

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



## **Vývoj mitochondriální procesující peptidasy a jejích substrátů**

The Evolution of Mitochondrial Processing Peptidase and Its Substrates

Dana Chytrá

Školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.

2009/2010

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za odborného vedení Ing. Jiřího Janaty, CSc. Použitou literaturu uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne 21. dubna 2010

.....

Podpis autora

**Poděkování:**

Chtěla bych vyjádřit poděkování Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za cenné připomínky, odborné rady a podněty k zamyšlení během vypracování bakalářské práce. Dále děkuji Ing. Anně Matuškové za trpělivé zodpovídání všech mých dotazů a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému manželovi za oporu a povzbuzení.

## Obsah:

Abstrakt .....	5
Klíčová slova .....	6
Seznam použitých zkratk .....	6
1. Úvod .....	8
2. Evoluční původ mitochondrie a od ní odvozených organel .....	10
2.1. Původ mitochondrie .....	10
2.2. Organely odvozené od mitochondrie .....	10
2.2.1. Hydrogenosom .....	11
2.2.2. Mitosom .....	11
3. Obecný popis systému transportu preproteinů z cytosolu do mitochondrie .....	12
3.1. Prekurzory mitochondriálních proteinů .....	12
3.2. Translokace preproteinů do matrix .....	12
3.2.1. TOM komplex .....	13
3.2.2. TIM komplex .....	14
4. Mitochondriální procesující peptidasa a její redukované formy .....	16
4.1. MPP .....	16
4.1.1. Původ MPP .....	16
4.1.2. Charakterizace MPP .....	17
4.1.2.1. $\alpha$ -MPP .....	17
4.1.2.2. $\beta$ -MPP .....	18
4.2. HPP .....	19
4.3. GPP .....	20
5. Charakteristické prvky prekvencí prekurzorů proteinů .....	21
6. Studium interakce MPP-substrát .....	23
6.1. Studium rozpoznání substrátů $\alpha$ podjednotkou MPP alternativními přístupy .....	25
6.1.1. Využití přirozené fluorescence tryptofanu .....	26
6.1.2. Simulace molekulární dynamiky .....	27
Závěr .....	29
Seznam použité literatury .....	30

## Abstrakt

Mitochondriální procesující peptidasa (MPP) nebo její redukované formy vyskytující se v hydrogenosomech a mitosomech patří mezi esenciální enzymy vyskytující se ve všech eukaryotech.

MPP se skládá ze dvou podobných, ale funkčně odlišných podjednotek,  $\alpha$ -MPP a  $\beta$ -MPP, jejichž vzájemná spolupráce je pro funkci enzymu nutná. Univerzální funkce tohoto enzymu je v rozeznání a odštěpení velkého množství presekvencí preproteinů, lišící se délkou i primární sekvencí aminokyselin. Kombinací biochemických, molekulárně-genetických a fyzikálních metod byla pozorována změna konformace  $\alpha$ -MPP po navázání substrátu, a tak byl částečně objasněn mechanismus rozpoznávání široké škály substrátů.

Znalost mechanismu fungování MPP poskytuje poznatky i o jejích redukovaných formách, mitosomální procesující peptidase z *Giardia* (GPP) a hydrogenosomální procesující peptidase (HPP), vyskytujících se převážně v jednobuněčných parazitech. Funkce těchto peptidas, množství substrátů i vlastnosti presekvencí, které rozeznávají, se během evoluce přizpůsobily nižším požadavkům parazitů.

## Abstract

Mitochondrial processing peptidase (MPP) or its reduced forms occurring in hydrogenosomes and mitosomes are ranked among essential enzymes of all Eucarya.

MPP consists of two similar but functionally different subunits,  $\alpha$ -MPP and  $\beta$ -MPP. The cooperation of these subunits is necessary for enzyme function. A universal function of this enzyme is in recognition and cleavage of great number of preprotein presequences, which differ in length and amino acid sequence. The conformational change of  $\alpha$ -MPP after substrate binding was apparent after using the combination of biochemical, molecular-genetical and physical methods. A mechanism of recognition of wide variety of substrates was therefore partly explained.

Knowledge of MPP function mechanism also gives information about its reduced forms, *Giardia* mitosomal processing peptidase (GPP) and hydrogenosomal processing peptidase (HPP), occurring mainly in unicellular parasites. Functions of these peptidas, quantity of substrates as well as properties of recognized presequences adapted to lower requirements of parasites.

**Klíčová slova:**  $\alpha$ -MPP,  $\beta$ -MPP, GRL, Tom20, proteinový import, presekvence, prekurzor

**Key words:**  $\alpha$ -MPP,  $\beta$ -MPP, Tom20, GRL, protein import, presequence, precursor

## Seznam použitých zkratek

A	amino acid alanine	aminokyselina alanin
ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
COX IV	yeast mitochondrial cytochrome oxidase <i>c</i> subunit IV	podjednotka IV kvasinkové mitochondriální cytochromoxidasy <i>c</i>
E	amino acid glutamic acid	aminokyselina glutamová kyselina
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
F	amino acid phenylalanine	aminokyselina fenylalanin
FRET	fluorescence resonance energy transfer	přenos energie fluorescenční resonancí
G	amino acid glycine	aminokyselina glycin
GPP	<i>Giardia</i> mitosomal processing peptidase	mitosomální procesující peptidasa z <i>Giardia</i>
GRL	glycine-rich loop	glycinová smyčka
H	amino acid histidine	aminokyselina histidin
HPP	hydrogenosomal processing peptidase	hydrogenosomální procesující peptidasa
Hsp70	heat shock protein	protein teplotního šoku (chaperon, 70kDa)
I	amino acid isoleucine	aminokyselina isoleucin
IMP	inner membrane peptidase	vnitřní membránová peptidasa
IMS	intermembrane space	mezimembránový prostor
L	amino acid leucine	aminokyselina leucin
MIP	mitochondrial intermediate peptidase	mitochondriální „intermediate“ peptidasa
MPP	mitochondrial processing peptidase	mitochondriální procesující peptidasa
mtHsp70	mitochondrial matrix Hsp70	mitochondriální matrixový Hsp70

MTS	mitochondrial targeting sequence	sekvence směřující protein do mitochondrie
NMR	nuclear magnetic resonance	jaderná magnetická resonance
PAM	the presequence translocase-associated motor	s translokasou asociovaný motor aktivně transportující prekvence
pALDH	aldehyde dehydrogenase prekursor	prekurzor aldehyddehydrogenasy
pMDH	malate dehydrogenase prekursor	prekurzor malátdehydrogenasy
R	amino acid arginine	aminokyselina arginin
S	amino acid serine	aminokyselina serin
T	amino acid threonine	aminokyselina threonin
TIM	translocase of the inner mitochondrial membrane	translokasa vnitřní mitochondriální membrány
TOM	translocase of the outer mitochondrial membrane	translokasa vnější mitochondriální membrány
Y	amino acid tyrosine	aminokyselina tyrosin

## 1. Úvod

Vznik mitochondrie a přesun velké části genetické informace z mitochondrie do jaderné DNA hostitele během evoluce (Timmis *et al.*, 2004) s sebou přinesl nutnost přítomnosti systémů importujících preproteiny do mitochondrie.

Jaderně kódované proteiny určené do mitochondrie většinou obsahují odštěpitelnou N-terminální signální sekvenci (Gakh *et al.*, 2002). Presekvence preproteinů je rozpoznána receptory na povrchu mitochondrie. Díky její schopnosti utvořit amfifilní  $\alpha$ -šroubovici (Roise *et al.*, 1988), kde se na jedné straně nachází hydrofobní část a na druhé kladně nabitě aminokyselinové zbytky, jsou preproteiny transportovány do matrix mitochondrie kanály tvořenými komplexy translokas umístěnými ve fosfolipidových dvojvrstvách. Signální sekvence je zde odštěpena (Gakh *et al.*, 2002) pomocí mitochondriální procesující peptidasy (MPP – mitochondrial processing peptidase).

Proces translokace přes vnější a vnitřní membránu je relativně dobře znám, ale otázkou stále zůstává, jak evolučně konzervovaná MPP může rozlišit tak velkou škálu sekvencí i délkou odlišných presekvenčí (von Heijne, 1986), ve správném místě je odštěpit, a tím proteinu umožnit zaujmout svou nativní konformaci. I když jsou presekvence velmi odlišné, přesto je několik vlastností, které je spojuje a které hrají zásadní úlohu v procesu rozpoznávání (von Heijne, 1986).

MPP se skládá z  $\alpha$  podjednotky ( $\alpha$ -MPP), jejíž funkce je nejspíše v rozeznávání substrátů (Taylor *et al.*, 2001), a z  $\beta$  podjednotky ( $\beta$ -MPP), na které se vyskytuje katalytické místo peptidasy (Luciano *et al.*, 1996). Enzym je aktivní pouze v dimeru, kde se mezi podjednotkami utvoří negativně nabitá dutina, do které se substrát naváže ve své rozvinuté formě (Taylor *et al.*, 2001). Na  $\alpha$ -MPP se vyskytuje konzervovaná smyčka s vysokým obsahem zbytků glycinu (GRL – glycine-rich loop), která hraje zásadní úlohu při prvním kontaktu enzymu se substrátem, protože obsahuje hydrofobní a především aromatické aminokyselinové zbytky (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010). Dvořáková-Holá a kol. předpokládají, že způsob rozeznání presekvenčí pomocí GRL je na stejném principu, na kterém rozeznává presekvenčí receptor importního systému Tom20 (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010).

V některých organismech došlo k redukci mitochondrií na organely (mitosomy, hydrogenosomy) vykonávající méně funkcí, které jsou však specializované (Smid *et al.*, 2008). Nebylo již třeba tak velkého množství proteinů a složitého systému maturujícího preproteiny, proto se přizpůsobily jak proteasy vyskytující se v těchto organelách a plnící podobnou funkci jako MPP tak některé vlastnosti presekvenčí (Dyall *et al.*, 2004).



Kombinací biochemických, molekulárně-genetických a fyzikálních metod, které se uplatňují na modelu MPP, je možné sledovat změnu konformace peptidas po navázání substrátu a částečně objasnit mechanismus rozpoznávání. Ve své práci jsem se pokusila shrnout dosud zjištěné poznatky.

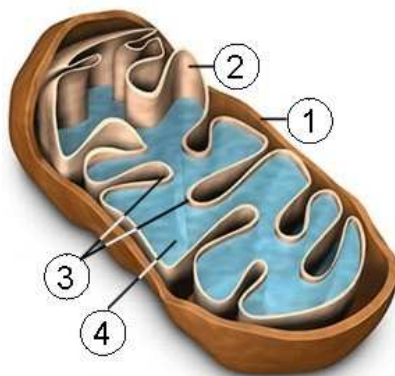
## 2. Evoluční původ mitochondrie a od ní odvozených organel

### 2.1. Původ mitochondrie

Vznik mitochondrie vysvětluje endosymbiotická teorie, která předpokládá pohlcení aerobní  $\alpha$ -proteobakterie, patřící do skupiny Rickettsiales, hostitelskou anaerobní buňkou (Embley *et al.*, 2006). Tato prokaryota přesunula velkou část své genetické informace do jádra (Timmis *et al.*, 2004) a přestala být plně nezávislým organismem (Dyall *et al.*, 2004). Přesunem genetické informace z mitochondrie do jaderné DNA hostitele během evoluce vznikla nutnost systému importujícího preproteiny do mitochondrie (Smid *et al.*, 2008). Jedná se o adresování presekvenčí, vznik translokujícího systému a systému maturující preprotein.

Teorii o prokaryotickém původu mitochondrie podporují i některé vlastnosti mitochondrie, které jsou velmi podobné bakteriím, např. dvojitá membrána, která organelu obklopuje (Obr. 1), ribozomy prokaryotního typu, odlišná mitochondriální DNA od buněčné aj.

Mitochondrie nebo od mitochondrie odvozené organely jsou důležitou součástí eukaryotické buňky. Na rozdíl od organel odvozených od mitochondrie, mitochondrie zastává velké množství funkcí. Hlavní funkcí mitochondrie je tvorba energie ve formě ATP pomocí biologických oxidací (Ritz *et al.*, 2005). Tento druh energie nutný pro všechny buněčné procesy.



**Obr. 1** Struktura mitochondrie. 1 – vnější membrána, 2 – krista, 3 – vnitřní membrána, 4 – matrix. Mezi vnější a vnitřní membránou se nachází mezimembránový prostor.

(Převzato z [http://www.metabolickety.py.com/strava\\_3.htm](http://www.metabolickety.py.com/strava_3.htm)).

### 2.2. Organely odvozené od mitochondrie

Mezi organely odvozené od mitochondrie patří hydrogenosomy a mitosomy (Embley *et al.*, 2006). Tyto organely se vyskytují v jednobuněčných organismech žijících v prostředí s nedostatkem kyslíku, např. ve vnitrobuněčných parazitech. Dříve se předpokládalo, že tyto

organely a mitochondrie mají stejného prokaryotického předka, jen se od linie vedoucí k tvorbě mitochondrie oddělily (Brown *et al.*, 2007). V dnešní době však převažuje teorie, že hydrogenosomy a mitosomy vznikly redukcí mitochondrie (Embley *et al.*, 2006, Smid *et al.*, 2008). Tyto organely mají některé typicky mitochondriální vlastnosti, tj. některé proteiny (např. Hsp70, Hsp60), dvojitou membránu (Dolezal *et al.*, 2005, Dyall *et al.*, 2004) a konzervovaný (ale redukovaný) způsob transportu preproteinů do organely (Bradley *et al.*, 1997). Na druhou stranu se liší např. v tom, že až na výjimku, např. hydrogenosomy nálevníka *Nyctotherus ovalis* (Boxma *et al.*, 2005), neobsahují vlastní DNA, tudíž musí být všechny jaderně kódované proteiny určené do organely importovány.

Evoluční příbuznost těchto organel s mitochondriemi se nedá stanovit na základě genetické informace, protože DNA u většiny mitosomů a hydrogenosomů chybí, ale vychází se z přítomnosti některých typických výše zmíněných proteinů (Dyall *et al.*, 2000).

### **2.2.1. Hydrogenosom**

Hydrogenosomy se vyskytují v různých jednobuněčných eukaryotech, např. v lidském parazitu *Trichomonas vaginalis*. Konečným akceptorem elektronů není kyslík, a tak hydrogenosomy metabolizují pyruvát na acetát, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub> (Sutak *et al.*, 2004). Některé enzymy (např. hydrogenasa) jsou pro hydrogenosomy specifické, a u mitochondrií se tedy nevyskytují (Muller, 1997).

### **2.2.2. Mitosom**

Mitosomy se vyskytují např. u lidského parazita *Giardia intestinalis*. Mitosomy neplní funkci ATP syntézy (Embley *et al.*, 2006), ale obsahují dva mitochondriální proteiny uspořádávající Fe-S centra, která plní funkci kofaktorů přenosu elektronů (Smid *et al.*, 2008).

Substráty, které se do mitosomů dostanou (v dnešní době jich je známo pouze devět), většinou neobsahují N-terminální odštěpitelnou sekvenci (Smid *et al.*, 2008).

### 3. Obecný popis systému transportu preproteinů z cytosolu do mitochondrie

#### 3.1. Prekurzory mitochondriálních proteinů

Téměř všechny mitochondriální proteiny jsou kódovány v jádře (Gakh *et al.*, 2002). Existují různé systémy pro transport preproteinů do mitochondrie, ale nejběžnější je posttranslační import (Neupert *et al.*, 2007).

Preproteiny se v cytosolu nevyskytují samostatně ale v komplexu s faktory, např. cytosolickými chaperony Hsp70 a Hsp90, které je stabilizují, zabraňují jejich degradaci (Neupert *et al.*, 2007) a pomáhají preproteinům udržovat takovou konformaci, která jim umožní translokaci přes membrány do mitochondrie (Mihara *et al.*, 1996).

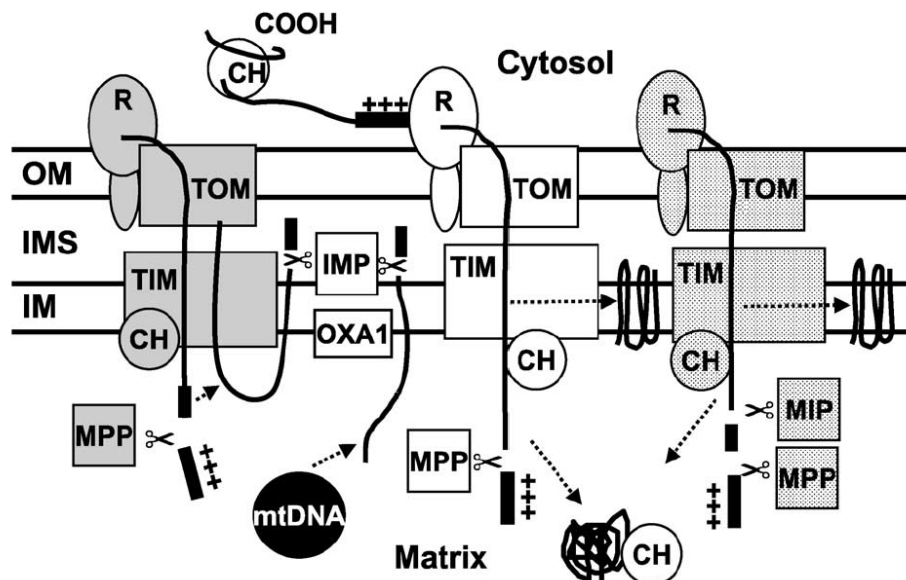
Většina proteinů je syntetizována na cytosolických ribosomech (Model *et al.*, 2002, Roise *et al.*, 1988) jako preproteiny obsahující na svém N-konci odštěpitelnou signální sekvenci směřující preprotein do mitochondrie (MTS – mitochondrial targeting sequence). Některé preproteiny neobsahují N-terminální signální sekvenci ale místo toho sekvenci vnitřní, např. prekurzory proteinů vnější membrány (Gakh *et al.*, 2002).

Proteolytické štěpení prekurzorů proteinů je v mitochondrii provedeno především třemi peptidasami (Gakh *et al.*, 2002). Mitochondriální procesující peptidasa (MPP) štěpí většinu mitochondriálních preproteinů; jak těch, které zůstávají v matrix, tak těch, které obsahují další třídící sekvenci. Vnitřní membránová peptidasa (IMP – inner membrane peptidase) štěpí signál směřující preprotein do mezimembránového prostoru poté, co byl pomocí MPP odštěpen signál směřující preprotein do matrix. Mitochondriální „intermediate“ peptidasa (MIP – mitochondrial intermediate peptidase) je nutná, obsahuje-li presekvence oktapeptidový signál (kap.5.), který vyžaduje dvě štěpení, tj. enzymem MPP i MIP (Obr. 2). Mezi takové proteiny patří především proteiny směřované do vnitřní membrány, ale i některé matrixové proteiny (Gakh *et al.*, 2002)

Vlastnosti, které jsou charakteristické pro MTS jsou podrobněji popsány v kapitole 5.

#### 3.2. Translokace preproteinů do matrix

Preproteiny se do mitochondrie dostávají pomocí dvou transportních komplexů (Neupert *et al.*, 2007) – TOM komplexem (translocase of the outer mitochondrial membrane) uloženým ve vnější mitochondriální membráně a TIM komplexem (translocase of the inner mitochondrial membrane) ve vnitřní mitochondriální membráně (Obr. 2). Studie ukázaly, že významná část těchto importních komplexů je u eukaryot konzervovaná (Iwahashi *et al.*, 1997).



**Obr. 2** Proteolytické úpravy prekurzorů mitochondriálních proteinů. CH, cytoplazmatické a mitochondriální chaperony; R, receptory vnější membrány asociované s TOM, translokasou vnější membrány; TIM, translokasa vnitřní membrány; OM, vnější membrána; IMS, mezimembránový prostor; IM, vnitřní membrána; MPP, mitochondriální procesující peptidasa; MIP, mitochondriální „intermediate“ peptidasa; IMP, vnitřní membránová peptidasa; +++, kladně nabitá presekvence preproteinu. (Převzato z Gakh *et al.*, 2002).

### 3.2.1. TOM komplex

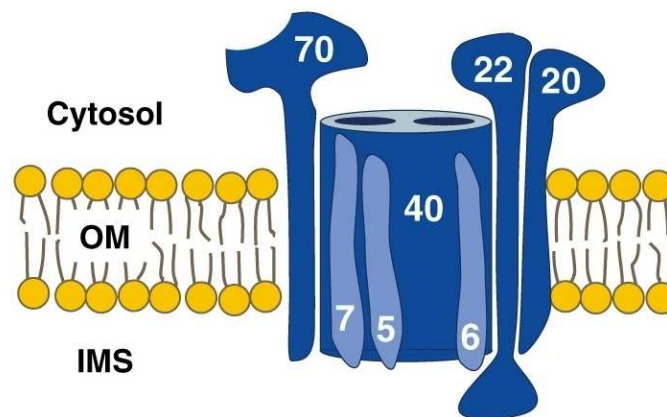
Hlavní funkcí komplexu translokas ve vnější mitochondriální membráně (TOM komplex, 490 – 600 kDa) je rozpoznání, translokace preproteinů přes vnější membránu či inserce proteinů do vnější membrány (Kunkele *et al.*, 1998). TOM komplex se skládá ze sedmi komponent, které se dělí na dvě skupiny (Neupert *et al.*, 2007) – receptory a pórové proteiny tvořící importní kanál (Obr. 3).

Hlavními receptory jsou Tom20 a Tom70. Oba proteiny jsou ukotveny svou N-terminální částí ve vnější membráně a do cytosolu vystavují hydrofobní domény (Abe *et al.*, 2000). Oba receptory se mohou částečně ve své rozpoznávací funkci nahradit, ale každý z nich primárně rozpoznává jiný substrát. Tom70 rozpoznává především hydrofobní preproteiny s interní signální sekvencí (Model *et al.*, 2002), zatímco Tom20 N-terminální presekvence (Abe *et al.*, 2000). Dalším povrchovým receptorem je Tom22, který vystavuje vysoce negativně nabitou N-terminální doménu do cytosolu a krátkou C-terminální doménu do IMS (intermembrane space – mezimembránový prostor). Centrální receptor Tom22 spojuje Tom20 s translokačním kanálem a předpokládá se, že spolupracuje s Tom20 při vazbě na substrát. Tom22 je tedy důležitou komponentou pro udržení celkové integrity TOM komplexu (van Wilpe *et al.*, 1999).

Kanál pro import prekurzorů proteinů je tvořen především centrální komponentou homodimerem Tom40 tvořícím v membráně  $\beta$ -barelovou strukturu a třemi malými

podjednotkami (Obr. 3) asociovanými s Tom40, které celý komplex stabilizují (Neupert *et al.*, 2007). Kanál obsahuje kyselé domény a díky elektrostatickým interakcím mezi nimi a kladně nabitými presekvenčními preproteinů může dojít k translokaci (Dietmeier *et al.*, 1997).

Několik Tom40 dimerů se uskupuje do větších TOM struktur, které vedou k vytvoření dvou nebo tří kanálů podobných komplexů, a k tomu jim pomáhají receptory Tom22 a Tom20 (Model *et al.*, 2002).



**Obr. 3** TOM komplex. Povrchové receptory – Tom70, Tom22, Tom20; Proteiny importního kanálu – Tom40, Tom7, Tom6, Tom5; OM, vnější mitochondriální membrána; IMS, mezimembránový prostor. (Převzato z Neupert *et al.*, 2007).

### 3.2.2. TIM komplex

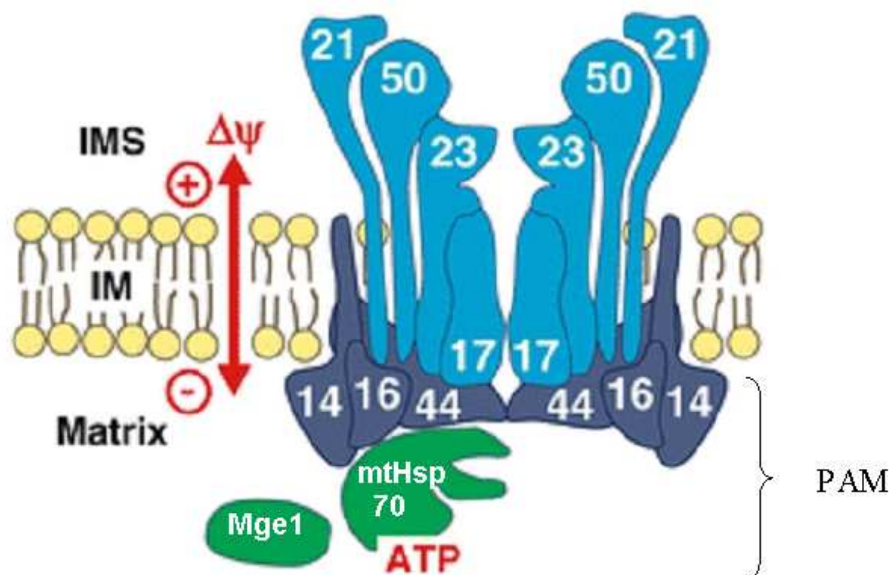
Hlavní translokasou vnitřní membrány je TIM23 (Neupert *et al.*, 2007). Translokace pozitivně nabitých presekvenčí je řízena pomocí elektrického membránového potenciálu (Chacinska *et al.*, 2005) a hydrolýzou ATP (Neupert *et al.*, 2007). Komponenty TIM23 jsou rozděleny na dvě skupiny (Neupert *et al.*, 2007) – na ty, které tvoří membránový kanál, a na importní motory (PAM – the presequence translocase-associated motor), které řídí translokaci celého preproteinu do matrix (Obr. 4).

Mezi komponenty tvořící membránový kanál patří čtyři podjednotky – především Tim23, dále Tim50, Tim17 a Tim21. Tim23 vystavuje svou N-terminální hydrofilní doménu směrem k vnější membráně a svou střední doménu do IMS a napomáhá přiblížení TOM a TIM komplexů (Donzeau *et al.*, 2000). V poslední době se však prokázala důležitá funkce Tim21, která spočívá v interakci s Tom22, a tím propojení obou komplexů (Mokranjac *et al.*, 2005), a v regulaci asociace PAM s TIM23 komplexem.

Pomocí elektrického membránového potenciálu lze translokovat pouze MTS (Martin *et al.*, 1991). Pro translokaci celého preproteinu je potřeba funkce PAM (Neupert *et al.*, 2007),

který se skládá především z Tim44, mtHsp70 a Mge1 (Obr. 4). Tim44 je hydrofilní matrixový protein spojený s vnitřní membránou a částečně se podílející na tvorbě kanálu. mtHsp70 obsahuje N-terminální ATPasovou doménu a C-terminální doménu vážící substrát (D'Silva *et al.*, 2004). K výměně ADP/ATP na mtHsp70 slouží Mge1 faktor (Neupert *et al.*, 2007). Aktivní translokace preproteinu je uskutečněna pomocí mtHsp70, který zabraňuje posun preproteinu zpátky a aktivně ho suně z vnitřní membrány. Do bezprostřední blízkosti substrátu se mtHsp70 dostane pomocí Tim44 (Horst *et al.*, 1997).

Poté, co se preprotein dostane do matrix, je jeho presekvence odštěpena pomocí MPP. Protein je poté schopen zaujmout svou nativní konformaci buď v matrix mitochondrie, membránách, nebo jiných mitochondriálních subkompartmentech (Neupert *et al.*, 2007).



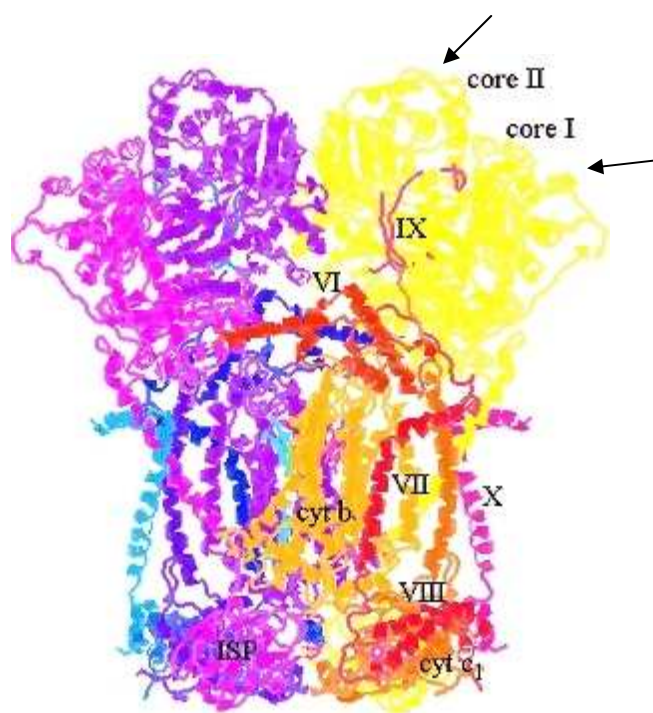
**Obr. 4** TIM23 komplex. Membránová část – Tim50, Tim23, Tim21, Tim17; Importní motory – Tim44, Tim16/Pam16, Tim14/Pam18, mtHsp70, Mge1; IMS, mezimembránový prostor; IM, vnitřní membrána;  $\Delta\psi$ , elektrický membránový potenciál. (Převzato z Neupert *et al.*, 2007).

## 4. Mitochondriální procesující peptidasa a její redukované formy

### 4.1. MPP

#### 4.1.1. Původ MPP

Mitochondriální procesující peptidasa se vyvinula z preexistující bakteriální proteasy a stala se součástí cytochrom  $bc_1$  komplexu (Gakh *et al.*, 2002) dýchacího řetězce (core I a II proteiny; Obr. 5). Pro vznik maturovaného  $bc_1$  komplexu je nutná funkce Core I a II proteinů, které odštěpují podjednotku IX z Rieske Fe-S proteinu (Nagao *et al.*, 2000). Z této konkrétní proteasové funkce se později vyvinula univerzální funkce MPP rozlišující velké množství substrátů.



**Obr. 5** Struktura kuřecího  $bc_1$  komplexu dýchacího řetězce. Tento komplex je třetím komplexem v elektron-transportním řetězci. cyt c1, cytochrom  $c_1$  a cyt b, cytochrom b slouží k přenosu dvou elektronů z ubichinolu na cytochrom c. Zároveň dochází k transportu protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Core I a II proteiny, které jsou součástí tohoto komplexu mají dvojitou funkci, spolupodílejí se na tvorbě komplexu a odštěpují podjednotku IX z Rieske Fe-S proteinu. (Převzato z [http://www.life.illinois.edu/crofts/bc-complex\\_site/](http://www.life.illinois.edu/crofts/bc-complex_site/)).

Stav, kdy podjednotky MPP a core proteinů jsou totéž, se v současnosti vyskytuje u fotosyntetizujících rostlin (Gakh *et al.*, 2002) – core II protein  $bc_1$  komplexu je analogem  $\alpha$ -MPP a core I protein je analogem  $\beta$ -MPP. Core proteiny u rostlin vykonávají dvě funkce (Braun *et al.*,



1992). Jednak stabilizují komplex a jednak odštěpují presekvence preproteinů, které jsou transportovány z cytosolu do matrix mitochondrie.

Ve většině organismů, např. u *Saccharomyces cerevisiae* nebo savců, se později dvě podjednotky enzymu, nejspíše duplikací genů, od  $bc_1$  komplexu oddělily, a tím se oddělila regulace respirace a proteolytické úpravy proteinů (Gakh *et al.*, 2002).

Přechodový stav se vyskytuje např. u organismu *Neurospora crassa*, kde je jedna podjednotka MPP zakotvena ve vnitřní membráně mitochondrie, a tudíž má i funkci core proteinu, a druhá se vyskytuje v matrix (Hawlitschek *et al.*, 1988).

Kvasinkový a savčí core II protein postrádá pro  $\alpha$ -MPP charakteristickou GRL (Gakh *et al.*, 2001), avšak core II protein např. z brambory, který zároveň funguje jako  $\alpha$ -MPP, tuto konzervovanou smyčku obsahuje. Tento fakt naznačuje, že GRL hraje důležitou roli v univerzální funkci MPP a vyskytuje se právě u organismů, u kterých došlo k oddělení funkce maturující proteiny od funkce dýchacího řetězce.

#### 4.1.2. Charakterizace MPP

MPP (~ 100 kDa) je složena ze dvou podobných, ale funkčně odlišných podjednotek,  $\alpha$ -MPP a  $\beta$ -MPP (Obr. 6), vyskytujících se převážně v matrix mitochondrie. Celková sekvenční podobnost mezi podjednotkami je 20 - 30 % (Schulte *et al.*, 1989). Každá podjednotka kvasinkové MPP se skládá ze dvou topologicky velmi podobných domén (každá složena z ~ 210 zbytků), které jsou spojeny linkerem složeným ze 16 zbytků u  $\alpha$ -MPP a 22 zbytků u  $\beta$ -MPP (Taylor *et al.*, 2001). MPP je aktivní pouze v dimeru, samostatné podjednotky jsou nefunkční (Yang *et al.*, 1988).

MPP je stimulována přítomností dvojjazvných kovů, především  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  a  $Zn^{2+}$  (Luciano *et al.*, 1998), proto patří mezi metaloendopeptidasy (Luciano *et al.*, 1998). Optimální pH pro aktivitu MPP je mezi 7 – 8 (McAda *et al.*, 1982).

3-D struktura kvasinkové MPP byla stanovena pomocí rentgenové strukturní analýzy a poskytla základ pro model rozpoznání MTS substrátu (Taylor *et al.*, 2001).

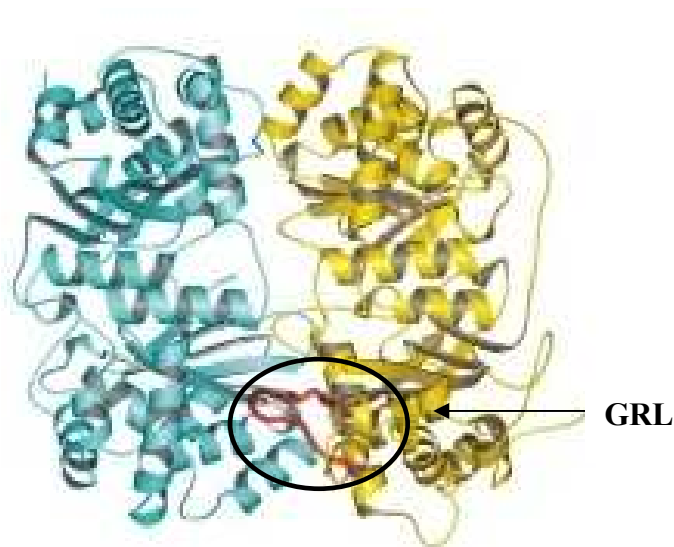
##### 4.1.2.1. $\alpha$ -MPP

Pro tuto podjednotku MPP byly v minulosti používány různé názvy – MPP-1, MAS2, MIF2, P-55 a podjednotka III cytochrom *c* reduktasy (Kalousek *et al.*, 1993). Nomenklatura se poté sjednotila a větší podjednotka enzymu se už jednotně nazývá  $\alpha$ -MPP.

Na  $\alpha$ -MPP se vyskytuje degenerovaná N-koncová katalytická oblast, která potvrzuje evoluční původ z více konzervované  $\beta$ -MPP (Gakh *et al.*, 2001). Předpokládá se, že  $\alpha$ -MPP vznikla duplikací genu, ztratila katalytickou funkci, a převzala funkci regulační.

Důležitou součástí podjednotky je flexibilní mezidruhově konzervovaná GRL, jejíž funkce je nejspíše v předání presekvence do aktivního místa a v uvolnění štěpeného proteinu z enzymu (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010, Ito, 1999).

Další důležitou oblastí je konec C-koncové domény, který je sice vysoce variabilní, ale funkce této oblasti se předpokládá v mechanické podpoře C-koncové domény během jejích konformačních změn po vazbě substrátu (Janata *et al.*, 2004). Je také důležitý při vazbě substrátu a jeho proteolytické úpravě (Shimokata *et al.*, 1998).



**Obr. 6** Krystalová struktura kvasinkového MPP dimeru. Modře je označena  $\beta$  podjednotka, žlutě je označena  $\alpha$  podjednotka, červeně GRL. (Převzato z Taylor *et al.*, 2001).

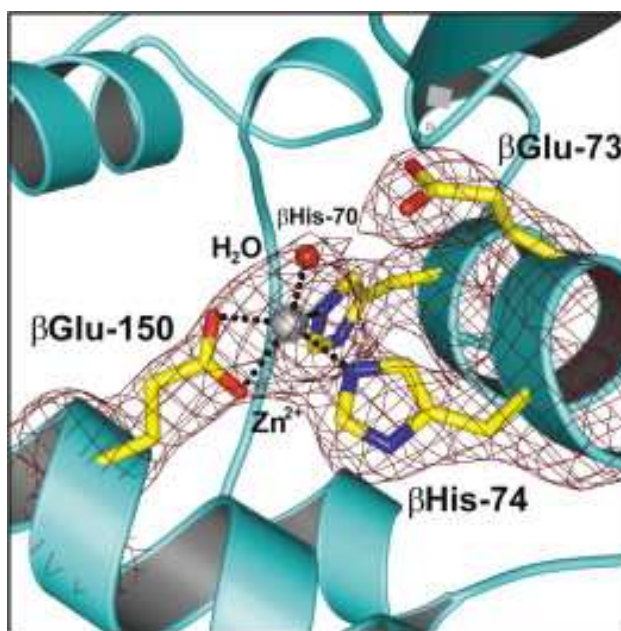
#### 4.1.2.2. $\beta$ -MPP

Pro menší podjednotku enzymu MPP byly v minulosti také používány různé názvy – PEP, MAS1, MIF1, P-52 a podjednotky I a II cytochrom *c* reduktasy (Kalousek *et al.*, 1993).

N-koncová doména  $\beta$ -MPP obsahuje dva vysoce konzervované úseky. První z nich je tvoří amfifilní  $\alpha$ -šroubovici s negativně nabitými zbytky na jedné straně. Předpokládá se, že tato doména interaguje s kladně nabitou amfifilní  $\alpha$ -šroubovicí presekvence preproteinu (Kleiber *et al.*, 1990).

Další oblast, která je velmi konzervovaná a přítomná u všech  $\beta$ -MPP, je od první oblasti vzdálena 70 aminokyselinových zbytků směrem k N-konci (Gakh *et al.*, 2002) a její součástí je

zinek-vázající motiv (H-x-x-E-H-x<sub>76</sub>-E). Tento motiv je typický pro zinkové proteasy, které patří do pitrilysinové rodiny, např. pitrilysin *Escherichia coli* nebo enzym degradující insulin (Rawlings *et al.*, 1995), a je důležitý pro katalytickou aktivitu MPP. Umístění Zn<sup>2+</sup> iontů je koordinováno dvěma histidinovými zbytky a distální glutamovou kyselinou (Obr.7). Proximální glutamová kyselina umožňuje molekule vody obsadit čtvrté místo na Zn<sup>2+</sup> iontu (Taylor *et al.*, 2001).



**Obr. 7** Vazebné místo pro zinek vyskytující se v  $\beta$  podjednotce MPP *S.cerevisiae*.  $\beta$ His-70 (histidin v pozici 70 na  $\beta$ -MPP),  $\beta$ His-74 (histidin v pozici 74 na  $\beta$ -MPP) spolu s distální  $\beta$ Glu-150 (kyselina glutamová v pozici 150 na  $\beta$ -MPP) koordinují umístění Zn<sup>2+</sup> iontu. Proximální  $\beta$ Glu-73 (kyselina glutamová v pozici 73 na  $\beta$ -MPP) se váže vodíkovým můstkem na molekulu H<sub>2</sub>O, polarizuje ji a umožňuje vazbu H<sub>2</sub>O na Zn<sup>2+</sup> iont. (Převzato z Taylor *et al.*, 2001).

#### 4.2. HPP

Šmíd a spol. se odklání od tvrzení, že se hydrogenosomální procesující peptidasa (HPP – hydrogenosomal processing peptidase) skládá ze dvou homologních  $\beta$ -podjednotek (Brown *et al.*, 2007), ale prokázali, že HPP je složena z  $\alpha$  i  $\beta$  podjednotky (Smid *et al.*, 2008).

Presekvence směřující do hydrogenosomů jsou kratší (4 - 21 aminokyselinových zbytků) ve srovnání s presekvenkami dlouhými 20 - 80 aminokyselinových zbytků, které rozeznává MPP (Smid *et al.*, 2008), a většinou postrádají kladně nabitě zbytky (viz kap. 5). HPP tedy představuje vývojový mezistupeň mezi MPP a GPP (kap. 4.3.), což dokazuje i schopnost štěpit kratší mitochondriální presekvence (Smid *et al.*, 2008).

Primární struktura  $\beta$ -HPP je s  $\beta$ -MPP *S. cerevisiae* identická z 24% (Brown et al., 2007). Katalytická podjednotka také obsahuje konzervovaný zinek-vázací motiv (Gakh et al., 2002). Protože je  $\alpha$  podjednotka méně homologní s  $\alpha$ -MPP, dříve se nepředpokládala její regulační funkce. Přesto se v této podjednotce nachází oblast bohatá na glycinové zbytky (Brown et al., 2007), která je podobná GRL v  $\alpha$ -MPP, avšak je redukována. Naskytá se otázka, zda je nějaká evoluční souvislost s kratší délkou rozeznávaných presekvenčí a kratší oblastí bohatou na glycin ve srovnání s  $\alpha$ -MPP.

### 4.3. GPP

Primární struktura mitosomální procesující peptidasy z *Giardia* (GPP – *Giardia* mitosomal processing peptidase) se od  $\beta$ -MPP *S. cerevisiae* značně liší (identita pouze 13.1%). Na rozdíl od heterodimeru MPP, kdy jsou pro aktivitu enzymu nutné obě podjednotky (Luciano et al., 1997), je GPP obsahující pouze jednu  $\beta$ -MPP podobnou katalytickou podjednotku schopna samostatně štěpit presekvenče, které se do mitosomu dostaly. Substráty, které  $\beta$ -GPP rozeznává, svým proximálním argininem interagují přímo s negativně nabitou oblastí katalytického místa enzymu (Smid et al., 2008). Zbytek aktivního místa  $\beta$ -GPP je na rozdíl od  $\beta$ -MPP kladně nabitý.

Unikátní monomerní struktura GPP je důsledkem reduktivní evoluce z heterodimerní MPP (Smid et al., 2008).

## 5. Charakteristické prvky presekvenčí prekurzorů proteinů

Primární sekvence presekvenčí bývá velmi různorodá, dokonce i u příbuzných ortologů. Odštěpitelné presekvenče typicky obsahují kladně nabitě aminokyselinové zbytky na N-konci (Obr. 2), které mohou být následovány intramitochondriální třídící sekvencí (Gakh *et al.*, 2002, von Heijne *et al.*, 1989). Negativně nabitě zbytky se vyskytují jen zřídka (Nagao *et al.*, 2000).

Dalším charakteristickým znakem presekvenčí u všech eukaryot je přítomnost proximálního argininového zbytku v pozici -2 (popř. -3) od místa štěpení (Kitada *et al.*, 2003). Byly identifikovány čtyři štěpené motivy (Gavel *et al.*, 1990):

R-2 motiv     xRx↓x(S/x)

R-3 motiv     xRx(Y/x)↓(S/A/x)x

R-10 motiv    xRx↓(F/L/I)xx(S/T/G)xxxx↓ – Tento tzv. oktapeptidový signál obsahuje argininové zbytky v pozici -2 od MPP štěpeného místa a v pozici -10 od MIP štěpeného místa. Typický pro tento motiv je také fenylalanin nebo jiný hydrofobní zbytek v pozici -8 (Branda *et al.*, 1995).

R-žádný motiv     xx↓x(S/x)

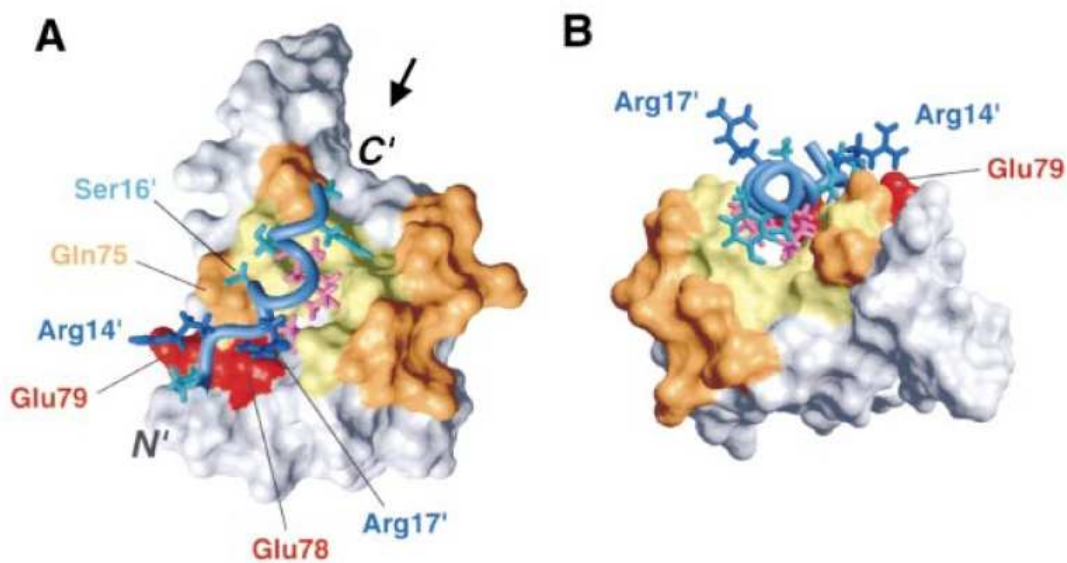
Pro efektivní štěpení jsou také důležité (avšak ne nutné) vzdálené bazické aminokyseliny (distální arginin) kolem pozice -10 (Niidome *et al.*, 1994), fenylalanin nebo jiný hydrofobní a to především aromatický aminokyselinový zbytek v pozici +1 od štěpeného místa a serin v pozici +2 a threonin v pozici +3 (Song *et al.*, 1998).

Přesto je primární struktura presekvenčí velmi odlišná a tento fakt způsobuje obtíže při snaze predikovat štěpená místa prekurzorů proteinů. Pomocí místně specifických mutagenéz bylo dokázáno, že arginin v pozici -2 popř. -3 hraje důležitou avšak ne nutně nepostradatelnou úlohu pro štěpení pomocí MPP, avšak je nutný pro rozeznání substrátu (Kojima *et al.*, 2001). Dostupné výsledky tedy vedou k závěru, že pro vazbu presekvenče není ani tak důležitá primární sekvence aminokyselin jako její sekundární struktura uplatňující se při transportu, kterou MPP rozeznává (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010).

Presekvenče jsou schopné zaujmout jak rozvinutou konformaci, která je nutná pro navázání substrátu do aktivní dutiny MPP, tak amfifilní  $\alpha$ -šroubovici (Obr.8) nutnou pro vazbu na Tom20 receptor (Taylor *et al.*, 2001). Nukleární magnetická rezonance (NMR – nuclear magnetic resonance) ukázala, že při transportu tvoří N-koncová oblast presekvenče substrátu COX IV (podjednotka IV kvasinkové mitochondriální cytochromoxidasy)  $\alpha$ -helikální strukturu, zatímco C-koncová oblast nevykazuje pravidelnou sekundární strukturu v prostředí micel (Endo *et al.*, 1989).

Šroubovice je krátká (ne více než tři otáčky) a u dlouhých presekvcí bývá přerušena krátkým linkerem obsahujícím glycinové a/nebo prolinové zbytky mezi proximálním a distálním argininem (Ogishima *et al.*, 1995, Thornton *et al.*, 1993). Oblast flexibilního linkeru je důležitá pro efektivní štěpení (Ogishima *et al.*, 1995) a předpokládá se, že směřuje presekvcí do vazebného místa MPP. Pokud dojde k delecí linkeru mezi helixy, ke štěpení nedojde.

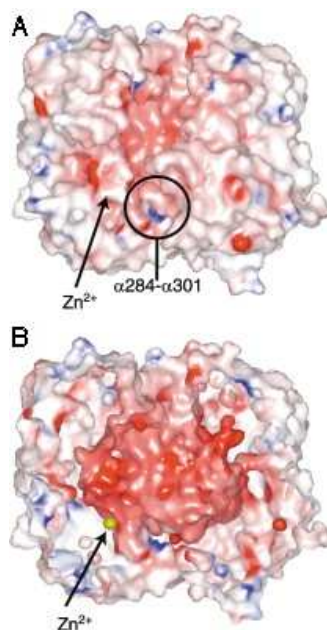
Samotná šroubovice je ale strukturovaná jen částečně. Stabilní helikální struktura neumožňuje vazbu do aktivního místa enzymu (Thornton *et al.*, 1993). Takováto pevná helikální struktura funguje jako kompetitivní inhibitor enzymu.



**Obr. 8** Vazebný žlábek Tom20 receptoru s navázanou presekvcí preproteinu. A – část povrchu molekuly Tom20 receptoru obsahující hydrofobní místa, která se účastní vazby substrátu, jsou zobrazena barevně. Navázaný preprotein tvoří amfifilní  $\alpha$ -šroubovici. Hydrofobní zbytky směřují do žlábků Tom20 a kladně nabitě zbytky (Arg14', Arg17') směrem ven do cytoplazmy. N' a C' je označení pro N-koncovou a C-koncovou část presekvice. B – jiný pohled na stejnou strukturu. (Převzato z Abe *et al.*, 2000)

## 6. Studium interakce MPP-substrát

V otázce primární vazby substrátu se názory různí. Podle Kojima a kol. jsou nutné obě podjednotky, samostatně mají podjednotky třicetkrát menší afinitu k substrátu než v komplexu (Kojima *et al.*, 1998). Na druhou stranu Luciano a kol. uvádějí, že kvasinková  $\alpha$ -MPP váže substrát stejně efektivně jako celý enzym, tudíž je to právě tato podjednotka, která je zodpovědná za primární vazbu substrátu (Gakh *et al.*, 2001, Luciano *et al.*, 1997).

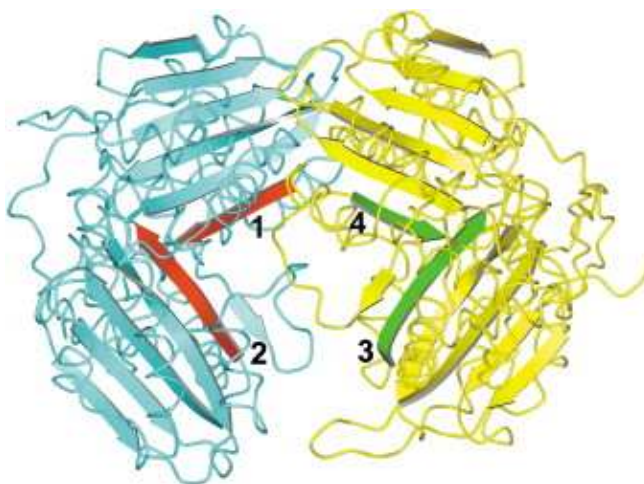


**Obr. 9** Krystalová struktura MPP – centrální dutina. A – pozitivně nabitě zbytky jsou zobrazeny modře a negativně nabitě zbytky červeně. GRL je zakroužkována. B – Pohled do do centrální dutiny MPP s elektrostatickým potenciálem. V dutině se vyskytuje motiv vázající zinek. (Převzato z Taylor *et al.*, 2001).

Dvorakova-Hola a kol. předpokládají, že na stejném principu, na kterém se presekvence váže na Tom20 receptor (Obr.8), váže se i na GRL v  $\alpha$ -MPP (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010). Konformace presekvence však záleží na vlastnostech mikrookolí, protože se do aktivního místa enzymu, které se nachází v centrální části mezi oběma podjednotkami a tvoří negativně nabitou dutinu (Obr. 9) lemovanou hydrofilními aminokyselinami (především glutamátové a aspartátové zbytky), váže v rozvinuté konformaci, jak bylo zjištěno z krystalové struktury syntetických substrátů s mutantní formou MPP (Taylor *et al.*, 2001). Předpokládá se, že je to právě GRL, díky níž se presekvence dostane do blízkosti  $Zn^{2+}$  iontu, který tvoří jádro katalytického místa enzymu. Tato smyčka se vyskytuje při vstupu do dutiny a díky slabé elektronové densitě je velmi flexibilní (Taylor *et al.*, 2001). Pokud je část této smyčky deletována, afinita pro substrát i katalytická aktivita enzymu jsou značně sníženy (Nagao *et al.*, 2000).

Signální sekvence preproteinů obsahuje velké množství kladně nabitých zbytků, a tak dojde ke stabilizaci elektrostatických interakcí v aktivní dutině (Kitada *et al.*, 2001). MPP rozpoznává několik míst na presekenci, ale štěpí ji v konkrétním místě (Oshima *et al.*, 2005).

Část MTS zaujme strukturu krátkého  $\beta$ -listu v oblasti proximálního argininu. Tento  $\beta$ -list tvoří vodíkové můstky se dvěma  $\beta$ -listy  $\beta$ -MPP. Jeden z nich je poblíž katalytického místa a ten druhý v C-doméně  $\beta$ -MPP (Kitada *et al.*, 2003). Tvorba přechodné  $\beta$ -struktury je indukovaná primárním kontaktem presekence s  $\beta$ -MPP. V aktivní dutině se vyskytují celkem čtyři  $\beta$ -listy (Obr. 10), které umožňují vazbu substrátu pomocí vodíkových můstků. Krátké presekence interagují pouze s prvními dvěma  $\beta$ -listy (Taylor *et al.*, 2001). Druhé dva  $\beta$ -listy vyskytující se na  $\alpha$ -MPP slouží pro vazbu delších presekencí, tj. více než cca 20 zbytků (Kojima *et al.*, 1998).

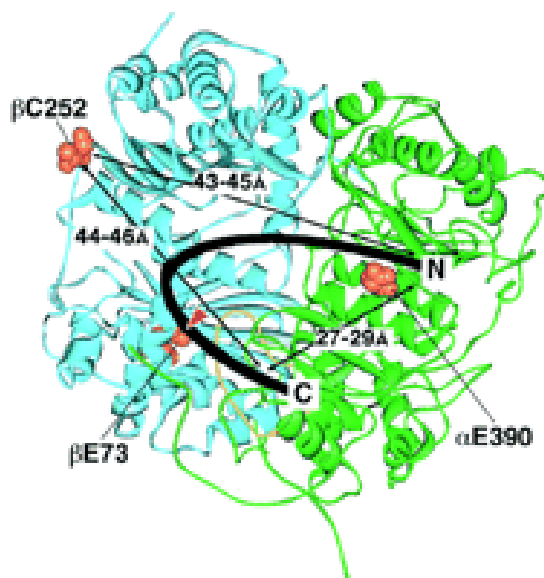


**Obr. 10** Předpokládané uspořádání vazebné konstrukce pro substrát v aktivní dutině tvořené čtyřmi  $\beta$ -listy. Červeně znázorněné listy 1 a 2 jsou na modré  $\beta$ -MPP a zeleně znázorněné listy 3 a 4 jsou na žluté  $\alpha$ -MPP. (Převzato z Taylor *et al.*, 2001).

Pomocí měření FRET (fluorescence resonance energy transfer – přenos energie fluorescenční resonancí) byla získána strukturální informace o vazbě substrátu na MPP (Obr. 11). Zjistilo se, že distální arginin vyskytující se v pozici -7 až -17 a část okolo štěpeného místa (proximální arginin) jsou lokalizovány ve specifických místech na MPP bez ohledu na pozici distálního argininu. Pokud je presekence delší, utvoří se struktura smyčky (Kojima *et al.*, 2001). Zatímco distální basický zbytek nemusí být nutně Arg, je-li proximální Arg nahrazen jiným basickým zbytkem, štěpení neproběhne. Pomocí svých kyselých zbytků na C-koncové doméně podjednotky (Shimokata *et al.*, 1998) rozeznává  $\alpha$ -MPP spíše vzdálenější aminokyselinové zbytky presekencí od štěpeného místa (Kojima *et al.*, 1998).



Během inserce rozvolněné presekvence do vazebné konstrukce MPP nejspíše snímá její povrch a určí štěpené místo (Kitada *et al.*, 2003). Je otázkou, jak je tento krok regulován. Botweva a kol. předpokládají vazbu ATP a ADP na podjednotky MPP *Neurospory* (Botweva *et al.*, 1996), avšak ATP není pro aktivitu MPP *S.cerevisiae* nutné.



**Obr. 11** Předpokládaná konformace substrátu navázaného na MPP. Modře je znázorněna  $\beta$ -MPP a zeleně  $\alpha$ -MPP. Tučná linka znázorňuje předpokládanou konformaci substrátu navázaného na MPP. N a C znázorňují amino- a karboxy- konec presekvence. Červenou šipkou je označeno štěpené místo substrátu. GRL je znázorněna žlutě. (Převzato z Kojima *et al.*, 2001).

### 6.1. Studium rozpoznání substrátů $\alpha$ podjednotkou MPP alternativními přístupy

V poslední době se GRL v  $\alpha$ -MPP přikládá důležitá role ohledně primárního kontaktu enzymu se substrátem. Používají se různé metody, díky kterým je snaha toto tvrzení prokázat.

Experimenty byly prováděny na samostatné podjednotce  $\alpha$ -MPP, která je dostačující pro studování primárního kontaktu enzym-substrát a eliminuje rušivý vliv  $\beta$ -MPP (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010). Přítomnost  $\beta$ -MPP by neumožnila odlišit slabou primární interakci substrátu od silné konečné interakce presekvence ke katalytické  $\beta$ -MPP pomocí elektrostatických interakcí. Výsledky ukázaly, že i při nepřítomnosti katalytické  $\beta$  podjednotky je samotná  $\alpha$  podjednotka schopna rozeznat a navázat substrát, což způsobí změnu pohyblivosti GRL (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010).

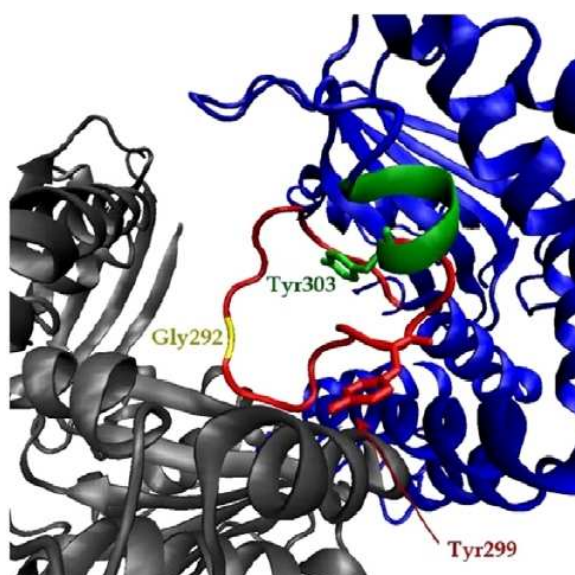
V rozporu s tímto tvrzením Kitada a kol., kteří pracovali se systémem obsahujícím obě podjednotky MPP, předpokládají, že GRL je potřebná pouze pro odštěpení dlouhých presekvenčí (Kitada *et al.*, 2007). Podle jejich výsledků je možné krátké presekvenčí s nižší aktivitou rozpoznat a odštěpit i za situace, kdy je GRL zcela odstraněna.

### 6.1.1. Využití přirozené fluorescence tryptofanu

Pro zjištění lokální dynamiky vysoce konzervované GRL na  $\alpha$  podjednotce kvasinkové MPP byla v/bez přítomnosti substrátu pMDH (prekurzor malátdehydrogenasy) použita měření tryptofanové fluorescence. Pomocí cílené mutagenese byly do GRL a jeho proximálního místa zavedeny reportérové tryptofany (Obr. 12), Y299W nebo Y303W (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010). Tato místa byla vybrána tak, aby minimalizovala vznikající stérické modifikace postranních řetězců.

Nejprve však bylo potřeba pomocí cílené mutagenese změnit tři tryptofany přirozeně se vyskytující na  $\alpha$ -MPP – Trp147, Trp223 a Trp481, aby byla možnost sledovat reportérový tryptofan. Podařilo se zaměnit dva z nich, ale ačkoli Trp223 vyskytující se ve variabilním mezidoménovém linkeru není konzervovaný, záměna Trp223 vedla k produkci nefunkčního nerozpustného proteinu (Janata *et al.*, 2004). Trp223 tedy zůstal nezměněn. Pro zmenšení vlivu nativního Trp223 byl do vzorku přidán 10% roztok glycerolu, který způsobil, že se Trp223 zanořil hlouběji mezi domény a jeho interference nebyla tak silná (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010)

Zavedení substituce do místa 299 způsobilo pokles aktivity enzymu na 60%, na druhou stranu mutace v místě 303, které se nevyskytuje přímo v GRL, ale v přilehlém  $\alpha$ -helixu, neovlivnila enzymatickou aktivitu MPP. Při kombinaci mutace Y303W s delecí jednoho glycinového zbytku v pozici 292 ( $\Delta$ G292) nebyla zaznamenána žádná aktivita enzymu, tudíž se potvrdila nepostradatelnost celé GRL i pro štěpení krátkých presekvenčí.

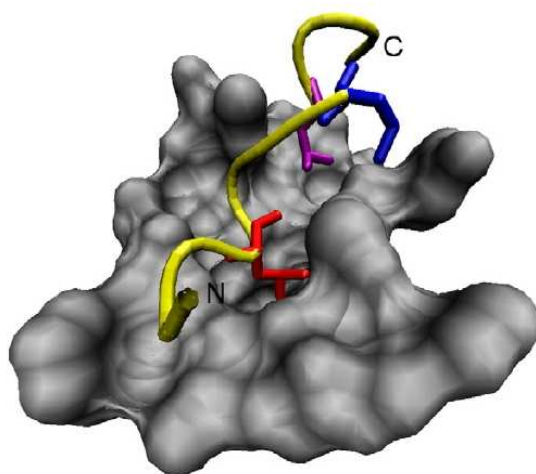


**Obr. 12** GRL  $\alpha$ -MPP (červeně). Tyr299 a Tyr303 byly zaměněny za reportérové zbytky Trp. Gly292 byl deletován v mutantní formě  $\alpha$ -MPP\*-Y303W/ $\Delta$ G292. (Převzato z Dvorakova-Hola *et al.*).

Pro sledování samotné dynamiky, byly použity metody časově rozlišené a ustálené fluorescenční spektroskopie, které ukázaly, že substrát, který se váže na GRL v oblasti, kde se vyskytuje reportérový Trp299, vyvolá změnu pohyblivosti GRL. Dynamika reportérového Trp299 zavedeného přímo do smyčky byla průkazná v přítomnosti substrátu ale i bez substrátu. Po navázání substrátu se GRL stává méně pohyblivou. Pomocí měření bylo dále prokázáno, že krátký  $\alpha$ -helix vyskytující se v blízkosti GRL obsahující zavedený Trp303 je vazbou substrátu ovlivněn jen nepatrně.

### 6.1.2. Simulace molekulární dynamiky

Tato metoda byla použita především proto, aby se potvrdilo, že přítomnost hydrofobních částí v GRL (Obr. 13) a ve žlábků Tom20 napovídá o stejném mechanismu specifického rozpoznávání substrátu (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010). Předpokládá se, že během evoluce vznikly tyto systémy pro protein-protein interakci dvakrát nezávisle na sobě. Tento předpoklad podporuje to, že primární struktury obou systémů jsou značně odlišné, ale způsob rozpoznání je na stejném principu. To je patrné ze srovnání obrázků 8 a 13.



**Obr. 13** Znárodnění prvotního kontaktu presekvence preproteinu na GRL  $\alpha$ -MPP pomocí simulace molekulární dynamiky. Molekulární povrch GRL je znázorněn šedivě (zbytky 284-308  $\alpha$ -MPP). Navázaná presekvence potkaní ALDH (zbytky 12-22) je znázorněna žlutě. Vysoce konzervované hydrofobní zbytky postranního řetězce presekvence jsou znázorněny červeně pro Leu15 a fialově pro Leu19. Nekonzervovaný hydrofobní zbytek postranního řetězce Leu18 je znázorněn modře. (Převzato z Dvorakova-Hola *et al.*).

Pro vytvoření simulace molekulární dynamiky interakce GRL-substrát bylo nutné mít k dispozici model. Struktura substrátu potkaního pALDH (prekurzor aldehyddehydrogenasy) byla již dříve stanovena pomocí NMR v komplexu s receptorem Tom20 (Abe *et al.*, 2000). Počáteční umístění a orientace substrátu na GRL bylo založeno na analogii vazby pALDH s

Tom20 receptorem, kde se v jeho žlábků nachází hydrofobní zbytky, na které se vážou tři hydrofobní zbytky presekvence (Leu15, Leu18 a Leu19).

Pro simulaci byly vybrány dva modely – MPP bez substrátu a MPP s potkaním pALDH. Během simulace molekulární dynamiky zůstaly trajektorie vazeb  $\alpha$ -MPP-substrát stále a nedošlo k disociaci proteinu, což potvrdilo způsob interakce substrátu ke GRL pomocí leucinů. Dva vysoce konzervované hydrofobní zbytky, Leu15 v pozici -4 od štěpeného místa a Leu19 v pozici +1, zůstaly v úzkém kontaktu s GRL po celou dobu simulace. Zdá se, že hydrofobní zbytky v těchto pozicích hrají stabilizační roli. Nekonzervovaný Leu18 v pozici -1 fluktoval a v počáteční fázi simulace nebyl dokonce v kontaktu s GRL (Dvorakova-Hola *et al.*, 2010).

## Závěr

Pomocí biochemických, molekulárně-genetických a fyzikálních metod se částečně podařilo vysvětlit, jakým způsobem MPP rozeznává široké spektrum substrátů. Vzhledem k univerzálnosti a nepostradatelnosti funkce MPP pro eukaryotické buňky se jedná o významné zjištění jak z hlediska samotného mechanismu, tak i pozdější aplikace.

Současná situace naznačuje, že za primární kontakt se substrátem je zodpovědná vysoce konzervovaná část  $\alpha$  podjednotky MPP, glycinová smyčka (GRL).

Měření tryptofanové fluorescence pomohlo částečně objasnit chování GRL po vazbě substrátu. Bohužel fakt, že se zatím pomocí cílené mutagenese nepodařilo odstranit třetí přirozeně se vyskytující tryptofan v  $\alpha$  podjednotce MPP v pozici 223, neumožňuje získat přesné výsledky měření, protože dochází k interferenci Trp223. Prvním dílčím úkolem mé diplomové práce je pokusit se odstranit Trp223, což by znamenalo získat experimentální systém s daleko vyšší kvalitou výpovědi.

Velmi zajímavou a stále ještě neobjasněnou oblastí výzkumu zůstává otázka mechanismu translokace substrátu z GRL v  $\alpha$ -MPP do katalytického místa enzymu na  $\beta$ -MPP. Předpokládá se, že v této fázi dojde k rozvolnění nestabilní helikální struktury presekvence a k zanoření presekvence hlouběji dovnitř dutiny enzymu. Na základě dosavadních poznatků se předpokládá, že významnou strukturou pro tento krok je GRL díky své flexibilitě a umístěním před vstupem do dutiny enzymu. Předpokládá se, že mechanismus vstupu do aktivní dutiny je odlišný pro prekurzory s kratší a delší presekvencí.

Vyvstává otázka terapeutického využití znalostí principu rozpoznávání substrátu. Na jednu stranu je možné vpravit do mitochondrie syntetické proteiny prodloužené o presekvenci, kterou bude MPP rozeznávat, a tím pomoci při léčbě mitochondriálních nemocí.

Na druhou stranu znalost vlastností presekvencí může umožnit zabránění dokončení úpravy proteinů, např. odstraněním flexibilního linkeru vyskytujícího se mezi krátkými helixy presekvence nebo obohacením presekvence basickými aminokyselinami, což způsobí jejich stabilní navázání na enzym, a mohou tak plnit funkci kompetitivního inhibitoru enzymu.

Znalost evolučních souvislostí procesujících peptidas mitochondriálního typu např. umožní výběr správného postupu v boji proti lidským parazitům *Trimononas vaginalis* nebo *Giardia intestinalis* obsahující esenciální organely, hydrogenosom nebo mitosom. Vzhledem k tomu, že je systém maturující proteiny u těchto organismů zredukován, je zajímavé hledat souvislosti s jejich transportním systémem, který je také evolučním tlakem přizpůsoben menšímu množství substrátů.

## Seznam použité literatury

- Abe, Y., et al., *Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20*. Cell, 2000. **100**(5): p. 551-60.
- Botweva, R., B. Fillippi, and B. Salvato, *Evidences for adenine nucleotide binding in the subunits of Neurospora mitochondrial processing peptidase*. Arch Biochem Biophys, 1996. **332**(2): p. 329-34.
- Boxma, B., et al., *An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 74-9.
- 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.
- Branda, S.S. and G. Isaya, *Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27366-73.
- 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.
- Brown, M.T., et al., *A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry*. Mol Microbiol, 2007. **64**(5): p. 1154-63.
- D'Silva, P., et al., *Regulated interactions of mtHsp70 with Tim44 at the translocon in the mitochondrial inner membrane*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1084-91.
- Dietmeier, K., et al., *Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 195-200.
- 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.
- Donzeau, M., et al., *Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes*. Cell, 2000. **101**(4): p. 401-12.
- Dvorakova-Hola, K., et al., *Glycine-rich loop of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is responsible for substrate recognition by a mechanism analogous to mitochondrial receptor Tom20*. J Mol Biol, 2010. **396**(5): p. 1197-210.
- Dyall, S.D. and P.J. Johnson, *Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(4): p. 404-11.
- Dyall, S.D., M.T. Brown, and P.J. Johnson, *Ancient invasions: from endosymbionts to organelles*. Science, 2004. **304**(5668): p. 253-7.
- Embley, T.M. and W. Martin, *Eukaryotic evolution, changes and challenges*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 623-30.
- Endo, T., et al., *N-terminal half of a mitochondrial presequence peptide takes a helical conformation when bound to dodecylphosphocholine micelles: a proton nuclear magnetic resonance study*. J Biochem, 1989. **106**(3): p. 396-400.
- Gakh, O., et al., *Substrate binding changes conformation of the alpha-, but not the beta-subunit of mitochondrial processing peptidase*. Arch Biochem Biophys, 2001. **385**(2): p. 392-6.
- Gakh, O., P. Cavadini, and G. Isaya, *Mitochondrial processing peptidases*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 63-77.
- Gavel, Y. and G. von Heijne, *Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides*. Protein Eng, 1990. **4**(1): p. 33-7.

- Hawlitsek, G., et al., *Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein*. Cell, 1988. **53**(5): p. 795-806.
- Horst, M., et al., *What is the driving force for protein import into mitochondria?* Biochim Biophys Acta, 1997. **1318**(1-2): p. 71-8.
- Chacinska, A., et al., *Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17*. Cell, 2005. **120**(6): p. 817-29.
- Ito, A., *Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(3): p. 611-6.
- Iwahashi, J., et al., *Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18467-72.
- 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.
- Kalousek, F., et al., *Uniform nomenclature for the mitochondrial peptidases cleaving precursors of mitochondrial proteins*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(7): p. 249.
- Kitada, S. and A. Ito, *Electrostatic recognition of matrix targeting signal by mitochondrial processing peptidase*. J Biochem, 2001. **129**(1): p. 155-61.
- Kitada, S., et al., *Determination of the cleavage site of the presequence by mitochondrial processing peptidase on the substrate binding scaffold and the multiple subsites inside a molecular cavity*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1879-85.
- Kitada, S., et al., *A protein from a parasitic microorganism, Rickettsia prowazekii, can cleave the signal sequences of proteins targeting mitochondria*. J Bacteriol, 2007. **189**(3): p. 844-50.
- 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.
- Kojima, K., et al., *Cooperative formation of a substrate binding pocket by alpha- and beta-subunits of mitochondrial processing peptidase*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32542-6.
- Kojima, K., et al., *A proposed common structure of substrates bound to mitochondrial processing peptidase*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 2115-21.
- Kunkele, K.P., et al., *The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1009-19.
- Luciano, P. and V. Geli, *The mitochondrial processing peptidase: function and specificity*. Experientia, 1996. **52**(12): p. 1077-82.
- Luciano, P., et al., *Functional cooperation of the mitochondrial processing peptidase subunits*. J Mol Biol, 1997. **272**(2): p. 213-25.
- Luciano, P., et al., *The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase*. J Mol Biol, 1998. **280**(2): p. 193-9.
- 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.
- McAda, P.C. and M.G. Douglas, *A neutral metallo endoprotease involved in the processing of an FI-ATPase subunit precursor in mitochondria*. J Biol Chem, 1982. **257**(6): p. 3177-82.

- Mihara, K. and T. Omura, *Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70*. Trends Cell Biol, 1996. **6**(3): p. 104-8.
- Model, K., et al., *Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex*. J Mol Biol, 2002. **316**(3): p. 657-66.
- Mokranjac, D., et al., *Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23437-40.
- Muller, M., *Evolutionary origins of trichomonad hydrogenosomes*. Parasitol Today, 1997. **13**(5): p. 166-7.
- 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.
- Neupert, W. and J.M. Herrmann, *Translocation of proteins into mitochondria*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 723-49.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Evolutionary families of metallopeptidases*. Methods Enzymol, 1995. **248**: p. 183-228.
- Ritz, P. and G. Berrut, *Mitochondrial function, energy expenditure, aging and insulin resistance*. Diabetes Metab, 2005. **31 Spec No 2**: p. 5S67-5S73.
- Roise, D., et al., *Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function*. Embo J, 1988. **7**(3): p. 649-53.
- Shimokata, K., et al., *Role of alpha-subunit of mitochondrial processing peptidase in substrate recognition*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25158-63.
- Schulte, U., et al., *A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetICS and biogenesis*. Nature, 1989. **339**(6220): p. 147-9.
- Smid, O., et al., *Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites trichomonas vaginalis and giardia intestinalis*. PLoS Pathog, 2008. **4**(12): p. e1000243.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Timmis, J.N., et al., *Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(2): p. 123-35.



van Wilpe, S., et al., *Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 485-9.

von Heijne, G., *Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices*. Embo J, 1986. **5**(6): p. 1335-42.

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.

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.