zmraženému alikvotu kompetentních buněk 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 rpm a 37 ^{0}C. Následně byly buňky vysety na plotnu s LB agarem obsahujícím požadované antibiotikum, případně též roztoky IPTG a X-gal (výsledná koncentrace 30 µgml^{-1} a 0,4 mM) pro modrobílou selekci buněk. Plotny byly inkubovány zpravidla po dobu 12 až 18 h při 37 ^{0}C.

3.3.4 Izolace plazmidové DNA

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 ^{0}C a 200 rpm 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 supernatanu byl přidán 2,5 objemový násobek 96% ledového etanolu 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 slit a sediment promyt 1 ml 80% ledového etanolu. Vysrážená DNA byla oddělena opět centrifugací a vysušena (45 ^{0}C, 2-8 min). Sediment byl rozpuštěn v požadovaném objemu (± 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 pro další použití.

Izolace plazmidové DNA pomocí komerčních souprav

Komerční soupravy byly používány v případě, kdy bylo třeba získat plazmidou DNA v čistotě odpovídající dalšímu použití (restrikce, ligace). Všechny izolace probíhají ve třech stupních. Nejdříve je nutné buňky lyzovat a vysrážet většinu proteinů a chromosomální DNA. Druhý krok spočívá v dalším čištění plazmidové DNA buď vazbou na „skleněné mléko" (Promega) nebo na ionex (JETstar). 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.

3.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Metoda PCR umožňuje *in vitro* amplifikaci určitého úseku DNA. Střídáním teplot je docílena nejprve denaturace templátové DNA, na níž tak mohou za vhodné teploty (určené experimentálně) nasednout specifické primery. Na ně může DNA polymerasa připojovat dNTP přítomné v reakční směsi. Opakováním cyklů se úsek vymezený specifickými primery mnohonásobně zmnoží. Reakce probíhaly v objemu 50 µl.

PCR reakce byla použita při přípravě konstruktu pro produkci prekurzoru mitochondriální MDH *S. cerevisiae* nesoucí na svém N-konci signální sekvenci mitochondriální MDH melounu. Amplifikace žádaného fragmentu probíhá mezi dvěma primery, přičemž primer „forward" je navržen tak, že nasedá na templát svým 3´ koncem a na 5´ konci nese sekveci kódující signální sekvenci mitochondriální MDH melounu.

3.3.6 Enzymatické 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 násobkem výrobcem doporučovaného množství (1 U enzymu na 1 µg DNA).

Ligace DNA

Pro ligace byl dodržován celkový objem reakce 20 µl. Mezi vektorem a fragmentem byl dodržován molární poměr 1:20. 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 ^{0}C po dobu jedné hodiny. Enzym a pufr byl odstraněn komerční soupravou určenou pro tyto účely.

3.3.7 Agarosová elektroforéza DNA

Elektroforetické rozdělování fragmentů DNA je založeno na rozdílné pohyblivosti, resp. velikosti molekul DNA. Byl používán agarosový gel koncetrace 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. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Výsledky

4.1.1 Strategie záměny signální sekvence

Jako templát pro PCR reakci byl vzat vektor pYpMDHH+, který nese gen pro prekurzor kvasničné mitochondriální malátdehydrogenasy. Při amplifikci žádané sekvence byly použity dva primery. „Forward" primer byl navržen tak, že na svém 5´ konci nese sekvenci kódující signální sekvenci prekurzoru mitochondriální MDH melounu (nese unikátní restrikční místo NdeI). Do sekvence byla zavedena tzv. tichá mutace, která nemá vliv na aminokyselinovou sekvenci, ale zavádí nové unikátní restrikční místo BglII, které bylo později použito pro kontrolu konstruktu WpJAKO a pWYpMDHH+. „Reverse" primer nasedá za HindIII místem v genu kódujícím MDH (Schéma 1).

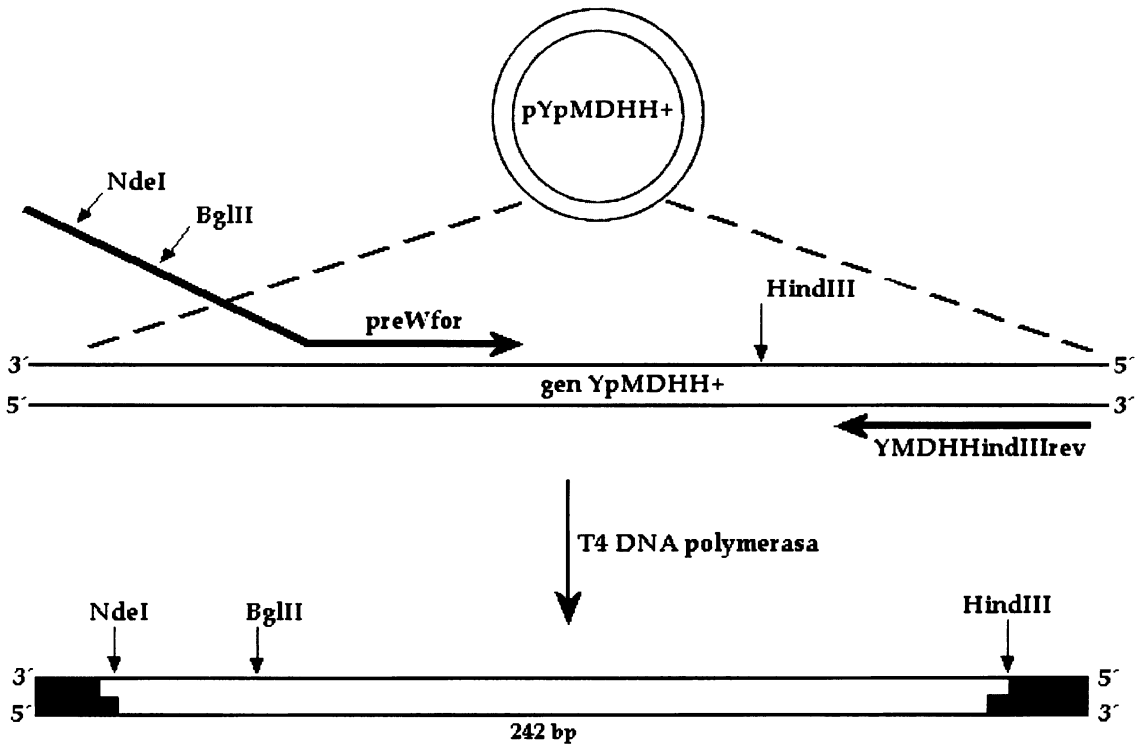


Schéma 1. Strategie PCR

Produkt PCR byl následně opracován restrikčními endonukleasami NdeI a HindIII, fragmenty rozděleny na agarosové elektroforéze a žádaný fragment vyizolován z gelu. Takto připravený fragment byl včleněn do plazmidu pJAKO opracovaného též restriktasami NdeI a HindIII (Schéma 2).

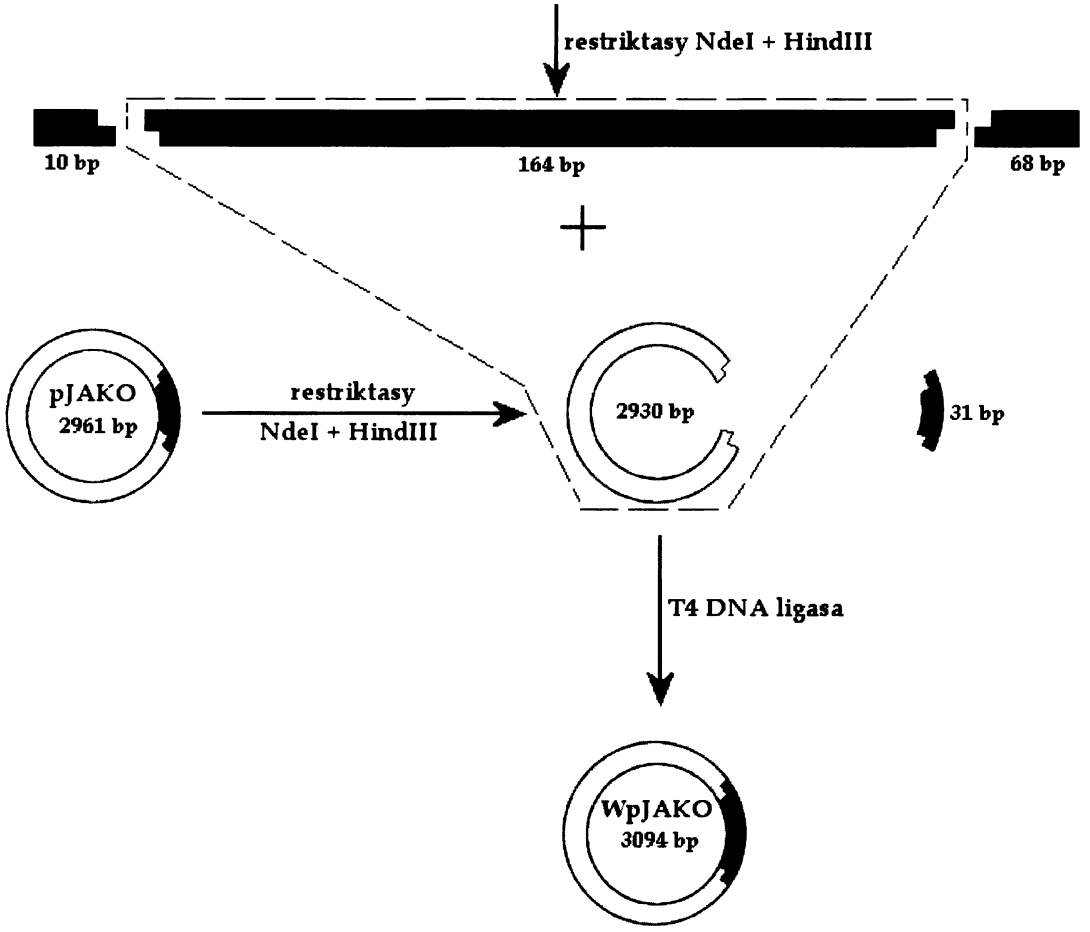


Schéma 2. Strategie včlenění PCR produktu do pJAKO

Konstruktem WpJAKO byly transformovány kompetentní buňky a plazmid byl následně vyizolován ve velkém množství. Z WpJAKO byl vyštěpen fragment (164 bp) pomocí restriktas NdeI a HindIII, který byl včleněn do expresního vektoru pYpMDHH+ opracovaného týmiž (Schéma 3).

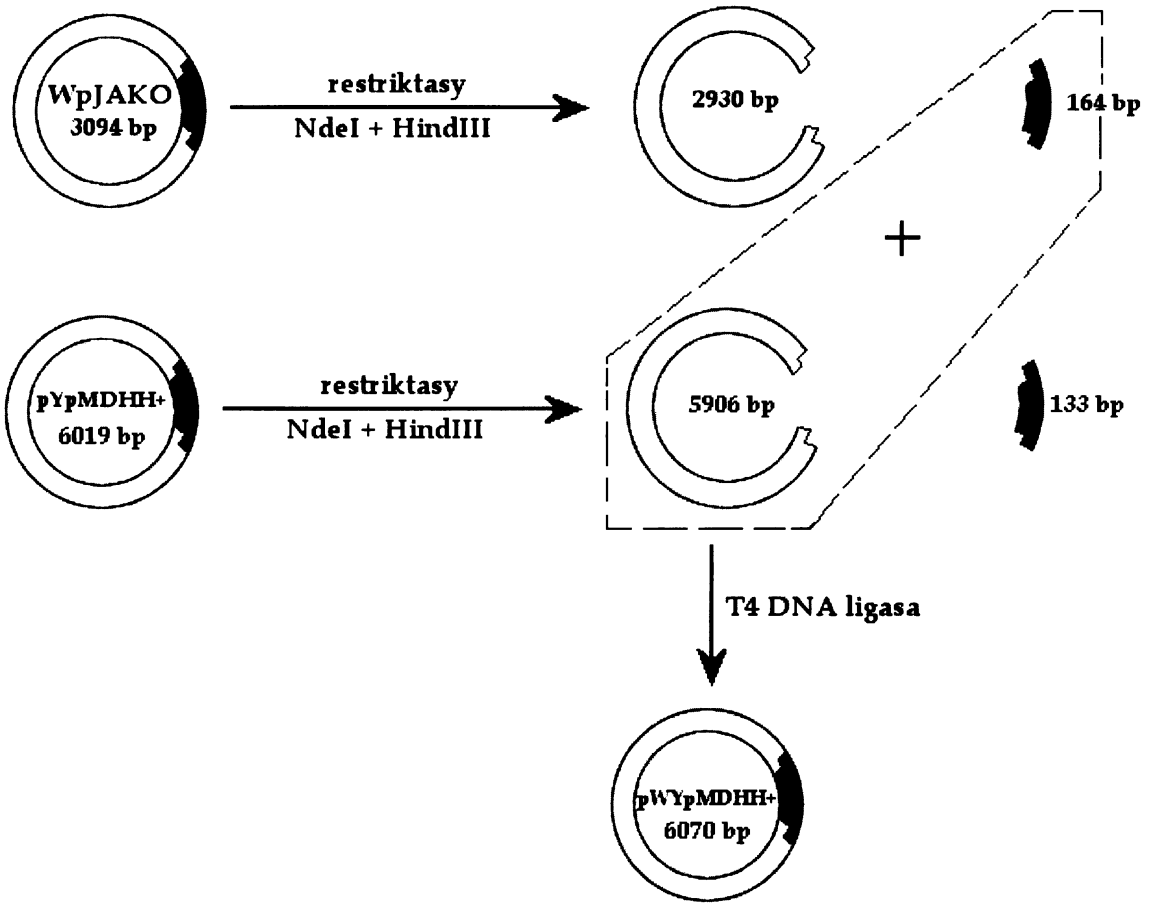


Schéma 3. Strategie přenesení sekvence z pJAKO do pYpMDHH+

4.1.2 Postup záměny signální sekvence

4.1.2.1 Amplifikace DNA se signální sekvencí

Startegie amplifikace je rozebrána v sekci 4.1.1 (Schéma 1).

Do reakce bylo vzato 100 ng templátu (pYpMDHH+), 20 pmol každého primeru a Taq DNA polymerasa. Bylo testováno 5 teplot, všechny vedly ke stejným výsledkům. Požadovaný amplifikovaný úsek byl veliký 242 bp (Obr. 10).

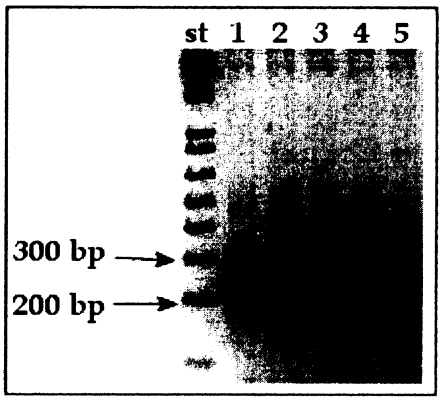
Program PCR (hot start):

1. denaturace 95 ^{0}C 5 min
2. přidání enzymu 68 ^{0}C
3. denaturace 94 ^{0}C 1 min
4. hybridizace 5 teplot (Obr. 10) 30s

5. polymerace 72 °C 30 s

6. dokončení 72 °C 5 min

kroky č. 3 až 5 opakovány 25x



Obr. 10. Amplifikovaný úsek DNA metodou PCR. 2% gel, naneseno 5 µl. Hybridizační teploty: 1 - 50,4 °C, 2 - 53,6 °C, 3 - 55,8 °C, 4 - 62,2 °C, 5 - 64,3 °C. St, standard.

4.1.2.2 Včlenění PCR produktu do pJAKO

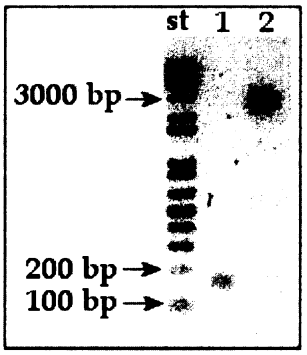
Produkt PCR byl včleněn do plazmidu pJAKO do míst NdeI a HindIII. Viz sekce 4.1.1, Schéma 2.

Restrikce PCR produktu

PCR produkty 10 reakcí byly spojeny a přečištěny na kolonce. Směs byla opracována nejdřívě restriktasou NdeI, byla rozdělena na agarosovém gelu a fragment o velikosti 232 bp byl vyizolován. Poté byl fragment opracován restriktasou HindIII a žádaný fragment 164 bp byl vyizolován stejným způsobem (Obr. 11-1).

Restrikce pJAKO

Plazmid pJAKO (10 µg) byl opracován restriktasou NdeI, směs byla přečištěna na kolonce a linearizovaný pJAKO naštěpen restriktasou HindIII. Fragmenty byly rozděleny na agarosové elektroforéze a otevřený plazmid (2930 bp) byl vyizolován. Následně byly jeho konce defosforylovány alkalickou fosfatasou CIP a fragment přečištěn na kolonce (Obr. 11-2).



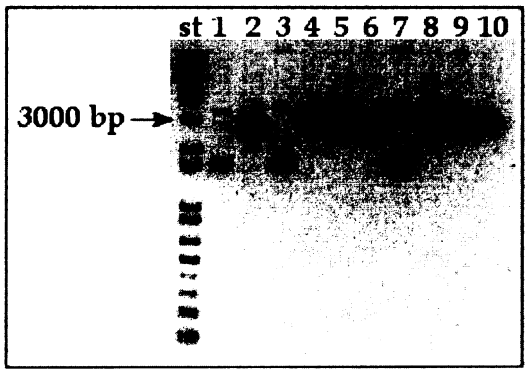
Obr. 11. Opracovaný PCR produkt a pJAKO
2% gel. 1 - PCR produkt opracovaný restriktasami NdeI a HindIII, 2 - pJAKO opracované restriktasami NdeI a HindIII. St, standard.

Ligace

Opracovaný PCR produkt (NdeI, HindIII) byl zaligován T4 DNA ligasou do opracovaného (NdeI, HindIII, CIP) pJAKO (→ WpJAKO). Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky DH5α (7 µl, elektroporace). Buňky byly vysety na plotny s LB agarem s ampicilinem (výsledná koncentrace 100 $\mu g ml^{-1}$), IPTG (výsledná koncentrace 30 $\mu g ml^{-1}$) a X-gal (výsledná koncetrace 0,4 mM) pro orientační modrobílou selekci klonů. Přes noc vyrostlo cca 50 kolonií, z toho většina bílých. Přeočkováno bylo 6 bílých kolonií, z nichž byl vyizolován plazmid.

Ověření ligace

Dva vybrané konstrukty byly podrobeny restrikci enzymem BglII, neboť vložená sekvence obsahuje unikátní restrikční místo BglII. U obou došlo k linearizaci plazmidu (Obr. 12), což dokazuje přítomnost vkládáné sekvence. Správnost sekvence byla nakonec ověřena sekvenováním.



Obr. 12. Kontrolní restrikce WpJAKO
0,8% gel. 1 - pJAKO, 2 - pJAKO/NdeI, 3 - WpJAKO1, 4 - WpJAKO1/NdeI, 5 - WpJAKO1/HindIII, 6 - WpJAKO1/BglII, 7 - WpJAKO2, 8 - WpJAKO2/NdeI, 9 - WpJAKO2/HindIII, 10 - WpJAKO2/BglII. St, standard.

4.1.2.3 Přenesení sekvence z pJAKO do pYpMDHH+

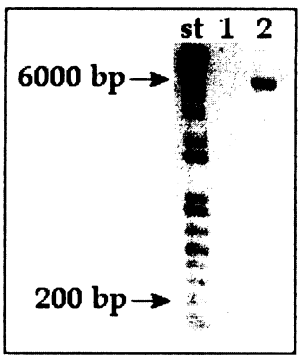
Sekvence NdeI/HindIII (obsahuje sekvenci amplifikovanou PCR) je vyštěpena z WpJAKO a včleněna do expresního vektoru pYpMDHH+ za místa NdeI a HindIII (Schéma 3).

Restrikce pYpMDHH+

Plazmid pYpMDHH+ (10 μg) byl opracován restriktasou NdeI, směs byla přečištěna na kolonce a linearizovaný pYpMDHH+ naštěpen restriktasou HindIII. Fragmenty byly rozděleny na agarosové elektroforéze a fragment o velikosti 5906 bp byl vyizolován (Obr. 13-2).

Restrikce WpJAKO

Plazmid WpJAKO (15 μg) byl opracován postupně restriktasami NdeI a HindIII. Fragmenty byly rozděleny na elektroforéze a fragment o velikosti 164 bp byl vyizolován (Obr. 13-1).



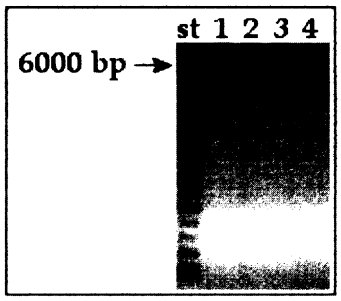
Obr. 13. Fragment vektoru WpJAKO a pYpMDHH+ 0,8% gel. Fragmenty: 1 - WpJAKO (164 bp), 2 - pYpMDHH+ (5906 bp). St, standard.

Ligace

Fragment z WpJAKO (164 bp) byl zaligován T4 DNA ligasou do fragmentu vektoru pYpMDHH+ (5906 bp). Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky DH5α (7 μl, elektroporace). Buňky byly vysety na plotny s LB agarem s kanamycinem (výsledná koncentrace 30 $\mu g ml^{-1}$). Přes noc vyrostlo cca 30 kolonií. Přeočkovány byly 4 kolonie, z nichž byl vyizolován plazmid.

Ověření ligace

Dva vybrané konstrukty byly podrobeny restrikci enzymem BglII, neboť vložená sekvence obsahuje unikátní restrikční místo BglII. Linearizovaný konstrukt svědčí o přítomnosti žádané sekvence (Obr. 14).



Obr. 14. Kontrolní restrikce pWYpMDHH+ 0,8% gel. 1 - pWYpMDHH+1, 2 - pWYpMDHH+1/BglII, 3 - pWYpMDHH+2, 4 - pWYpMDHH+2/BglII. St, standard.

4.2 Diskuse

V naší laboratoři je studován mechanimus rozpoznávání a proteolytické úpravy substrátů mitochondriální „processing" peptidasou. Především jde o snahu objasnit mechanisus prvního kontaktu substrátu s enzymem. Studijním modelem je α-podjednotka MPP *S. cerevisiae* a dynamika její interakce s prekurzory malátdehydrogenasy. Při vlastních měřeních se využívá přirozené fluorescence tryptofanu. Pro tato měření bylo žadoucí minimalizovat počet všech tryptofanů v MPP [80], kromě místa, kde je v důsledku interakce očekávána konformační změna - tzv. glycinového místa (2.2.3). Bylo zjištěno, že během interakce dochází k vzájemnému pohybu domén α-MPP [51]. Předpokládáme, že rozsah tohoto pohybu je důsledkem různé délky signálních sekvencí, což se v současnosti snažíme prokázat.

Za tímto účelem je třeba vyvinout sérii substrátů (stejných po odštěpení signální sekvence) s různou délkou signálních sekvencí. Jako výchozí substrát byla zvolena MDH *S. cerevisiae* (YpMDH), jejíž signální sekvence (9 AK) byla nahrazena signální sekvencí myší MDH (*Mus musculus*; 16 AK; MYpMDHH). Třetí zvolenou signální sekvencí je sekvence MDH melounu (*Citrullus lanatus*; 25 AK; WYpMDH) a příprava právě tohoto konstruktu byla cílem této bakalářské práce.

Strategie přípravy expresního vektoru pWYpMDHH+ nesoucího gen pro WYpMDH je rozebrána v sekci 4.1.1. Během jeho přípravy jsme narazli na dva problémy. Nejdříve nefungovala ampliface dané sekvence metodou PCR. Zkoušeli jsme různé teploty, polymerasy (DyNAzyme DNA polymerase, DyNAzyme DNA polymerase EXT) a příměsi (glycerol, betain, DMSO), ale nakonec se ukázalo, že problém byl ve „forward" primeru. Nechali jsme jej prodloužit o tři báze na 3´ konci a poté amplifikace fungovala bez problémů (4.1.2).

Druhým problémem, který nám zkomplikoval přípravu konstruktu pWYpMDHH+, byla mutace v NdeI místu v konstruktu WpJAKO, která znemožnila získání žádaného fragmentu. Ligace PCR produktu do pJAKO proto

byla provedena znovu, tentokrát již úspěšně. Závěrečná ligace do pYpMDHH+ proběhla bez problémů.

Expresní vektor pWYpMDHH+ byl připraven. Následovat bude testování exprese, purifikace proteinu WYpMDHH+, aktivitní testy proteinu s mitochondriální „processing" peptidasou (zda je substrátem MPP) a nakonec měření dynamiky enzym-substrát fluorescenčními metodami.

5. ZÁVĚR

1. Byla provedena rešerše literatury shrnují poznatky o struktuře a funkci mitochondriální „processing" peptidasy a jejích substrátech s ohledem na mechanismus proteolytické úpravy těchto substrátů MPP.

2. Byl připraven expresní vektor nesoucí gen pro prekurzor mitochondriální malátdehydrogenasy *Saccharomyces cerevisiae* nesoucí na N-konci signální sekvenci mitochondriální malátdehydrogenasy *Citrullus lanatus*.

6. SEZNAM LITERATURY

[1] F. Foury, T. Roganti, N. Lecrenier, B. Purnelle, **The komplete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae**, FEBS Lett. 440 (1998) 325-331.

[2] A. Goffeau, B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H.Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H., Tettelin, S.G. Oliver, **Life with 6000 genes**, Science 274 (1996), 563-567.

[3] F. U. Hartl, N. Pfanner, D. W. Nicholson, W. Neupert, **Mitochondrial protein import**, Biochim. Biophys. Acta 988 (1989), 1-45.

[4] K. Dietmeier, A. Honlinger, U. Bomer, P. J. Dekker, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Kubrich, N. Pfanner, **Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore**, Nature 388 (1997), 195-200.

[5] P. J. Dekker, F. Martin, A. C. Maarse, U. Bomer, H. Muller, B. Guiard, M. Meijer, J. Rassow, N. Pfanner, **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. 16 (1997), 5408-5419.

[6] G. Duby, M. Boutry, **Mitochondrial protein import mechinery and targeting information**, Plant Science 162 (2002), 477-490.

[7] M. W. Murcha, D. Elhafez, A. H. Millar, J. Whelan, **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. 344 (2004), 443-454.

[8] J. P. Hendrick, P. E. Hodges, 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. USA 86 (1989), 4056-4060.

[9] G. Schneider, S. Sjoling, E. Wallin, P. Wrede, E. Glaser, G. von Heijne, **Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides**, Proteins 30 (1998), 49-60.

[10] G. von Heijne, J. Steppuhn, R. G. Herrmann, **Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides**, Eur. J. Biochem. 180 (1989), 535-545.

[11] T. Endo, S. Mitsui, M. Nakai, D. Roise, **Binding of mitochondrial presequences to yeast cytosolic heat shock protein 70 depends on the amphiphilicity of the presequence**, J. Biol. Chem. 271 (1996), 4161 - 4167.

[12] A. L. Fink, **Chaperone-mediated protein folding**, Physiol. Rev. 79 (1999), 425–449.

[13] O. Gakh, P. Cavadini, G. Isaya, **Mitochondrial processing peptidases**, Biochim. Biophys. Acta 1592 (2002), 63-77.

[14] J. Martin, K. Mahlke, N. Pfanner, **Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences**, J. Biol. Chem. 25 (1991), 18051-18057.

[15] N. Pfanner, N. Wiedemann, **Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases**, Curr. Opin. Cell Biol. 14 (2002), 400-411.

[16] P. J. Dekker, F. Martin, A. C. Maarse, U. Bomer, H. Muller, B. Guiard, M. Meijer, J. Rassow, N. Pfanner, **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. 16 (1997), 5408-5419.

[17] M. Horst, A. Azem, G. Schatz, B. S. Glick, **What is the driving force for protein import into mitochondria?**, Biochim. Biophys. Acta 16 (1997), 71-78.

[18] W.A. Fenton, F. Kalousek, Adv. Mol. Cell. Biol. 17 (1996), 163–191.

[19] P. Cavadini, O. Gakh, G. Isaya, **Protein import and processing reconstituted with isolated rat liver mitochondria and recombinant mitochondrial processing peptidase**, Methods 26 (2002), 298-306.

[20] G. Isaya, F. Kalousek, **Mitochondrial intermediate peptidase**, Methods Enzymol. 248 (1995),

556-567.

[21] A. B. Taylor, B. S. Smith, S. Kitada, K. Kojima, H. Miyaura, Z. Otwinowski, A. Ito, J. Deisenhofer, **Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences**, Structure 9 (2001), 615-625.

[22] G. Hawlitschek, H. Schneider, B. Schmidt, M. Tropschug, F. U. Hartl, W. Neupert, **Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein**, Cell 53 (1988), 795-806.

[23] M. Yang, R. E. Jensen, M. P. Yaffe, W. Oppliger, G. Schatz, **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. 7 (1988), 3857-3862.

[24] W. J. Ou, A. Ito, H. Okazaki, T. Omura, **Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria**, EMBO. J. 8 (1989), 2605-2612.

[25] H. P. Braun, M. Emmermann, V. Kruft, U. K. Schmitz, **The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain**, EMBO. J. 11 (1992), 3219-3227.

[26] T. Niidome, S. Kitada, K. Shimokata, T. Ogishima, A. Ito, **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. 269 (1994), 24719-24722.

[27] A. C. Eriksson, S. Sjoling, E. Glaser, **Characterization of the bifunctional mitochondrial processing peptidase (MPP)/bc1 complex in Spinacia oleracea**, J. Bioenerg. Biomembr. 28 (1996), 285-292.

[28] J. Kleiber, F. Kalousek, M. Swaroop, L. E.Rosenberg, **The general mitochondrial matrix processing protease from rat liver: structural characterization of the catalytic subunit**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 7978-7982.

[29] P. C. McAda, M. G. Douglas, **A neutral metallo endoprotease involved in the processing of an F1-ATPase subunit precursor in mitochondria**, J. Biol. Chem. 257 (1982), 3177-3182.

[30] J. G. Conboy, W. A. Fenton, L. E. Rosenberg, **Processing of pre-ornithine transcarbamylase requires a zinc-dependent protease localized to the mitochondrial matrix**, Biochem. Biophys. Res. Commun. 105 (1982), 1-7.

[31] B. Schmidt, E. Wachter, W. Sebald, W. Neupert, **Processing peptidase of Neurospora mitochondria. Two-step cleavage of imported ATPase subunit 9**, Eur. J. Biochem. 144 (1984), 581-588.

[32] P. Luciano, K. Tokatlidis, I. Chambre, J. C. Germanique, V. Geli, **The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase**, J. Mol. Biol. 280 (1998), 193-199.

[33] H. P. Braun, U. K. Schmitz, **Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease?**, Trends Biochem. Sci. 20 (1995), 171-175.

[34] E. A. Berry, L. S. Huang, V. J. DeRose, **Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of higher plants. Isolation and characterization of the bc1 complex from potato tuber mitochondria**, J. Biol. Chem. 266 (1991), 9064-9077.

[35] H. P. Braun, V. Kruft, U. K. Schmitz, **Molecular identification of the ten subunits of cytochrome-c reductase from potato mitochondria**, Planta. 193 (1994), 99-106.

[36] S. Brumme, V. Kruft, U. K. Schmitz, H. P. Braun, **New insights into the co-evolution of cytochrome c reductase and the mitochondrial processing peptidase**, J. Biol. Chem. 273 (1998), 13143-13149.

[37] E. Glaser, P. Dessi, **Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants**, J. Bioenerg. Biomembr. 31 (1999), 259-274.

[38] P. Mitchell, **Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems**, J. Theor. Biol. 62 (1976), 327-367.

[39] K. Deng, S. K. Shenoy, S. C. Tso, L. Yu, C. A. Yu, **Reconstitution of mitochondrial processing peptidase from the core proteins (subunits I and II) of bovine heart**

mitochondrial cytochrome bc1 complex, J. Biol. Chem. 276 (2001), 6499-6505.

[40] V. Paces, L. E. Rosenberg, W. A. Fenton, F. Kalousek, **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. USA 90 (1993), 5355-5358.

[41] U. Schulte, M. Arretz, H. Schneider, M. Tropschug, E. Wachter, W. Neupert, H. Weiss, **A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis**, Nature 339 (1989), 147-149.

[42] H. Schneider, M. Arretz, E. Wachter, W. Neupert, **Matrix processing peptidase of mitochondria. Structure-function relationships**, J. Biol. Chem. 265 (1990), 9881-9887.

[43] G. Hawlitschek, H. Schneider, B. Schmidt, M. Tropschug, F. U. Hartl, W. Neupert, **Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein**, Cell 53 (1988), 795-806.

[44] H. P. Braun, L. Jansh, U.K. Schmits, **Proteolysis and protein turn-over**, Proteolysis in cell function (1997), 290-297.

[45] K. Deng, L. Zhang, A. M. Kachurin, L. Yu, D. Xia, H. Kim, J. Deisenhofer, C. A. Yu, **Activation of a matrix processing peptidase from the crystalline cytochrome bc1 complex of bovine heart mitochondria**, J. Biol. Chem. 273 (1998), 20752-20757.

[46] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, **Evolutionary families of metallopeptidases**, Methods Enzymol. 248 (1995), 183-228.

[47] T. Oshima, E. Yamasaki, T. Ogishima, K. Kadowaki, A. Ito, S. Kitada, **Recognition and processing of a nuclear-encoded polyprotein precursor by mitochondrial processing peptidase**, Biochem. J. 385 (2005), 755-761.

[48] A. Ito, **Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins**, Biochem. Biophys. Res. Commun. 265 (1999), 611-616.

[49] K. Shimokata, S. Kitada, T. Ogishima, A. Ito, **Role of alpha-subunit of mitochondrial processing peptidase in substrate recognition**, J. Biol. Chem. 25 (1998), 25158-25163.

[50] Y. Nagao, S. Kitada, K. Kojima, H. Toh, S. Kuhara, T. Ogishima, A. Ito, **Glycine-rich region of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is essential for binding and cleavage of the precursor proteins**, J. Biol. Chem. 275 (2000), 34552-34556.

[51] J. Janata, K. Holá, M .Kubala, O. Gakh, N. Parkhomenko, A. Matušková, E. Kutejová, E. Amler, **Substrate evokes translocation of both domains in the mitochondrial processing peptidase a-subunit during which the C-terminus acts as a stabilizing element**, Biochem. Biophys. Res. Commun. 316 (2004), 211-217.

[52] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, **Homologues of insulinase, a new superfamily of metalloendopeptidases**, Biochem. J. 275 (1991), 389-391.

[53] S. Kitada, K. Shimokata, T. Niidome, T. Ogishima, A. Ito, **A putative metal-binding site in the beta subunit of rat mitochondrial processing peptidase is essential for its catalytic activity**, J. Biochem. 117 (1995), 1148-1150.

[54] P. Luciano, V. Geli, **The mitochondrial processing peptidase: function and specificity**, Experientia. 52 (1996), 1077-1082.

[55] H. M. Striebel, P. Rysavy, J. Adamec, J. Spizek, F. Kalousek, **Mutational analysis of both subunits from rat mitochondrial processing peptidase**, Arch. Biochem. Biophys. 335 (1996), 211-218.

[56] K. Moriwaki, T. Ogishima, A. Ito, **Analysis of recognition elements for mitochondrial processing peptidase using artificial amino acids: roles of the intervening portion and proximal arginine**, J. Biochem. 126 (1999), 874-878.

[57] D. S. Allison, G. Schatz, **Artificial mitochondrial presequences**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 9011-9015.

[58] D. Roise, G. Schatz, **Mitochondrial presequences**, J. Biol. Chem. 263 (1988), 4509-4511.

[59] S. S. Branda, G. Isaya, **Prediction and identification of new natural substrates of the yeast**

mitochondrial intermediate peptidase, J. Biol. Chem. 270 (1995), 27366-27373.

[60] E. Glaser, S. Sjoling, M. Tanudji, J. Whelan, **Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation**, Plant. Mol. Biol. 38 (1998), 311-338.

[61] Y. Gavel, G. von Heijne, **Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides**, Protein Eng. 4 (1990), 33-37.

[62] A. L. Horwich, F. Kalousek, L. E. Rosenberg, **Arginine in the leader peptide is required for both import and proteolytic cleavage of a mitochondrial precursor**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4930-4933.

[63] T. Ogishima, T. Niidome, K. Shimokata, S. Kitada, A. Ito, **Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidase**, J. Biol. Chem. 270 (1995), 30322-30326.

[64] M. C. Song, K. Shimokata, S. Kitada, T. Ogishima, A. Ito, **Role of basic amino acids in the cleavage of synthetic peptide substrates by mitochondrial processing peptidase**, J. Biochem. 120 (1996), 1163-1166.

[65] A. L. Horwich, F. Kalousek, W. A. Fenton, R. A. Pollock, L. E. Rosenberg, **Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: definition of critical regions and residues in the leader peptide**, Cell. 44 (1986), 451-459.

[66] T. Nishi, F. Nagashima, S. Tanase, Y. Fukumoto, T. Joh, K. Shimada, Y. Matsukado, Y. Ushio, Y. Morino, **Import and processing of precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase. Structure-function relationships of the presequence**, J. Biol. Chem. 264 (1989), 6044-6051.

[67] A. L. Horwich, F. Kalousek, W. A. Fenton, K. Furtak, R. A. Pollock, L. E. Rosenberg, **The ornithine transcarbamylase leader peptide directs mitochondrial import through both its midportion structure and net positive charge**, J. Cell. Biol. 105 (1987), 669-677.

[68] W. J. Ou, T. Kumamoto, K. Mihara, S. Kitada, T. Niidome, A. Ito, T. Omura, **Structural requirement for recognition of the precursor proteins by the mitochondrial processing peptidase**, J. Biol. Chem. 269 (1994), 24673-24678.

[69] D. T. Mooney, D. B. Pilgrim, 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. 10 (1990), 2801-2808.

[70] M. C. Song, T. Ogishima, 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. 124 (1998), 1045-1049.

[71] K. Shimokata, T. Nishio, M. C. Song, S. Kitada, T. Ogishima, A. Ito, **Substrate recognition by mitochondrial processing peptidase toward the malate dehydrogenase precursor**, J Biochem. 122 (1997), 1019-1023.

[72] M. Boutry, F. Chaumont, **Protein targeting to plant mitochondria**, Plant mitochodnria, 1993, 323-329.

[73] K. Thornton, Y. Wang, H. Weiner, D. G. Gorenstein, **Import, processing, and two-dimensional NMR structure of a linker-deleted signal peptide of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase**, J. Biol. Chem. 268 (1993), 19906-19914.

[74] P. K. Hammen, D. G. Gorenstein, H. Weiner, **Structure of the signal sequences for two mitochondrial matrix proteins that are not proteolytically processed upon import**, Biochemistry 33 (1994), 8610-8617.

[75] Y. Abe, T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo, D. Kohda, **Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20**, Cell 100 (2000), 551-560.

[76] K. Holá, A. Matušková, N. Parkhomenko, M. Kubala, J. Večeř, P. Heřman, O. Gakh, E. Kutejová, E. Amler, J. Janata, **Primary contact of the glycine-rich loop of mitochondrial processing peptidase α-subunit with substrate triggers presequence pulling into enzyme cavity**, submited , 2005.

[77] J. A. Jarvis, M. T. Ryan, N. J. Hoogenraad, D. J. Craik, P. B. Hoj, **Solution structure of the**

acetylated and noncleavable mitochondrial targeting signal of rat chaperonin 10, J. Biol. Chem. 270 (1995), 1323-1331.

[78] G. Duby, M. Oufattole, M. Boutry, **Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import**, Plant J. 27 (2001), 539-549.

[79] O. Gakh, T. Obšil, J. Adamec, J. Spížek, E. Amler, J. Janata, F. Kalousek, **Substrate binding changes conformation of the a-, but not the b-subunit of mitochondrial processing peptidase**, Arch. Biochem. Biophys. 385 (2001), 392-396.

[80] Matušková A., **Cílená mutageneze mitochondriální procesující peptidasy pro sledování dynamiky interakce enzymu s proteinovými prekurzory**, Diplomová práce (2003), VŠCHT

[81] G. Alper, V. Narayanan, **Friedreich´s ataxia**, Pediatr. Neurol. 28 (2003), 335-341.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratky použitých chemikálií jsou uvedeny v sekci 3.1.4 (str. 26).

MPP	- mitochondriální „processing" peptidasa (EC 3.4.24.64)
IMP	- peptidasa vnitřní membrány (EC 3.4.99)
MIP	- mitochondriální „intermediate" peptidasa (EC 3.4.24.59)
TOM	- komplex translokasy vnější membrány
TIM	- komplex translokasy vnitřní membrány
NMR	- nukleární magnetická rezonance
PCR	- Polymerace Chain Reaction
MDH	- malátdehydrogenasa
pMDH	- prekurzor MDH (MDH se signální presekvencí)
YpMDH	- prekurzor MDH kvasinky
YpMDHH+	- prekurzor MDH kvasinky s His-kotvou
pYpMDHH+	- plazmid nesoucí gen pro YpMDHH+
MYpMDH	- prekurzor MDH kvasinky s presekvencí z myší MDH
MYpMDHH+	- MYpMDH s His-kotvou na C-konci
pMYpMDHH+	- plazmid nesoucí gen pro MYpMDHH+
WYpMDH	- prekurzor MDH kvasinky s presekvencí z MDH melounu
WYpMDHH+	- WYpMDH s His-kotvou na C-konci
pWYpMDHH+	- plazmid nesoucí gen pro WYpMDHH+