

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Peptidasy rodiny M16B a evoluční souvislosti
mezi nimi**

Bakalářská práce

Vypracovala: Iva Hanušová

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

Školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.

Studijní obor: Biochemie

Praha 2012

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Ing. Jiřího Janaty, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 23. srpna 2012

.....

Iva Hanušová

Mé poděkování je směřováno Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za odborné vedení a za umožnění vypracovat tuto bakalářskou práci v Laboratoři biologie sekundárních metabolitů MBÚ AV.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Kučerovi za odborné vedení, cenné rady a především za trpělivost a ochotu kdykoli poradit. Také děkuji celému kolektivu naší laboratoře za velmi milé a přátelské pracovní prostředí.

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

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

Obsah

1	Úvod	- 7 -
2	Teoretická část	- 8 -
2.1	Vznik a evoluce eukaryotické buňky	- 8 -
2.2	Organely mitochondriálního typu	- 9 -
2.2.1	Mitochondrie	- 9 -
2.2.2	Hydrogenosomy	- 10 -
2.3	Peptidasy rodiny M16B	- 11 -
2.3.1	Mitochondriální „processing“ peptidasa	- 12 -
2.3.1.1	$\alpha\beta$ -heterodimer	- 13 -
2.3.1.2	β -podjednotka	- 14 -
2.3.1.3	α -podjednotka	- 15 -
2.3.1.4	Evoluční souvislosti	- 16 -
2.3.2	Hydrogenosomální „processing“ peptidasa	- 16 -
2.3.3	Bakteriální peptidasy typu MPP	- 17 -
3	Cíle bakalářské práce	- 19 -
4	Experimentální část	- 20 -
4.1	Materiály	- 20 -
4.1.1	Bakteriální kmeny	- 20 -
4.1.2	Vektory	- 20 -
4.1.3	Použité oligonukleotidy	- 20 -
4.1.4	Enzymy	- 21 -
4.1.5	Chemikálie a roztoky	- 21 -
4.1.6	Pufry a roztoky	- 22 -
4.1.7	Kultivační média a agary	- 22 -
4.1.8	Komerční soustavy	- 22 -
4.2	Přístroje	- 23 -
4.3	Metody	- 24 -
4.3.1	Kultivace <i>E. coli</i>	- 24 -
4.3.2	Transformace buněk <i>E. coli</i> teplotním šokem	- 24 -
4.3.3	Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> pomocí komerčních soustav	- 24 -
4.3.4	Agarosová elektroforéza DNA	- 24 -
4.3.5	Izolace plazmidové DNA z agarosového gelu	- 25 -
4.3.6	Restrikce DNA	- 25 -
4.3.7	Řetězová polymerázová reakce	- 25 -
4.3.8	Koloniová PCR	- 26 -
4.3.9	Cílená mutagenese	- 27 -
4.3.9.1	Metoda „In-Fusion“	- 28 -
4.3.9.2	Metoda „Quick Change“	- 29 -
4.3.10	Sekvence DNA	- 32 -
5	Výsledky a diskuze	- 33 -
5.1	Výsledky	- 33 -
5.1.1	Záměna zbytku tryptofanu v pozici 236 v α -HPP	- 33 -
5.1.2	Zavedení zbytku tryptofanu do oblasti smyčky bohaté na glycin	- 39 -
5.2	Diskuse	- 41 -
6	Závěr	- 43 -
7	Seznam literatury	- 44 -
8	Seznam použitých zkratk	- 50 -

Souhrn

V teoretické části tato bakalářská práce pojednává o skupině peptidas rodiny M16B. Detailněji se zabývá strukturou a evolucí mitochondriální a hydrogenosomální „processing” peptidasy a také hypotetickou proteasou z bakterie *Rickettsia prowazekii*.

V praktické části této práce byly prostřednictvím metody cílené mutagenese připraveny konstrukty kódující α -podjednotku hydrogenosomální „processing” peptidasy (α -HPP) se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin a tyrosin. Následně byl do konstruktu α -HPP zaveden nový reportérový zbytek tryptofanu do pozice 256, 260, 267 nebo 271 v oblasti tzv. smyčky bohaté na glycin.

Summary

The theoretical part of this bachelor thesis deals with the group of processing peptidase of the M16B family. The main focus is on the structure and the evolution of mitochondrial and hydrogenosomal processing peptidase and also the hypothetical peptidase from the bacterium *Rickettsia prowazekii*.

In the practical part of this work, the constructs coding the α -subunit of hydrogenosomal processing peptidase (α -HPP) with the substituted tryptophan residue in the position 236 for phenylalanine and tyrosine were prepared using the site-directed mutagenesis. Subsequently, the new reporter tryptophan residue was introduced in α -HPP in positions 256, 260, 267 or 271 in the so-called glycine-rich loop.

1 Úvod

Všechna existující eukaryota obsahují buď klasické mitochondrie, nebo další organely mitochondriálního typu. Pro tuto bakalářskou práci má význam kromě mitochondrie také její redukováná forma – hydrogenosom. Původ těchto organel lze vysledovat až do endosymbiotické události mezi pravděpodobně dvěma prokaryotickými organismy. Během tohoto procesu většina endosymbiotického genomu byla ztracena nebo přenesena do jádra hostitelské buňky.

Jádrem kódované proteiny těchto organel musí být po proteosyntéze nebo během proteosyntézy transportovány specifickým membránovým systémem z cytoplazmy. Většina těchto proteinů obsahuje typické signální sekvence na N-konci k dopravě proteinů přes membránu. Tyto signální sekvence jsou odštěpeny peptidasou, která se rovněž nazývá „processing“ peptidasa. Po odštěpení signálních sekvencí vznikají vlastní nativní proteiny.

Takzvaná mitochondriální „processing“ peptidasa (MPP) je relativně velmi dobře charakterizována a prozkoumána, ale v případě hydrogenosomální „processing“ peptidasy (HPP) tomu tak není. V současné době se v naší laboratoři provádějí pokusy s cílem vyřešit prostorovou strukturu HPP a studie zaměřené na interakci proteinu se substráty.

Studium těchto peptidas a rozklíčování mechanismu jejich funkce by mohlo poskytnout bližší vodítka k objasnění původu MPP a snad by mohlo přispět k objasnění evoluce eukaryotické buňky.

2 Teoretická část

2.1 Vznik a evoluce eukaryotické buňky

Hlavními rozdíly mezi eukaryoty na jedné straně a bakteriemi a archebakteriemi na druhé straně jsou přítomnost jádra a membránových organel. Nejvýznamnějšími z těchto organel jsou mitochondrie, peroxisomy a chloroplasty. Některá eukaryota vlastní místo mitochondrie odlišnou, avšak příbuznou organelu – hydrogenosom^(1, 2).

Vznik mitochondrií a plastidů byl velmi důležitou událostí v celé evoluci. Nalezení podrobností o původu těchto organel může vést k objasnění původu celé eukaryotické buňky. V současnosti je pro původ mitochondrií v eukaryotech obecně přijímána endosymbiotická hypotéza - endosymbiosa mezi pravděpodobně dvěma prokaryotickými organismy: hostitelské buňky nejistého původu a intracelulárního symbionta s charakteristickými rysy α -proteobakterie⁽³⁻⁵⁾. Téměř všichni příslušníci α -proteobakterií žijí ve spojení s eukaryotickou buňkou buď jako symbiont nebo jako parazit rostlin a zvířat. Díky sekvenaci celého genomu *Rickettsia prowazekii* bylo zjištěno, že tato bakterie je podobná mitochondrii více než všechna doposud známá prokaryota⁽⁶⁾.

Je však velice pravděpodobné, že bakteriální předek byl fakultativně aerobní s velmi odlišným genomem od současné mitochondrie a *R. prowazekii*. Postupem času byl tento bakteriální endosymbiont zredukován na velmi závislou organelu, ve které většina původních genů byla buď ztracena, nebo přenesena do jaderného genomu⁽¹⁾. Tuto tendenci lze vysvětlit pomocí děje nazývaného endosymbiotický genový přenos⁽⁷⁾. Tento proces se dá popsat tak, že v průběhu redukce mitochondriálního genomu byly geny přeneseny z endosymbiotického genomu do chromosomu hostitelské buňky. Proteiny kódované jádrem jsou po syntéze v cytosolu přeneseny zpět do organel, kde původně vznikaly.

Velká část genů zajišťující membránový transport a některé regulační dráhy se vyvinula v eukaryotickém jádře až po příchodu bakteriálního předka mitochondrie. Příkladem mitochondriálních proteinů nebakteriálního původu jsou např. ATP/ADP translokasy, které transportují ATP výměnou za ADP přes membránu. Tento typ transportní funkce byl doposud nalezen pouze u rodu *Rickettsia*, *Chlamydiae*, mitochondrií a u chloroplastů⁽⁸⁾. Překvapivě nebyly nalezeny žádné podobnosti mezi transportéry mitochondrie a *Rickettsie*. To znamená, že tento ATP/ADP-transportní systém vznikl dvakrát nezávisle na sobě. Mimoto nejsou žádné důvody očekávat, že by volně žijící předek bakterie exportoval nebo importoval ATP do a nebo ze svého prostředí. Tento fakt

naznačuje, že předek α -proteobakterie nebyl schopen transportu ATP v době, kdy došlo k endosymbiotické události ^(6, 8).

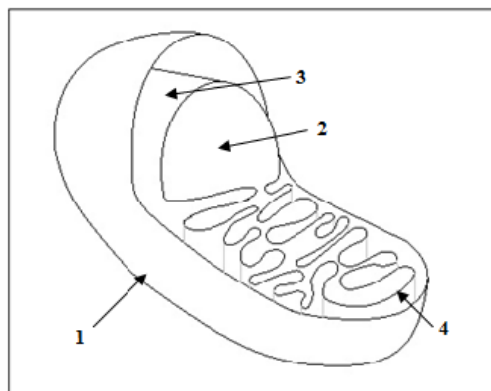
Všechny ATP/ADP-mitochondriální translokasy jsou tedy kódovány prostřednictvím jaderného genomu hostitelské buňky, což znamená, že ačkoli produkce ATP v mitochondriích pochází z α -proteobakteriálního předka, transmembránový transportní systém má pravděpodobně původ v eukaryotickém genomu.

2.2 Organely mitochondriálního typu

Mitochondrie a další organely mitochondriálního typu jsou nezbytnou součástí výbavy eukaryotické buňky. Společnými rysy těchto organel je dvojitá membrána a skutečnost, že většina proteinů kódovaných jádrem se získává specifickým transportem z cytoplasmy. Tato práce se bude věnovat pouze mitochondriím a hydrogenosomům.

2.2.1 Mitochondrie

Klasické mitochondrie jsou dvoumembránové organely a nacházejí se ve všech aerobních eukaryotech. Na povrchu mají hladkou vnější membránu, která je propustná pro polární látky. Na vnější membránu navazuje vnitřní membrána, která je zřasená množstvím vychlípenin, které směřují dovnitř mitochondrie – tzv. mitochondriální kristy (cristae mitochondrialis). Uvnitř se nachází matrix mitochondrií (Obr. 1).



Obr. 1 Struktura mitochondrie. 1 – vnější membrána, 2 – matrix, 3 – vnitřní membrána, 4 – kristy.

V mitochondriích je lokalizována celá řada esenciálních metabolických drah. Probíhá v nich oxidační dekarboxylace pyruvátu, cyklus kyseliny citronové a také β -oxidace mastných kyselin. Hlavní metabolická aktivita mitochondrií je tvorba ATP prostřednictvím oxidační fosforylace. Existují ovšem také eukaryotické mikroorganismy jako např. *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Trypanosoma brucei*, které dokážou žít bez oxidační fosforylace. Tyto organismy ale přesto obsahují mitochondrie.

Mitochondrie totiž také hrají důležitou roli např. v biosyntéze hemu, apoptóze a jsou jediným místem pro biosyntézu center FeS, což jsou nezbytné kofaktory obsažené v mitochondriálních a cytoplazmatických proteinech ⁽⁹⁾. Dalším významným rysem je pozůstatek genetické informace patřící endosymbiotickému předchůdci ⁽¹⁰⁾.

2.2.2 Hydrogenosomy

Část anaerobních eukaryot postrádá mitochondrie a místo nich obsahuje další dvoumembránovou organelu zapojenou v energetickém metabolismu – hydrogenosom ^(11, 12). Hydrogenosomy se účastní metabolismu sacharidů, produkce CO₂, acetátu a molekulárního vodíku. Dále produkují ATP na úrovni substrátové fosforylace ⁽¹¹⁾, který transportují do cytoplasmy využitím ADP/ATP-transportního systému mitochondriálního typu ⁽¹³⁾. V tomto ohledu lze hydrogenosomy považovat za anaerobní ekvivalenty mitochondrií ^(11, 14).

Ačkoli jsou si mitochondrie a hydrogenosomy v mnoha ohledech podobné, výrazně se liší ve struktuře a funkci. Nepřítomnost krist, DNA, F₁F₀ ATPasy, složek dýchacího řetězce a přítomnost enzymů hydrogenasy a pyruvát-ferredoxinoxidoreduktasy odlišuje hydrogenosomy od mitochondrií ^(11, 15). Enzym pyruvát-ferredoxinoxidoreduktasa je obdobný, ale ne zcela totožný s mitochondriální pyruvátdehydrogenasou (dekarboxylační).

Na základě detekce enzymu hydrogenasy vyskytující se v anaerobních bakteriích bylo navrženo, že hydrogenosomy pocházejí z endosymbionta příbuzného striktně aerobní grampozitivní bakterii *Clostridium* ⁽¹¹⁾. Později odhalování podobností mezi mitochondriemi a hydrogenosomy vedlo k návrhu, že hydrogenosom vznikl přeměnou mitochondrie, která ztratila svoji respirační funkci při přechodu do anaerobního prostředí ⁽¹⁶⁾. Studie prokazující přítomnost proteinů mitochondriálního typu v hydrogenosomu, společně s podobnostmi v biogenezi obou organel podporují předchozí hypotézu, a to, že se tyto organely vyvinuly z jednoduchého α -proteobakteriálního endosymbionta ⁽¹⁷⁾.

Proteiny určené do mitochondrií a hydrogenosomů jsou syntetizovány s aminokyselinovou signální sekvencí na N-konci. Tato signální sekvence je odštěpena peptidasou patřící do rodiny M16B.

2.3 Peptidasy rodiny M16B

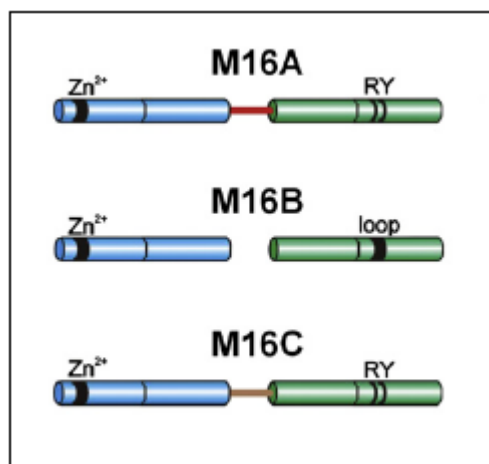
Metalopeptidasy rodiny M16 tvoří unikátní rodinu proteinů, které jsou přítomny ve většině prokaryotických a eukaryotických organismů.

Všechny peptidasy této rodiny mají ve svém aktivním centru motiv vázající zinek (HxxEH) ^(18, 19). Na základě terciárního a kvarterního uspořádání podjednotek je tato rodina rozdělena do 3 podrodin (A, B, C; Obr. 2).

Podrodiny A a C mají podobnou organizaci a aktivitu. Jsou složeny z jednoho polypeptidového řetězce složeného z ~1000 aminokyselinových zbytků. Tento řetězec zahrnuje dvojici domén z ~500 aminokyselinových zbytků propojených dlouhou flexibilní částí. Obě domény (N- a C-terminální) těchto podrodin jsou nepostradatelné pro aktivitu enzymu ^(20, 21). N-terminální doména je charakteristická přítomností motivu vázajícího zinek. C-terminální doména obsahuje pro tuto rodinu typický motiv R/Y, který má regulační funkci. Funkce těchto dvou podrodin spočívá v degradaci různě dlouhých polypeptidů s 30-70 zbytky aminokyselin.

Peptidasy rodiny M16B se skládají ze dvou podjednotek obsahující ~500 aminokyselinových zbytků. Tyto peptidasy většinou tvoří heterodimery (α , β). Pouze β -podjednotka obsahuje místo vázající zinek. α -podjednotka eukaryotických peptidas neobsahuje motiv R/Y a místo tohoto motivu je v této podjednotce obsažena vysoce konzervovaná sekvence obsahující velké množství zbytků glycinu, která tvoří flexibilní smyčku (tzv. glycine-rich loop - GRL). U prokaryotických peptidas je GRL také přítomna, ale je značně zkrácena.

Peptidasy M16B odštěpují signální sekvence na N-konci proteinů transportovaných do mitochondrií a chloroplastů. Z tohoto důvodu se též nazývají signální peptidasy ^(22, 23). Mezi nejvíce prostudovanou peptidasou rodiny M16B patří mitochondriální „processing“ peptidasa.



Obr. 2 Peptidasy rodiny M16. Hlavními rysy jsou motiv vázající zinek, konzervovaný motiv (R/Y) a GRL. Obrázek převzat z ⁽²⁴⁾.

2.3.1 Mitochondriální „processing“ peptidasa

Většina mitochondriálních proteinů je kódována jadernou DNA. Tyto proteiny jsou syntetizovány prostřednictvím cytoplasmatických ribosomů se signální sekvencí na N-konci, která je nezbytná pro transport do mitochondrie ^(25, 26). Tyto proteiny jsou v rozvolněné konformaci a navázané na chaperony a jsou transportovány do mitochondriální matrix přes dvojitou membránu prostřednictvím transportních systémů ⁽²⁷⁻³⁰⁾. Nakonec jsou signální sekvence odštěpeny pomocí metalopeptidasy lokalizované v matrix, tzv. mitochondriální „processing“ peptidasy (MPP) ⁽³¹⁻³³⁾. Toto proteolytické zpracování umožňuje mitochondriálním proteinům získat svou nativní konformaci, což je nezbytné pro životaschopnost eukaryotické buňky, a to ať už se jedná o jednobuněčné ⁽³⁴⁾ či vícebuněčné ⁽³⁵⁾ organismy.

Aktivita MPP byla objevena v roce 1980, kdy bylo zjištěno, že extrakty z mitochondriální matrix štěpí syntetizované signální sekvence odvozené od analogických signálních sekvencí mitochondriálních proteinů ⁽³⁶⁾. MPP byla původně izolována z *Neurospora crassa* ⁽³⁷⁾, *S. cerevisiae* ⁽³⁸⁾, potkaních jater ⁽³⁹⁾, z brambor ⁽⁴⁰⁾, hovězích jater ⁽⁴¹⁾, pšenice ⁽⁴²⁾, špenátu ⁽⁴³⁾, *Platycerium bifluccatum* a *Equisetum arvense* ⁽⁴⁴⁾.

MPP izolované z různých zdrojů projevují optimální aktivitu při pH 7 – 8 a jsou inaktivovány při nižším pH. Aktivita enzymu je inhibována přidáním EDTA nebo *o*-

fenantrolinu a naopak aktivována přidáním dvojmocných iontů – především Co^{2+} , Zn^{2+} a Mn^{2+} (45-48).

MPP je metalopeptidasa, která specificky rozpoznává různé mitochondriální signální sekvence. Tyto signální sekvence se výrazně liší v sekvenci a ve své délce – ve většině případů mají velikost 20 – 50 aminokyselinových zbytků (31, 49, 50). Nicméně signální sekvence mají také společně některé fyzikálně-chemické vlastnosti, a to:

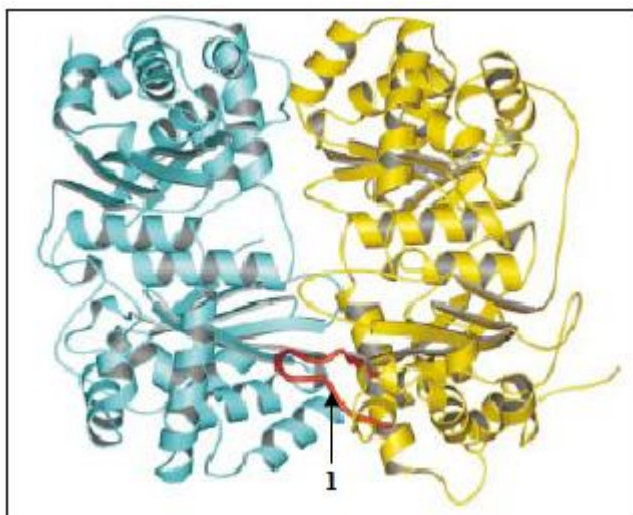
- pozitivní náboj (51)
- potenciál tvořit amfifilní α -helixy (52, 53)
- R-2 motiv - přítomnost argininu v pozici -2 od místa proteolýzy (52, 54)
- přítomnost hydrofobního zbytku okolo pozice +1 od místa proteolýzy (41)

Zatímco α -helikální konformace signální sekvence a její hydrofobní zbytky jsou rozpoznány receptorem transportního systému na vnější mitochondriální membráně, tak pozitivní náboj se uplatňuje až později, během translokace proteinu přes vnitřní mitochondriální membránu (55). R-2 motiv je pak rozpoznán až v aktivním centru MPP a podílí se na určení místa proteolýzy signální sekvence.

2.3.1.1 $\alpha\beta$ -heterodimer

MPP obsahuje 2 neidentické podjednotky (α , β ; Obr. 3), které si jsou strukturně podobné (56, 57). Molekulová hmotnost je v rozmezí 48-57 kDa v závislosti na druhu organismu. Obě podjednotky jsou kódovány v jádře a syntetizovány s aminokyselinovým úsekem, který je odštěpen holoenzymem přítomným v matrix. Katalytické centrum je zachováno pouze v β -podjednotce, nicméně obě podjednotky MPP jsou nezbytné pro její aktivitu.

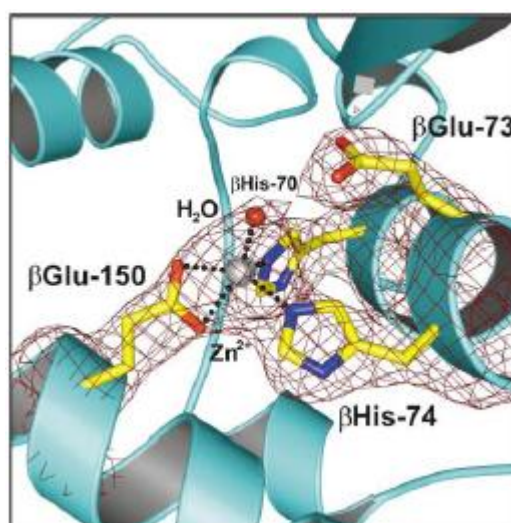
Krystalová struktura kvasinkové MPP ukazuje téměř totožné prostorové uspořádání obou podjednotek (23). Jednotlivé podjednotky obsahují dvě domény s ~210 aminokyselinovými zbytky s podobnou topologií propojené flexibilní částí s ~20 aminokyselinovými zbytky.



Obr. 3 Krystalová struktura mitochondriální „processing“ peptidasy z *S. cerevisiae*. 1 - smyčka bohatá na glycin. Žlutě je označena α -podjednotka a modře β -podjednotka. Obrázek převzat z ⁽²³⁾.

2.3.1.2 β -podjednotka

Katalytické centrum β -podjednotky obsahuje HxxEHx₇₆E místo vázající zinek ⁽¹⁸⁾. Toto místo je lokalizováno v polární dutině uvnitř enzymového dimeru. Zinek je v aktivním místě koordinován dvěma histidylovými zbytky a distální glutamovou kyselinou (Obr. 4). Proximální glutamová kyselina pak slouží jako základna pro molekulu vody, která vytváří čtvrtý ligand koordinující se na ion zinku ⁽²³⁾.



Obr. 4 Struktura místa vázající zinek v MPP. Obrázek převzat z ⁽²³⁾.

2.3.1.3 α -podjednotka

Ve všech známých α -podjednotkách MPP je přítomný vysoce konzervovaný, na glycin bohatý motiv – tzv. smyčka bohatá na glycin (GRL; Obr. 5). Vysoká konzervovanost tohoto místa svědčí o tom, že tato část má pravděpodobně nějakou důležitou funkci.

Ačkoliv role obou podjednotek v počátečním kontaktu se substrátem jsou stále předmětem sporu, většina studií zdůrazňuje důležitost α -podjednotky v navázání a rozpoznání substrátu ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Předpokládá se, že primárním kontaktním místem je právě smyčka bohatá na glycin ⁽⁶¹⁾. Tento flexibilní region je situovaný u vstupu do dutiny dimeru a zároveň je i v blízkosti katalytického centra enzymu. Kromě charakteristických zbytků glycinu jsou zde také přítomny hydrofóbní a aromatické aminokyselinové zbytky.

První studie ukázaly, že GRL je potřebná pouze ke štěpení dlouhých signálních sekvencí ⁽⁶²⁾. Naproti tomu v dalších studiích bylo zjištěno, že bodová mutace v oblasti GRL význačně ovlivňuje aktivitu enzymu. Zejména delece glycinu v pozici 292 zcela zablokovala enzymovou aktivitu stejně jako afinitu k signální sekvenci ⁽⁶³⁾. Z toho vyplývá, že nezbytná funkce α -podjednotky je lokalizována v tomto flexibilním regionu.

V	L	N	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	F	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>H. sapiens</i>	
V	L	N	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	F	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>R. norvegicus</i>	
V	L	N	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	F	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>M. musculus</i>	
V	L	N	I	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	T	K	V	L	N	<i>D. melanogaster</i>	
V	I	Q	M	L	L	G	G	G	S	F	S	T	G	G	P	G	K	G	M	H	S	R	L	Y	A	R	V	L	N	<i>M. alba</i>
V	L	Q	A	L	L	G	G	G	S	F	S	W	G	R	P	G	K	G	L	H	S	R	L	N	-	H	L	V	N	<i>D. glomerata</i>
V	L	Q	M	L	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	L	R	V	L	N	<i>S. tuberosum</i>
V	L	Q	M	L	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	H	S	W	L	Y	L	R	L	L	N	<i>A. thaliana</i>
V	L	Q	M	L	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	H	S	R	L	Y	L	R	I	L	N	<i>O. sativa</i>
T	L	Q	T	L	L	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	T	N	V	L	N	<i>N. crassa</i>
C	L	Q	F	L	L	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>S. pombe</i>
T	L	Q	T	L	L	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	T	H	V	L	N	<i>S. cerevisiae</i>
T	L	Q	V	L	M	G	G	G	A	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	T	N	V	L	N	<i>B. emersonii</i>
V	L	Q	T	I	L	G	G	G	A	F	S	T	G	G	P	G	K	G	M	Y	T	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>T. gondii</i>

Obr. 5 Srovnání sekvencí aminokyselin v oblasti GRL α -MPP z různých organismů. Obrázek převzat z ⁽³¹⁾.

2.3.1.4 Evoluční souvislosti

V autotrofních a heterotrofních organismech je MPP lokalizována v různých částech mitochondrie. Například u kvasinek a savců se MPP nachází jako heterodimer v mitochondriální matrix^(38, 64). V rostlinách plní obě podjednotky MPP dvě funkce zároveň: kromě odštěpování signálních sekvencí plní také funkci proteinů „core I” a „core II” proteinů v komplexu bc_1 , který je situován na vnitřní membráně mitochondrie^(40, 43). Obdobný stav byl objeven také u houby *Blastocladiella emersonii*⁽⁶⁵⁾.

Mikroorganismy *Neurospora* a *Dictyostelium* představují přechodný stav, kdy pouze β -podjednotka MPP plní dvě funkce - funkci proteinu „core I” komplexu bc_1 a funkci katalytické podjednotky MPP. α -MPP je naopak přítomna pouze v matrix^(37, 66, 67).

Byl navržen model, který je schopen vysvětlit tyto poznatky. Časně v evoluci se mitochondriální „processing” peptidasa začala vyvíjet z bakteriální proteasy a stala se součástí komplexu bc_1 ⁽⁴⁰⁾. V současné době je tento stav typický pro rostliny.

U některých organismů, např. u *S. cerevisiae* a u savců, se později, pravděpodobně v důsledku duplikace jednoho nebo dvou genů, obě podjednotky MPP oddělily od komplexu bc_1 . Situace u *N. crassa* představuje jakýsi přechodný stav v tomto procesu.

Původní podjednotky zůstaly nedílnou součástí komplexu bc_1 , a to pravděpodobně proto, že se staly nezbytnými pro jeho funkci a že jsou nutné ze strukturních důvodů.

Bifunkční charakter rostlinného komplexu bc_1 pak představuje situaci, která byla původně společná mitochondriím všech organismů⁽⁶⁸⁾.

2.3.2 Hydrogenosomální „processing” peptidasa

Některé hydrogenosomální proteiny mají N-koncová prodloužení, které připomínají signální sekvence, které řídí proteiny do mitochondrie, a dokonce obsahují rozlišitelné motivy pro štěpení^(69, 70). Přítomnost těchto signálních sekvencí vedla k domněnce, že organely z rodu *Trichomonas* mohou také obsahovat enzymy typu MPP. Stejně jako u mitochondrií jsou tyto signální sekvence odštěpeny „processing” peptidasou za vzniku nativního proteinu.

Hydrogenosomální a mitochondriální signální sekvence mají podobnou primární strukturu, především arginin v pozici -2 a přítomnost zbytků leucinu a serinu^(31, 69). Patrný rozdíl mezi signálními sekvencemi obou peptidas je jejich délka: 5-14 zbytků

u hydrogenosomálních a 9-80 aminokyselinových zbytků u mitochondriálních signálních sekvencí.

Z lidského parazita *Trichomonas vaginalis* byl izolován a charakterizován protein typu MPP – hydrogenosomální „processing” peptidasa (HPP). HPP je plně aktivní jako heterodimer (α,β -HPP). β -HPP je homologní k β -MPP (20,9% identity a 42,9% homologie k β -MPP *S. cerevisiae*) a obsahuje, stejně jako mitochondriální analog, aktivní místo vázající zinek. V α -podjednotce HPP je obsažena oblast bohatá na zbytky glycinu, která je podobná místu obsahujícímu glycinu v α -MPP. Tato oblast má ovšem redukovaný počet zbytků glycinu ⁽⁷¹⁾.

Hydrogenosomální „processing” peptidasa je výsledkem reduktivní, substrátem řízené evoluce MPP ⁽⁷²⁾. Tento děj vyústil v modifikaci GRL v α -HPP, která nese pravděpodobně zodpovědnost za rozpoznávání substrátu. Vlastnosti HPP odrážejí sníženou variabilitu jejich substrátů - prekurzorů proteinů.

2.3.3 Bakteriální peptidasy typu MPP

Enzymy typu MPP jsou také přítomny v bakteriích ⁽⁷³⁾. Předkem MPP byla pravděpodobně monomerní α -proteobakteriální peptidasa podobná „processing” peptidase z mikroorganismu *Rickettsia prowazekii* (RPP) ⁽⁶²⁾. Podobně jako β -MPP, RPP obsahuje motiv vázající zinek.

N- a C-konce RPP jsou navzájem podobné k N-doméně β -MPP a C-doméně α -MPP. Bylo zjištěno, že RPP štěpí různé peptidy, včetně signálních sekvencí mitochondriálních proteinů. Dále bylo zjištěno, že RPP je schopna aktivovat eukaryotickou β -MPP a tento dimer následně odštěpuje signální sekvence ⁽⁶²⁾. RPP tedy nemá pouze strukturální vlastnosti „processing” peptidas, ale také vlastní znaky katalytické β - a regulační α -podjednotky MPP.

S ohledem na evoluci mitochondrií na základě endosymbiotické evoluce se zdá, že RPP je dle strukturálních a funkčních znaků nejbližší k původní peptidase v předchůdci současné mitochondrie. RPP může hrát klíčovou roli v regulaci proteinové exprese prostřednictvím její proteasové aktivity [61]. Ze získaných dat se v souladu s endosymbiotickou teorií předpokládá, že α -MPP a β -MPP pravděpodobně vznikly duplikací genu, a že všechny peptidasy typu MPP jsou společného původu z enzymu z α -proteobakterie.

V poslední době byly popsány další bakteriální peptidasy - nejen další monomerní peptidasa z *Thermus thermophilus* ⁽⁷⁴⁾ a homodimerní peptidasa z *Bacillus halodurans* ^(24, 75), ale také heterodimerní peptidasa ze *Sphingomonas sp.* ⁽⁷⁶⁾. Tyto poznatky mohou poskytnout bližší vodítko k původu MPP.

3 Cíle bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout současný stav problematiky týkající se peptidas rodiny M16B. Experimentální část je zaměřena na přípravu konstruktů kódujícího α -HPP z hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis* se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin a tyrosin. Dalším cílem v experimentální části je zavést nový reportérový zbytek tryptofanu do vybraných pozic v GRL α -HPP. S těmito konstrukty budou následně provedena měření interakce proteinu se substráty fluorescenčními metodami.

Konkrétní cíle:

1. provedení rešerše literatury na dané téma
2. příprava konstruktů kódující α -HPP se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236
3. zavedení reportérového zbytku tryptofanu do různých míst GRL v α -HPP

4 Experimentální část

4.1 Materiály

4.1.1 Bakteriální kmeny

JM109 (Promega)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K m_{K+}) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]

Kmen *E. coli* použit jako recipientní kmen pro transformaci plasmidy.

XL1 - Blue (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]C

Kmen *E. coli* byl použit jako recipientní kmen pro transformaci amplifikované DNA po mutagenezi.

4.1.2 Vektory

pET (Novagen)

Série expresních vektorů, v nichž je exprese vneseného genu pod kontrolou T7 promotoru.

Nesou gen pro rezistenci k antibiotiku (kanamycin, ampicilin).

Odvozený vektor:

PATVB – nese gen pro α -HPP s His-kotvou na C-konci vložen do míst NdeI a XhoI v pET42b(+), nese rezistenci pro kanamycin.

4.1.3 Použité oligonukleotidy

Všechny použité oligonukleotidy byly od firmy Sigma-Aldrich.

Název primeru	Sekvence
ATVF1-W236	5'-AAGGAGATATACATATGGATTGCGT-3'
ATVR1-W236	5'-GCTAAGCGACATGATGGAGAGGGATGA-3'
ATVR2-W236	5'-GGTGGTGGTCTCGAGTGCGGAT-3'
ATVF2-W236Y	5'-ATCATGTGCGCTTAGCTATCCTTCATGTGAGGCAAA-3'
ATVF2-W236F	5'-ATCATGTGCGCTTAGCTTTCCTTCATGTGAGGCAAA-3'
ATV-F256W-FOR	5'-GTTTTATCCAAAATTTGGGGTGGCGGATCCGAATTTTCATCAG-3'

ATV-F256W-REV	5'-CTGATGAAAATTCGGATCCGCCACCCCAAATTTTGGATAAAAAC-3'
ATV-F260W-FOR	5'-CAAAATTTTGGTGGCGGATCCGAATGGTTCATCAGAAGGTC-3'
ATV-F260W-REV	5'-GACCTTCTGATGACCATTCGGATCCGCCACCAAAAATTTG-3'
ATV-F271W-FOR	5'-CAGAAGGTCTTGGATCCGGTGGAGCTCTCTCCTTAC-3'
ATV-F271W-REV	5'-GTAAAGGAGAGAGCTCCAACCGGATCCAAGACCTTCTG-3'
ATV-L267W-FOR	5'-GAATTTTCATCAGAAGGTGGGGATCCGGTTTCAGCTC-3'
ATV-L267W-REV	5'-GACGTGAAACCGGATCCCAACCTTCTGATGAAAATTC-3'
ATV-W236F-FOR	5'-CCATCATGTCGCTTAGCTTTCCTTCATGTGAGG-3'
ATV-W236F-REV	5'-CCATCATGTCGCTTAGCTTTCCTTCATGTGAGG-3'
ATV-W236Y-FOR	5'-CCATCATGTCGCTTAGCTATCCTTCATGTGAGG-3'
ATV-W236Y-REV	5'-CCATCATGTCGCTTAGCTATCCTTCATGTGAGG-3'

Červeně je označen triplet kódující aminokyselinu vyměněnou za tryptofanový zbytek v pozici 236. Modře je označen triplet kódující aminokyselinu tryptofan, který je zaváděn do pozic 256, 260, 267 a 271 vektoru PATVB s mutací W236F. Potržené nukleotidy představují zavedenou unikátní „tichou“ mutaci BamHI (mutace vedoucí k zavedení zbytku tryptofanu do nových pozic) a BlnI (mutace vedoucí k záměně tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin a tyrosin).

4.1.4 Enzymy

- restrikční endonukleasy NdeI, XhoI, BlnI, DpnI, BamHI (New England Biolabs)
- LA polymerasa (Top-Bio), Supreme NZYtaq DNA polymerase (NZYtech); Phusion High Fidelity DNA polymerase (Finnzymes)

4.1.5 Chemikálie a roztoky

Název chemikálie	Zkratka	Výrobce
2'-deoxynukleosid-5'-trifosfátová směs	dNTP	Top-Bio
agarosa		Promega, Serva
ampicilin	amp	Serva
D-glukosa	Glc	Lachema
ethanol	EtOH	Lachema
ethidiumbromid	EtBr	Sigma
Ethylendiamintetraacetát	EDTA	Sigma
hovězí sérový albumin	BSA	Exbio
isopropanol		Lachema

kanamycin	kan	Serva
kvasničný extrakt		Oxoid
trypton		Difco

Další použité chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty.

4.1.6 Pufry a roztoky

Roztoky antibiotik:

kanamycin	-30 mg/ml (1000x)
ampicilin	-100 mg/ml (1000x)

Obecné pufry a roztoky:

1x TAE pufr	- 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,0
10x DNA vzorkový	- 40% sacharosa, 0,25% BPB, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8
Restrikční pufr	- pufry pro restriktazy (New England Biolabs)
Pufr pro PCR	- 10 x „LA complete PCR pufr” (Top-Bio), 10 x reakční pufr pro Supreme NZYtaq (NZYtech), 5 x Phusion HF pufr (Finnzymes)

4.1.7 Kultivační média a agary

LB médium	- 10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, dH ₂ O 1000 ml, pH 7,5
LB agar	- 1000 ml LB médium, 15 g agar
SOC médium	- 2 g trypton, 0,55 g kvasniční extrakt, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 1 ml 2 M Mg ²⁺ , 1 ml 2 M glukosa, dH ₂ O do 100 ml, pH 7

4.1.8 Komerční soustavy

Pro izolaci DNA z bakteriální kultury byly používány tyto soustavy:

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

- NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Machinery-nagel)

Pro přečišťování DNA (izolace z agarosového gelu po elektroforéze) byly používány následující soupravy:

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

Standardy molekulových hmotností

agarosová elektroforéza DNA – 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen), který obsahuje 20 fragmentů DNA od 100 bp do 12000 bp

Při nanesení 5 µl standardu obsahuje fragment o velikosti 1650 bp 40 ng DNA. Tohoto faktu bylo použito při přibližném odhadu množství a koncentrace vzorku.

4.2 Přístroje

- automatické pipety 2, 20, 50, 100, 200 a 1000 µl Pipetman Gilson
- box s laminárním prouděním vzduchu Ohaus
- centrifuga Eppendorf 5415R
- centrifuga Microspin 24S Dupont
- centrifuga Jouan Mir 23i
- digitální fotoaparát Olympus
- digitální váhy MXX-212 Denver Instrument
- lednice a mrazicí boxy
- mikrovlnná trouba
- thermocycler T1 Whatman Biometra
- thermocycler T Gradient Whatman Biometra
- vodní lázeň CC1 Huber
- vortex MS2 Minishaker IKA-Works
- zdroj elektroforézy EC-103 E-C Apparatus Corporation

4.3 Metody

4.3.1 Kultivace *E. coli*

Použité kmeny *E. coli* byly kultivovány na LB agaru nebo v LB médiu při teplotě 37 °C. Do LB agaru (rozehřátého a ochlazeného na 55 °C) nebo média byly pro selekci buněk nesoucí požadovaný plazmid přidány roztoky požadovaného antibiotika. Pro selekci buněk nesoucí konstrukty plazmidů odvozených od pET42b(+) byl přidán kanamycin o celkové koncentraci 30 mg/ml.

4.3.2 Transformace buněk *E. coli* teplotním šokem

Při transformaci teplotním šokem bylo k alikvotu kompetentních buněk přidáno odpovídající množství plazmidové DNA (50-100 ng) nebo ligační směsi (15-20 µl) a suspenze byla inkubována 30 minut na ledu. Poté byly buňky podrobeny teplotnímu šoku ve 42 °C po dobu 55 s a následně byly chlazeny v ledu po dobu 90 s. Ke směsi byl poté přidán 1 ml LB média přehřátého na 37 °C a směs byla inkubována ve vodní lázni jednu hodinu při 37 °C, což zajistilo plnou expresi rezistence k antibiotiku. Při používání metody „Quick Change” byla směs inkubována 1 hodinu na rotační třepačce při teplotě 37 °C a při 200 rpm. Po inkubaci byly buňky krátce centrifugovány, LB médium bylo odstraněno a buňky resuspendovány ve zbývajících cca 100 µl LB média.

Následně byly buňky „vysety” na plotnu s LB agarem, který obsahoval příslušné antibiotikum. Plotny byly inkubovány po dobu 12 až 18 hodin při 37 °C.

4.3.3 Izolace plazmidové DNA z *E. coli* pomocí komerčních soustav

K izolaci plazmidové DNA byly využívány komerční soustavy. Všechny izolace probíhaly ve třech stupních. Nejdříve bylo nutné buňky lyzovat a vysrážet většinu proteinů a chromosómalní DNA. Další krok spočíval v dalším čištění plazmidové DNA vazbou na „skleněné mléko“ (firma Promega). Při užití komerčních soustav byly dodržovány pokyny výrobce.

4.3.4 Agarosová elektroforéza DNA

Elektroforetické rozdělování fragmentů DNA je založeno na rozdílné pyhyblivosti, respektive velikosti molekul DNA. Při elektroforéze byl používán pufr TAE (1x) a agarosový gel koncentrace 0,8% nebo 2% v závislosti na velikosti rozdělovaných fragmentů. Do gelu byl pro vizualizace DNA pod UV světlem přidáván ethidiumbromid

(konečná koncentrace 0,005 %). Ke vzorkům byl před aplikací DNA na gel přidán vzorkový pufr v poměru 1:5. Elektroforéza probíhala při 3-5 V na 1cm délky gelu. Jako standard bylo používáno 5 μ l „1kb Plus DNA ladder“.

4.3.5 Izolace plazmidové DNA z agarosového gelu

Pro izolaci potřebného fragmentu z agarosového gelu po elektroforéze byla používána komerční soustava „SV Gel and PCR Clean-up System“ od firmy Promega. Při izolaci byly dodržovány pokyny výrobce.

4.3.6 Restrikce DNA

Při používání restrikčních endonukleas bylo vždy postupováno dle doporučení výrobce. Pro testování připravených konstruktů byl celkový objem 10-20 μ l, pro přípravu konstruktů až 200 μ l. Množství použitého enzymu se pohybovalo mezi 5-10 U na 1 μ g DNA. Reakční směs byla inkubována při 37 °C dvě hodiny pro přípravu konstruktů PATVB a 30 minut pro testování připravených konstruktů. Restrikce byla ukončena přidáním DNA vzorkového pufru.

4.3.7 Řetězová polymerázová reakce („Polymerase Chain Reaction“ - PCR)

Metoda PCR slouží k *in vitro* amplifikaci určitého úseku DNA. Templátová DNA je nejprve denaturována, poté na ni mohou za určité teploty (určené experimentálně) nasednout specifické primery. K těmto primerům DNA polymerasa připojuje dNTP přítomné v reakční směsi a prodlužuje k templátu komplementární řetězec. Opakováním cyklů dojde k mnohonásobnému zmnožení úseku, který byl vymezen specifickými primery. Všechny reakce byly prováděny v objemu 50 μ l.

PCR reakce byla používána k metodě cílené mutagenze.

Tab. 1 Složení PCR směsi pro přípravu fragmentů F1R1 a R2-W236F(Y):

Primery (F1-W236 a R1-W236; R2-W236 a F2-W236X*)	10 pmol každý
templát PATVB	40 ng
dNTP mix	výsledná koncentrace 10 mM
10x pufr pro LA polymerasu	1/10 objemu
LA polymerasa	2,5 U

dH ₂ O	doplněno do celkového objemu 50 µl
-------------------	------------------------------------

*X=Y, F

PCR program použitý pro přípravu fragmentů F1R1 a R2-W236F(Y):

1. denaturace	95 °C	5 min
2. přidání enzymu	68 °C	
3. denaturace	95 °C	30s
4. hybridizace	53-57,5 °C*	1 min
5. syntéza	68 °C	5 min
6. dokončení syntézy	68 °C	5 min

Kroky č. 3 až 5 opakovány 25x

*Hybridizační teploty:

53 °C	54,1 °C	55,3 °C	55,9 °C	57,5 °C
-------	---------	---------	---------	---------

4.3.8 Koloniová PCR

Tato metoda slouží k amplifikaci plazmidové DNA přímo z kolonie bez nutnosti předchozí izolace DNA. Funguje na stejném principu jako klasická PCR s tím rozdílem, že je vložena kolonie, odpíchnutá špičkou z LB agaru, přímo do reakční směsi. Reakce byla prováděna v objemu 50 µl.

Tab. 2 Složení reakční směsi pro kontrolní koloniovou PCR pro metodu „In-Fusion“:

Detergent Nonidet-P40	0,5 µl
10x LA pufr	1/10 objemu
MnCl ₂	výsledná koncentrace 50 mM
dNTP mix	výsledná koncentrace 10 mM
primer „forward“ a „reverse“	10 pmol každý
dH ₂ O	doplněno do celkového objemu 50 µl
Supreme NZYTAG polymerasa	5 U
Templát –kolonie	-

Jako templátová DNA byla do reakce použita jedna kolonie z agarové LB plotny odebrána sterilním párátkem.

PCR program použitý pro metodu „In-Fusion“:

1. denaturace	95 °C 5 min
---------------	-------------

2. přidání enzymu 68 °C
 3. denaturace 95 °C 30s
 4. hybridizace 54 °C 1 min
 5. syntéza 68 °C 5 min
 6. dokončení syntézy 68 °C 5 min
- Kroky č. 3 až 5 opakovány 20x

Tab. 3 Složení směsi pro kontrolní koloniovou PCR pro metodu „Quick Change“:

Primery („forward“ a „reverse“)	10 pmol každý
templát – kolonie	-
dNTP mix	celkově 10 mM
5x HF pufr	1/5 objemu
Phusion high Fidelity DNA polymerasa	2,5 U
dH ₂ O	doplněno na celkový objem 50 µl

Jako templátová DNA byla do reakce použita jedna kolonie z agarové LB plotny odebrána sterilním párátkem.

PCR program použitý pro metodu „Quick Change“:

1. denaturace 98 °C 5 min
 2. přidání enzymu 65 °C
 3. denaturace 98 °C 10s
 4. hybridizace 54 °C 20s
 5. syntéza 72 °C 45s
 6. dokončení syntézy 72 °C 7 min
- Kroky č. 3 až 5 opakovány 30x

4.3.9 Cílená mutagenese

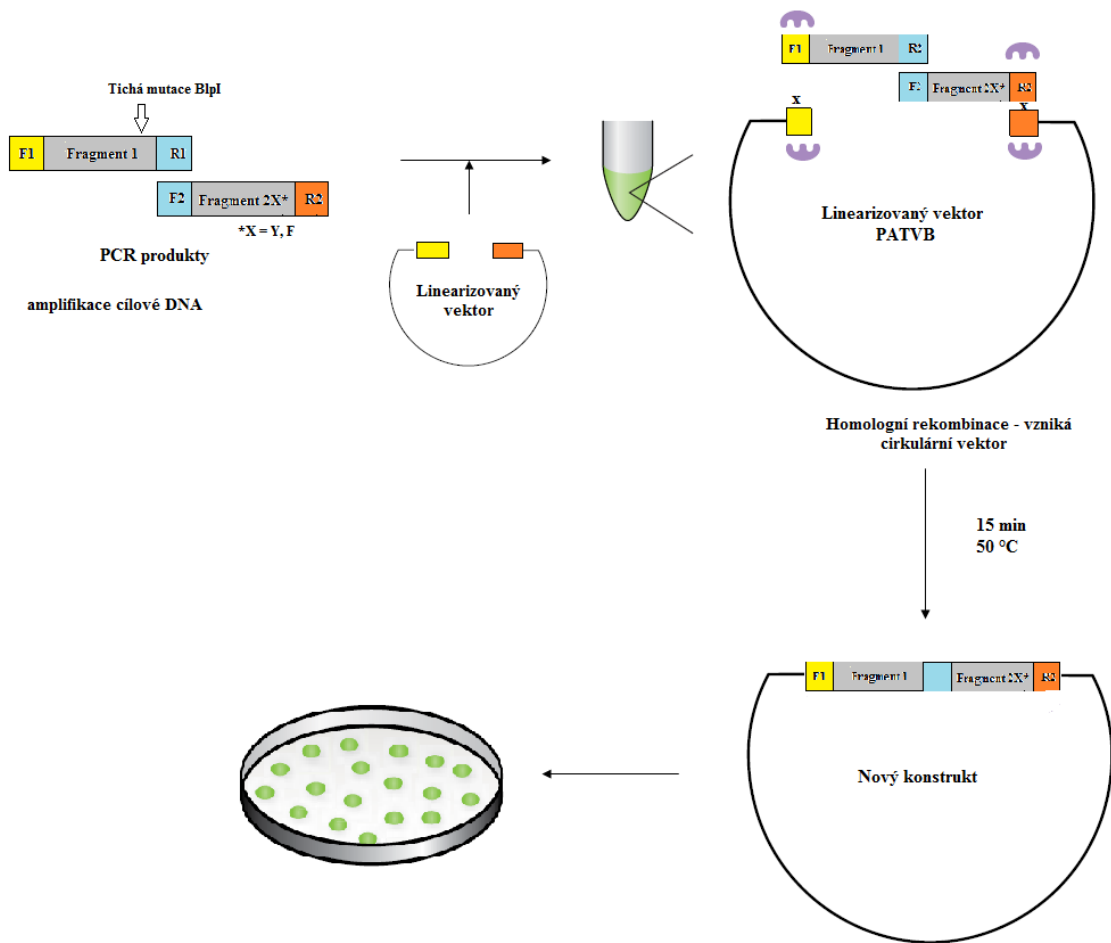
Cílená mutagenese je *in vitro* metoda, která se používá např. ke tvorbě bodových mutací v sekvenci DNA. Při reakci se používá metoda PCR (potřebná je dvouvláknová DNA a dva specifické primery obsahující požadovanou mutaci).

V této práci bylo použito k přípravě konstruktů s bodovou mutací dvou metod – metoda „In-Fusion“ a metoda „Quick Change“.

4.3.9.1 Metoda „In-Fusion”

Metoda „In-Fusion” umožňuje spojování fragmentů DNA za vzniku přesného konstruktů. Pro reakci je nezbytná amplifikace inzertu prostřednictvím PCR za použití specifických primerů s přesahy, které jsou homologní k používanému vektoru. Tyto specifické produkty umožňují rekombinaci s používaným vektorem, který je linearizovaný štěpením restrikcí endonukleasami. Toto spojení je uskutečněno pomocí tzv. „In-Fusion HD Enzyme Premixu” (Obr. 6).

Při tvorbě konstruktů byla použita „In-Fusion HD Cloning” komerční soustava od firmy Clontech. Postup byl proveden dle příslušného manuálu [77].



Obr. 6 Schéma metody „In-Fusion”. Obrázek převzat z [77] a upraven.

Tab. 4 Složení reakční směsi pro metodu „In-Fusion“:

	Mutace W236X* X=Y, F	Negativní kontrola- IF	Pozitivní kontrola - IF
PCR fragmenty	F1R1 a F2R2-W236X - 25ng každý	-	Kontrolní inzert 2 kb – 25 ng
Linearizovaný vektor	PATVB – 35 ng	pUC19 – 35 ng	pUC19 – 35 ng
In-Fusion HD Premix	1 µl	1 µl	1 µl
dH ₂ O	doplněno na celkovém objem 5 µl		

Fragment č. 1 – F1R1

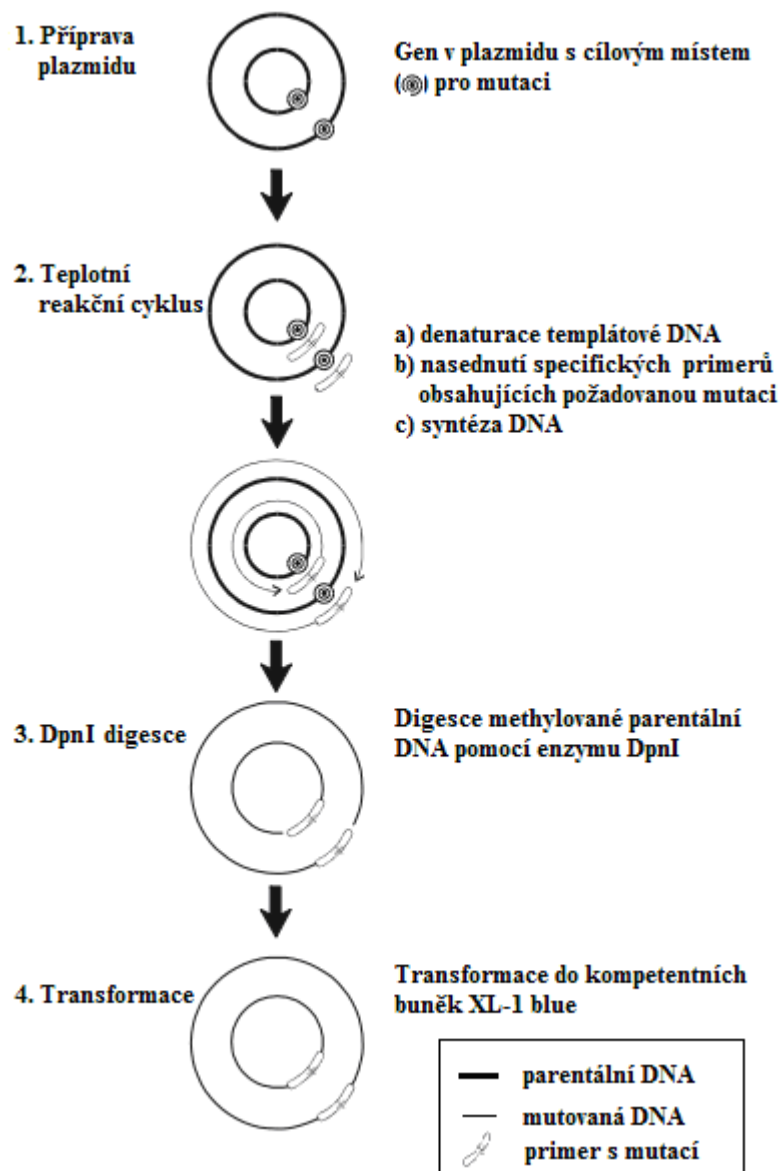
Fragment č. 2X* – R2-W236X*

*X=Y, F

Reakční směs byla po přidání „In-Fusion HD Premixu“ inkubována 15 minut při 50 °C. Poté byla tato směs transformována teplotním šokem do kompetentních buněk „Clontech Stellar Competent Cells“. Transformované buňky byly kultivovány na plotnách s LB agarem a příslušným antibiotikem (pro PATVB kanamycin a pro pUC19 ampicilin). Plotny s transformovanými buňkami byly inkubovány při 37 °C přes noc.

4.3.9.2 Metoda „Quick Change“

Při této metodě dochází k polymerační reakci, ve které se využívá „Phusion High Fidelity DNA polymerasa“ a teplotní reakční cyklus. Po reakci vznikne plazmid s požadovanou mutací. Následně po polymerační reakci je reakční směs štěpena pomocí DpnI. DpnI je restriční endonukleasa, rozpoznávající metylované a hemimetylované DNA, která se používá k odstranění metylované parentální DNA. Nakonec zůstane ve směsi pouze nově syntetizovaná mutovaná DNA, která je následně transformována do kompetentních buněk (Obr. 7). V této práci byla používána „Quick Change II Site-Directed Mutagenesis“ komerční soustava od firmy Agilent Technologies. Postup byl proveden dle manuálu od výrobce [78].



Obr. 7 Schéma metody Quick Change. Obrázek převzat z [78] a upraven.

Tab. 5 Složení PCR směsi pro zavedení mutací W236F a W236Y:

Primery (W236Y a W236F „forward“ a „reverse“)	12 pmol každý
templát PATVB	15 ng
dNTP mix	výsledná koncentrace 10 mM
5x HF pufr	1/5 objemu
Phusion high Fidelity DNA polymerasa	2,5 U
dH ₂ O	doplněno na celkový objem 50 μl

PCR program použitý pro mutaci W236F: PCR program použitý pro mutaci W236Y:

1. denaturace	95 °C 5 min	1. denaturace	98 °C 5 min
2. přidání enzymu	65 °C	2. přidání enzymu	65 °C
3. denaturace	95 °C 30s	3. denaturace	98 °C 30s
4. hybridizace	55 °C 1 min	4. hybridizace	51 °C 60s
5. syntéza	68 °C 6 min	5. syntéza	68 °C 3 min
6. dokončení syntézy	68 °C 7 min	6. dokončení syntézy	68 °C 8 min
Kroky č. 3 až 5 opakovány 15x		Kroky č. 3 až 5 opakovány 30x	

Tab. 6 Složení PCR směsi pro zavedení mutací F256W, F260W, L267W a F271W:

Primery (F256W; F260W; L267W a F271W „forward“ a „reverse“)	12 pmol každý
templát PATVB s mutací W236-F	15 ng
dNTP mix	výsledná koncentrace 10 mM
5x HF pufr	1/5 objemu
Phusion high Fidelity DNA polymerasa	2,5 U
dH ₂ O	doplněno na celkový objem 50 µl

PCR program pro zavedení mutací F256W, F260W, L267W a F271W:

1. denaturace	98 °C 5 min
2. přidání enzymu	65 °C
3. denaturace	98 °C 30s
4. hybridizace	51 °C 60s
5. syntéza	68 °C 3 min
6. dokončení syntézy	68 °C 8 min
Kroky č. 3 až 5 opakovány 30x	

Tab. 7 Optimalizované složení PCR směsi pro zavedení mutací F256W, F260W, L267W a F271W:

Primery (F256W; F260W; L267W a F271W „forward“ a „reverse“)	15 pmol každý
templát PATVB s mutací W236-F	30 ng

dNTP mix	výsledná koncentrace 10 mM
5x HF pufr	1/5 objemu
Phusion high Fidelity DNA polymerasa	2,5 U
dH ₂ O	doplněno na celkový objem 50 µl

Optimalizovaný PCR program pro zavedení mutací F256W, F260W, L267W a F271W:

1. denaturace 98 °C 5 min
2. přidání enzymu 65 °C
3. denaturace 98 °C 30s
4. hybridizace 51,6-63,5 °C* 1 min
5. syntéza 72 °C 4 min
6. dokončení syntézy 72 °C 8 min

Kroky č. 3 až 5 opakovány 35x

*Hybridizační teploty:

51,6 °C 54,0 °C 57,2 °C 60,4 °C 63,5 °C

Po skončení PCR programu bylo ze směsi odebráno 10 µl, které byly použity rovnou k transformaci, a ke zbývajícím 40 µl bylo přidáno 0,8 µl restrikčního enzymu DpnI. Směs byla poté inkubována 1 h při 37 °C, což zajistilo degradaci templátové methylované DNA.

Takto upravená směs byla transformována do kompetentních buněk XL1 - Blue. Buňky byly kultivovány na LB plotně s příslušným antibiotikem.

4.3.10 Sekvence DNA

Ke konečnému ověření sekvence plazmidové DNA byla použita sekvenace provedená komerčně firmou Macrogen z Jižní Koreji.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Výsledky

5.1.1 Záměna zbytku tryptofanu v pozici 236 v α -HPP

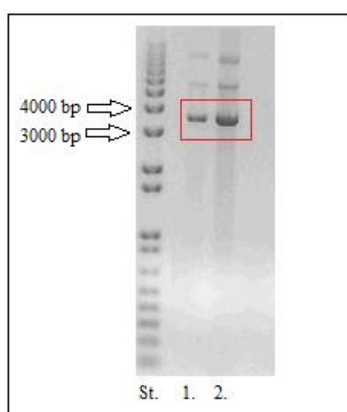
Protein α -HPP parazita *T. vaginalis* obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci jeden přirozený zbytek tryptofanu. Pro záměnu tohoto zbytku byly vybrány aminokyseliny, které se svými vlastnostmi nejvíce podobají tryptofanu. Bylo to provedeno z toho důvodu, že musela být zachována stabilita i aktivita daného proteinu. Vybranými aminokyselinami byly tyrosin a fenylalanin.

K záměně zbytku tryptofanu v pozici 236 α -HPP bylo použito dvou metod. Jako první byla použita metoda „In-Fusion” a poté metoda „Quick Change”.

K přípravě byl použit vektor PATVB, který nese gen pro α -HPP s His-kotvou na C-konci v pET42b(+).

5.1.1.1 Izolace plazmidu PATVB

Plazmid PATVB byl izolován z buněk JM109 pomocí komerční soustavy „Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System” od firmy Promega. Přítomnost a množství daného plazmidu byly ověřeny prostřednictvím agarosové elektroforézy (Obr. 8). Byl izolován plazmid PATVB o koncentraci cca 20 ng/ μ l.

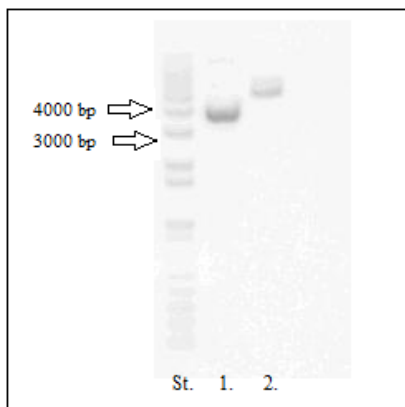


Obr. 8 Izolace plazmidu PATVB

Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. St. – standard, 1. – PATVB: 40 ng na dráze, 2. – PATVB: 100 ng na dráze. V červeném rámečku je označena ccc forma plazmidu.

5.1.1.2 Příprava vektoru – restrikce plazmidu PATVB

Plazmid PATVB o koncentraci 20 ng/μl byl štěpen restrikčními endonukleasami NdeI a XhoI. Po ukončení štěpení byly fragmenty štěpeného vektoru PATVB rozděleny pomocí agarosové elektroforézy a fragment o velikosti 5013 bp byl izolován pomocí komerční soustavy „Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” od firmy Promega (Obr. 9).



Obr. 9 Restrikce vektoru PATVB restrikčními endonukleasami NdeI a XhoI

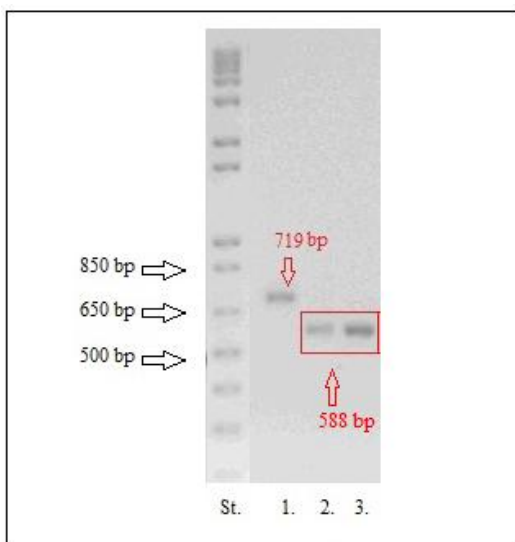
Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. St. – standard, 1 – neštěpený vektor PATVB, 2 – štěpený linearizovaný vektor PATVB.

5.1.1.3 Příprava fragmentů PCR k metodě „In-Fusion”

Použitím metody PCR byly získány fragmenty se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin a tyrosin. Složení PCR směsi a PCR program jsou uvedeny v sekci 4.3.7 (Tab. 1).

Produkty PCR byly analyzovány za použití agarosové elektroforézy. Bylo testováno pět hybridizačních teplot a všechny poskytovaly srovnatelné zastoupení výsledných fragmentů na agarosovém gelu. Z těchto pěti teplot byla vybrána u každého fragmentu pouze jedna teplota, která vedla k získání nejčistšího produktu PCR. U fragmentu č. 1 a u fragmentu č. 2Y to byla teplota 55,9 °C. U fragmentu č. 2F byla vybrána teplota 57,5 °C.

Produkty PCR byly po agarosové elektroforéze vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí komerční soustavy „Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” od firmy Promega. Fragment č. 1 měl očekávanou velikost 719 bp a fragmenty č. 2 (Y, F) měly očekávanou velikost 588 bp (Obr. 10).



Obr. 10 Přečištěné amplifikované úseky DNA metodou PCR

Agarosová elektroforéza; 2% gel. St. – standard, 1. – fragment F1R1, velikost 719 bp. 2. a 3. – fragmenty R2-W236X*, velikost 588 bp. 1.-2.: koncentrace fragmentů 25 ng/μl. 3.: koncentrace fragmentu 50 ng/μl. *X=Y, F

5.1.1.4 Metoda „In-Fusion” pro zavedení mutace W236Y

Spojení linearizovaného vektoru PATVB s připravenými fragmenty PCR bylo uskutečněno pomocí metody „In-Fusion”. Bylo použito protokolu č. 1, který je obsažen v návodu od výrobce [77]. Složení reakční směsi je uvedeno v sekci 4.3.9.1 (Tab. 4).

Tato reakční směs byla transformována do buněk „Clontech Stellar Competent Cells”. Spolu s pozitivní a negativní kontrolou, které byly již součástí komerční soustavy „In-Fusion”, byly provedeny další kontroly s cirkulárním a lineárním vektorem PATVB pro kontrolu kvality linearizace vektoru PATVB. Transformace buněk proběhla úspěšně. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 8.

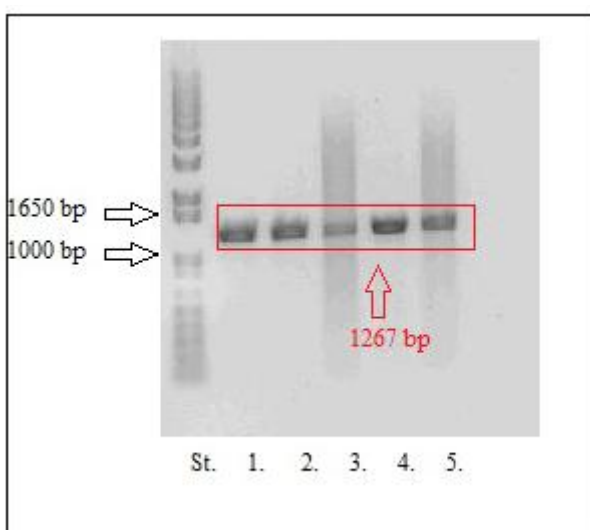
Tab. 8 Výsledek transformace metody „In-Fusion”:

	Počet kolonií
Mutace W236Y	stovky
Negativní kontrola In-Fusion	13
Pozitivní kontrola In-Fusion	stovky
Kontrola s linearizovaným PATVB	11
Kontrola s cirkulárním PATVB	stovky

5.1.1.4.1 Kontrolní koloniová PCR a kontrolní restrikce pro mutaci W236Y

Byla provedena koloniová PCR z transformovaných buněk s vloženým inzertem do plazmidu PATVB pro ověření přítomnosti mutace W236Y. Složení PCR směsi a PCR program jsou uvedeny v sekci 4.3.8 (Tab. 2).

Produkty koloniové PCR byly analyzovány na agarosové elektroforéze. Jak je patrné z obrázku 11, všechny produkty měly velikost 1267 bp, která odpovídá velikosti inzertu vloženého do plazmidu PATVB v místech NdeI a XhoI.



Obr. 11 Koloniová PCR pro ověření přítomnosti inzertu vloženého do plazmidu PATVB.

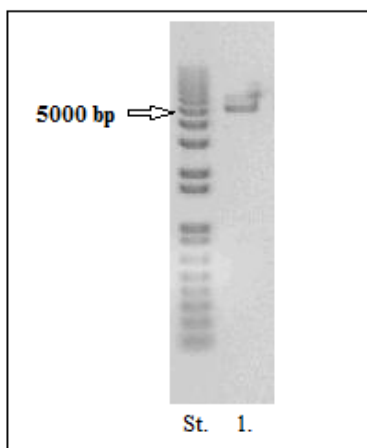
Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. St. – standard, 1.-5. – DNA vybraných klonů. Všechny fragmenty mají očekávanou velikost 1267 bp – vyznačeno červeným rámečkem.

Pro ověření přítomnosti mutace W236Y v plazmidu PATVB byla provedena kontrolní restrikce, kdy bylo využito nové zavedené restrikční místo BlnI. Velikost očekávaných fragmentů byla 5580 a 706 bp. Přítomnost těchto fragmentů nebyla potvrzena.

Produkty PCR byly následně po agarosové elektroforéze vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí komerční soustavy „Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” od firmy Promega a byly opět podrobeny restrikční kontrole prostřednictvím místa „tiché” mutace BlnI. Přítomnost očekávaných fragmentů opět nebyla potvrzena.

Z vybraných transformantů z pěti kolonií byla izolována plazmidová DNA použitím komerční soustavy „Plazmid DNA Purification” od firmy Macherey-Nagel. Plazmidová DNA byla opět podrobena restrikční kontrole pomocí BlnI stejným způsobem jako v předchozím případě. Restrikční kontrola neprokázala přítomnost požadované mutace W236Y, ale i přesto byla izolovaná DNA zaslána k určení sekvence bází. Přítomnost mutované sekvence nebyla pomocí sekvenace potvrzena.

Z důvodu nezavedené mutace W236Y v plazmidu PATVB byla ověřena přítomnost všech fragmentů a templátu pomocí agarosové elektroforézy. Linearizovaný vektor PATVB obsahoval částečně „naštěpený” původní cirkulární plazmid PATVB (Obr. 12). Proto byl přečištěn z gelu pomocí komerční soustavy „Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” od firmy Promega.



Obr. 12 Kontrolní elektroforéza vektoru PATVB štěpeného restrikcími enzymy NdeI a XhoI
Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. St. – standard, 1. – štěpený vektor PATVB, naneseno 75 ng.

S přečištěným linearizovaným vektorem PATVB byla znovu provedena metoda „In-Fusion”. Postup, složení ligační směsi a transformace byly zcela totožné jako v předchozím případě. Na miskách s LB agarem nevyrostly žádné kolonie.

5.1.1.5 Metoda „Quick Change” k zavedení mutací W236F a W236Y

Kvůli selhání metody „In-Fusion” byla k další přípravě mutací využita metoda „Quick Change”.

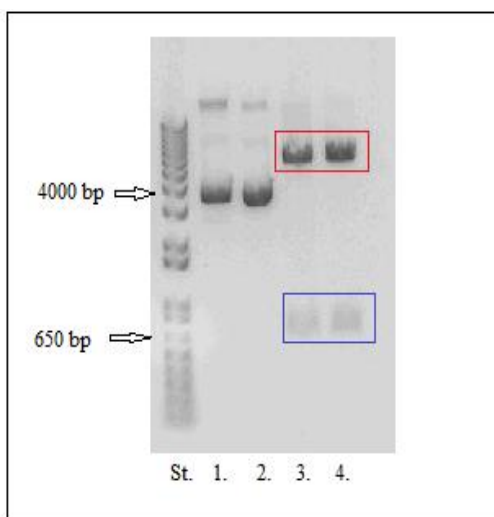
Pro bodovou mutaci genu kódující α -HPP, která vede k záměně zbytku tryptofanu v pozici 236 za tyrosin nebo fenylalanin, byla použita komerční soustava „QuickChange II Site-Directed Mutagenesis” od firmy Agilent Technologies.

PCR byla uskutečněna na přečištěném vektoru PATVB. Složení reakční směsi a PCR program jsou uvedeny v sekci 4.3.9.2 (Tab. 5). Po skončení programu PCR byl do směsi přidán enzym DpnI a tato směs byla transformována do buněk XL1 – Blue.

Na miskách kultivovaných přes noc u mutace W236F vyrostly 3 kolonie a u mutace W236Y nevyrostla žádná kolonie. Na miskách bez DpnI digescce byly v obou případech desítky kolonií.

Ze třech vyrostlých kolonií byla za účelem ověření přítomnosti dané mutace v amplifikovaném úseku provedena koloniová PCR. Složení reakční směsi je uvedeno v sekci 4.3.8 (Tab. 3). Očekávaný fragment měl velikost 1368 kb.

Produkty koloniové PCR byly podrobeny restriční kontrole enzymem BspI, který štěpí v místě vzniklém „tichou“ mutací. Očekávané fragmenty měly velikost 5580 a 706 bp. Dvě kolonie poskytly pozitivní výsledek a z nich byla izolována plazmidová DNA použitím komerční soustavy „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” od firmy Promega. Po izolaci byly plazmidy opět podrobeny restriční kontrole. Jak je patrné z obrázku 13, štěpení restričními enzymy potvrdilo přítomnost vloženého inzertu do obou plazmidů. Přítomnost správné mutace byla ověřena sekvenací.

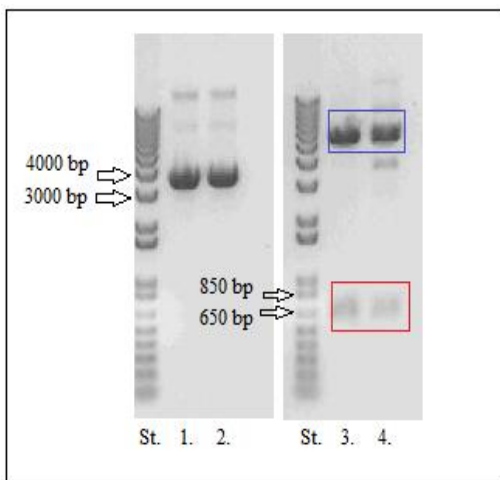


Obr. 13 Restriční kontrola plazmidové DNA kódující mutaci W236F

Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. St. – standard, 1. a 2. – plazmidová DNA ze dvou kolonií, 3. a 4. – kontrolní restrikce enzymem BspI štěpícím v místě „tiché” mutace vloženém v plazmidové DNA ze dvou kolonií. Očekávané fragmenty jsou označeny v červeném a modrém rámečku a mají velikost 5580 a 706 bp.

U mutace W236Y byl optimalizován průběh PCR. Reakční směs byla totožná jako u mutace W236F. PCR program a složení směsi jsou uvedeny v sekci 4.3.9.2 (Tab. 5).

Následně bylo postupováno stejně jako u mutace W236F. Přes noc vyrostly dvě kolonie, které byly podrobeny koloniové PCR a následně restriční kontrole (Obr. 14). Z obou pozitivních klonů byla izolována plazmidová DNA pomocí komerční soustavy „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” od firmy Promega a správnost sekvence byla ověřena sekvenací.



Obr. 14 Restrikční kontrola plazmidové DNA kódující mutaci W236Y

Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. St. – standard, 1. a 2. – plazmidová DNA ze dvou kolonií, 3. a 4. – kontrolní restrikce enzymem BlnI štěpícím v místě „tiché“ mutace vloženém v plazmidové DNA ze dvou kolonií. Očekávané fragmenty jsou označeny v červeném a modrém rámečku a mají velikost 5580 a 706 bp.

Byl vytvořen vektor PATVB s mutací W236F a W236Y.

5.1.2 Zavedení zbytků tryptofanu do oblasti smyčky bohaté na glycin

Poté, co byl připraven expresní vektor obsahující gen pro α -HPP bez přirozeně se vyskytujícího zbytku tryptofanu, bylo potřeba zavést nový reportérový zbytek tryptofanu do míst vytipovaných na základě homologního modelu v oblasti GRL – pozice F256, F260, L267 a F271. Do těchto pozic byl pomocí metody cílené mutagenese zaveden tryptofan, a to použitím opět komerční soustavy „QuickChange II Site-Directed Mutagenesis” od firmy Agilent Technologies.

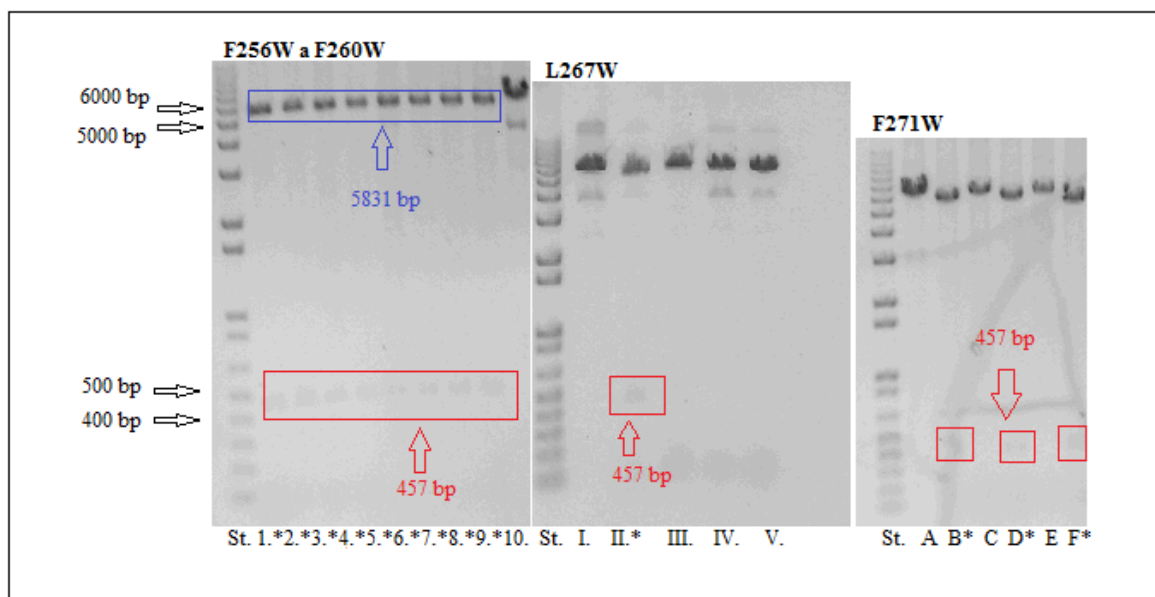
Dle aktivitních testů se ukázalo, že aktivnější a stabilnější je pravděpodobně protein s mutací W236F, proto se dále pracovalo pouze s touto mutantou (aktivitní a stabilitní testy provedeny kolegy z laboratoře).

Mutagenese v tomto případě byla provedena na vektoru PATVB se záměnou kódující zbytek fenylalaninu v pozici 236 místo tryptofanu, a to za pomoci metody „Quick Change”. Složení reakční směsi a PCR program jsou uvedeny v sekci 4.3.9.2 (Tab. 6). Po skončení programu PCR byl do směsi přidán enzym DpnI a tato směs byla transformována do buněk XL1 – Blue.

Na miskách s kultivovanými buňkami nebyly žádné kolonie. Na miskách, kde se transformovala směs bez DpnI digesce, byly desítky kolonií. Proto následovala řada experimentů, kde se měnily hybridizační teploty a koncentrace primerů. Nakonec bylo zjištěno, že důležitým faktorem pro úspěch dané metody byla kvalita kompetentních buněk XL1 - Blue. Optimální složení PCR směsi je uvedeno v sekci 4.3.9.2 (Tab. 7).

Od každé hybridizační teploty a mutace byla vybrána jedna kolonie, která byla podrobena koloniové PCR a následné restriční kontrole pomocí restričního enzymu BamHI (Obr. 15). Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerční soupravy „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” od firmy Promega a přítomnost mutace byla potvrzena sekvenací.

Byly vytvořeny vektory PATVB s mutacemi F256W, F260W, L267W a F271W.



Obr. 15 Restriční kontrola plazmidové DNA kódující mutace F256W, F260W, L267W a F271W

Agarosová elektroforéza; 0,8% gel. Kontrolní restrikce enzymem BamHI v místě „tiché” mutace. St. – standard, 1.-5. – plazmidová DNA kódující mutaci F256W z vybraných kolonií. 6.-10. - plazmidová DNA kódující mutaci F260W z vybraných kolonií. I.-V. - plazmidová DNA kódující mutaci L267W z vybraných kolonií. A-F - plazmidová DNA kódující mutaci F271W z vybraných kolonií. Klony, které obsahují mutaci, jsou označeny hvězdičkou. Očekávané fragmenty jsou označeny v červeném a modrém rámečku a mají velikost 457 a 5831 bp.

5.2 Diskuse

Tato bakalářská práce byla vypracována v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky. Uvedená laboratoř se mj. zabývá studiem mechanismu rozpoznávání a proteolytické úpravy substrátů peptidasami mitochondriálního typu. Zejména se zajímá o primární kontakt substrátu s MPP. Důležitou roli v tomto prvotním kontaktu má pravděpodobně smyčka bohatá na glycin v α -MPP. Měřením přirozené fluorescence tryptofanů bylo zjištěno, že při interakci substrátu s α -podjednotkou MPP dochází ke konformační změně v oblasti GRL [60]. Paralelně se provádějí obdobné experimenty s měřením interakce hydrogenosomální „processing“ peptidasy se substráty prostřednictvím fluorescenčních metod.

Cílem této práce bylo připravit konstrukty kódující α -HPP se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 a následně zavést do vytvořeného konstruktů nový reportérový tryptofan do pozice 257, 260, 267 nebo 271. Vytvořený konstrukt bude sloužit k přípravě proteinu HPP, který bude podroben fluorescenčnímu měření, podobně jako tomu bylo u MPP.

Jako první byla k přípravě konstruktů kódujících α -HPP se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 použita metoda „In-Fusion“. Princip metody je uveden v sekci 4.3.9.1. V tomto případě se nedařilo pomocí této metody připravit výsledný konstrukt. Byly provedeny kontroly vektorů i připravených fragmentů. Při kontrole se ukázalo, že použitý linearizovaný vektor PATVB obsahoval i částečně „naštěpený“ původní cirkulární plazmid PATVB. Vektor byl přečištěn, ale ani to nevedlo k vytvoření požadovaného konstruktů. Proto byla použita další metoda.

Pomocí metody „Quick Change“ byly vytvořeny konstrukty kódující α -HPP se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 za dvě aminokyseliny, které se svými vlastnostmi nejvíce podobají tryptofanu. Těmito dvěma aminokyselinami byly tyrosin a fenylalanin. Aktivitní testy vytvořených proteinů, připravených kolegy z laboratoře, ukázaly, že nejvyšší aktivitu vykazoval protein obsahující v pozici 236 fenylalanin, a proto bylo dále pracováno s touto mutací.

Princip tvorby daného konstruktů je uveden s sekci 4.3.9.2. Během přípravy se vyskytl problém s amplifikací daného úseku genu prostřednictvím metody PCR. Problém byl vyřešen pozměněním hybridizační teploty při průběhu PCR. Tato teplota je důležitým faktorem pro amplifikaci dané sekvence.

Do konstruktů se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin byl následně zaveden nový reportérový zbytek tryptofanu do pozice 256, 260, 267 nebo 271. V tomto případě se objevil podobný problém jako při tvorbě prvního konstruktů. Nedařilo se přijít na příčinu nefunkčnosti amplifikace daného úseku genu pomocí PCR. Byly vyzkoušeny různé teploty, ověřena správná funkce polymerasy, ale nakonec se ukázalo, že problém byl v kvalitě kompetentních buněk XL1 - Blue. Při použití kompetentních buněk uchovávaných v mrazicím boxu při -80 °C se transformace nezdařila, zatímco při použití čerstvě připravených buněk se transformace daného plazmidu podařila.

S vytvořenými konstrukty se zavedenými zbytky tryptofanu v nových pozicích budou provedeny exprese a izolace příslušných proteinů. Následně se bude zjišťovat, zda takto vytvořená hydrogenosomální „processing“ peptidasa vykazuje aktivitu po přidání substrátu a nakonec proběhne měření interakce proteinu se substráty fluorescenčními metodami.

6 Závěr

1. V rámci předkládané bakalářské práce byla provedena rešerše literatury shrnující poznatky o peptidasách rodiny M16B s ohledem na jejich evoluční souvislosti.
2. Prostřednictvím metody cílené mutagenese byly připraveny konstrukty kódující α -HPP se zaměněným zbytkem tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin a tyrosin.
3. Byl zaveden reportérový zbytek tryptofanu do pozice 256, 260, 267 nebo 271 v GRL α -HPP, kde byl současně zaměněn přirozený zbytek tryptofanu v pozici 236 za fenylalanin.

7 Seznam literatury

1. Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution, *Science* 283, 1476-81.
2. Embley, T. M., van der Giezen, M., Horner, D. S., Dyal, P. L., and Foster, P. (2003) Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle, *Philos T Roy Soc B* 358, 191-202.
3. Lang, B. F., Gray, M. W., and Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes, *Annu Rev Genet* 33, 351-97.
4. Andersson, S. G. E., Karlberg, O., Canback, B., and Kurland, C. G. (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective, *Philos T Roy Soc B* 358, 165-77.
5. Dyall, S. D., Brown, M. T., and Johnson, P. J. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles, *Science* 304, 253-57.
6. Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature* 396, 133-40.
7. Andersson, S. G. E., and Kurland, C. G. (1998) Reductive evolution of resident genomes, *Trends Microbiol* 6, 263-68.
8. Andersson, S. G. E. (1998) Bioenergetics of the obligate intracellular parasite *Rickettsia prowazekii*, *Biochim Biophys Acta* 1365, 105-11.
9. Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases, *Annu Rev Biochem* 77, 669-700.
10. Burger, G., Gray, M. W., and Lang, B. F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes, *Trends Genet* 19, 709-16.
11. Muller, M. (1993) The Hydrogenosome, *J Gen Microbiol* 139, 2879-89.
12. Plumper, E., Bradley, P. J., and Johnson, P. J. (1998) Implications of protein import on the origin of hydrogenosomes, *Protist* 149, 303-11.
13. van der Giezen, M., Slotboom, D. J., Horner, D. S., Dyal, P. L., Harding, M., Xue, G. P., Embley, T. M., and Kunji, E. R. S. (2002) Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles, *Embo J* 21, 572-79.
14. Hackstein, J. H. P., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R., and Voncken, F. G. J. (1999) Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments, *Trends Microbiol* 7, 441-47.

15. Johnson, P. J., Bradley, P. J., Lahti, C. J. (1995) Cell biology of trichomonads: protein targeting to hydrogenosome, In *Molecular approaches to parasitology*, pp 399-411, Wiley-Liss, New York.
16. Cavaliersmith, T. (1987) The Simultaneous Symbiotic Origin of Mitochondria, Chloroplasts, and Microbodies, *Proc Natl Acad Sci U S A* 503, 55-71.
17. Shiflett, A. M., and Johnson, P. J. (2010) Mitochondrion-Related Organelles in Eukaryotic Protists, *Annu Rev Microbiol* 64, 409-29.
18. Becker, A. B., and Roth, R. A. (1992) An Unusual Active-Site Identified in a Family of Zinc Metalloendopeptidases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 3835-39.
19. Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1991) Homologs of Insulinase, a New Superfamily of Metalloendopeptidases, *Biochem J* 275, 389-91.
20. Johnson, K. A., Bhushan, S., Stahl, A., Hallberg, B. M., Frohn, A., Glaser, E., and Eneqvist, T. (2006) The closed structure of presequence protease PreP forms a unique 10 000 Å³ chamber for proteolysis, *Embo J* 25, 1977-86.
21. Li, P., Kuo, W. L., Yousef, M., Rosner, M. R., and Tang, W. J. (2006) The C-terminal domain of human insulin degrading enzyme is required for dimerization and substrate recognition, *Biochem Biophys Res Commun* 343, 1032-37.
22. Deng, K., Shenoy, S. K., Tso, S. C., Yu, L., and Yu, C. A. (2001) Reconstitution of mitochondrial processing peptidase from the core proteins (subunits I and II) of bovine heart mitochondrial cytochrome bc(1) complex, *J Biol Chem* 276, 6499-505.
23. Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A., and Deisenhofer, J. (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences, *Structure* 9, 615-25.
24. Aleshin, A. E., Gramatikova, S., Hura, G. L., Bobkov, A., Strongin, A. Y., Stec, B., Tainer, J. A., Liddington, R. C., and Smith, J. W. (2009) Crystal and solution structures of a prokaryotic M16B peptidase: an open and shut case, *Structure* 17, 1465-75.
25. Baker, K. P., and Schatz, G. (1991) Mitochondrial Proteins Essential for Viability Mediate Protein Import into Yeast Mitochondria, *Nature* 349, 205-8.
26. Hartl, F. U., Pfanner, N., Nicholson, D. W., and Neupert, W. (1989) Mitochondrial Protein Import, *Biochim Biophys Acta* 988, 1-45.
27. Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria, *Annu Rev Biochem* 66, 863-917.
28. Pfanner, N., Craig, E. A., and Honlinger, A. (1997) Mitochondrial preprotein translocase, *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 25-51.
29. Ryan, K. R., and Jensen, R. E. (1995) Protein Translocation across Mitochondrial-Membranes - What a Long, Strange Trip It Is, *Cell* 83, 517-19.
30. Schatz, G. (1996) The protein import system of mitochondria, *J Biol Chem* 271, 31763-66.

31. Gakh, E., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002) Mitochondrial processing peptidases, *Biochim Biophys Acta* 1592, 63-77.
32. Ito, A. (1999) Mitochondrial processing peptidase: Multiple-site recognition of precursor proteins, *Biochem Biophys Res Commun* 265, 611-16.
33. Luciano, P., and Geli, V. (1996) The mitochondrial processing peptidase: function and specificity, *Experientia* 52, 1077-82.
34. Yaffe, M. P., Ohta, S., and Schatz, G. (1985) A Yeast Mutant Temperature-Sensitive for Mitochondrial Assembly Is Deficient in a Mitochondrial Protease Activity That Cleaves Imported Precursor Polypeptides, *Embo J* 4, 2069-74.
35. Nomura, H., Athauda, S. B., Wada, H., Maruyama, Y., Takahashi, K., and Inoue, H. (2006) Identification and reverse genetic analysis of mitochondrial processing peptidase and the core protein of the cytochrome bc1 complex of *Caenorhabditis elegans*, a model parasitic nematode, *J Biochem* 139, 967-79.
36. Böhni, P., and Gasser S. (1980) A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmically-made precursors to mitochondrial proteins, In *The Organisation and Expression of the Mitochondrial Genome*, pp 423-33, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
37. Hawlitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F. U., and Neupert, W. (1988) Mitochondrial Protein Import - Identification of Processing Peptidase and of Pep, a Processing Enhancing Protein, *Cell* 53, 795-806.
38. Yang, M., Jensen, R. E., Yaffe, M. P., Oppliger, W., and Schatz, G. (1988) Import of Proteins into Yeast Mitochondria - the Purified Matrix Processing Protease Contains 2 Subunits Which Are Encoded by the Nuclear Mas1 and Mas2 Genes, *Embo J* 7, 3857-62.
39. Ou, W. J., Ito, A., Okazaki, H., and Omura, T. (1989) Purification and Characterization of a Processing Protease from Rat-Liver Mitochondria, *Embo J* 8, 2605-12.
40. Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., and Schmitz, U. K. (1992) The General Mitochondrial Processing Peptidase from Potato Is an Integral-Part of Cytochrome-C Reductase of the Respiratory-Chain, *Embo J* 11, 3219-27.
41. Niidome, T., Kitada, S., Shimokata, K., Ogishima, T., and Ito, A. (1994) 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, 24719-722.
42. Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., Bodicker, M., and Schmitz, U. K. (1995) The General Mitochondrial Processing Peptidase from Wheat Is Integrated into the Cytochrome Bc1 Complex of the Respiratory-Chain, *Planta* 195, 396-402.

43. Eriksson, A., Sjoling, S., and Glaser, E. (1996) Characterization of the bifunctional mitochondrial processing peptidase (MPP)/bc(1) complex in *Spinacia oleracea*, *J Bioenerg Biomembr* 28, 285-92.
44. Brumme, S., Krufft, V., Schmitz, U. K., and Braun, H. P. (1998) New insights into the co-evolution of cytochrome c reductase and the mitochondrial processing peptidase, *J Biol Chem* 273, 13143-49.
45. Mcada, P. C., and Douglas, M. G. (1982) A Neutral Metallo Endoprotease Involved in the Processing of an F1-ATPase Subunit Precursor in Mitochondria, *J Biol Chem* 257, 3177-82.
46. Miura, S., Mori, M., Amaya, Y., and Tatibana, M. (1982) A Mitochondrial Protease That Cleaves the Precursor of Ornithine Carbamoyltransferase - Purification and Properties, *Eur J Biochem* 122, 641-47.
47. Conboy, J. G., Fenton, W. A., and Rosenberg, L. E. (1982) Processing of Pre-Ornithine Transcarbamylase Requires a Zinc-Dependent Protease Localized to the Mitochondrial Matrix, *Biochem Biophys Res Commun* 105, 1-7.
48. Schmidt, B., Wachter, E., Sebald, W., and Neupert, W. (1984) Processing Peptidase of *Neurospora* Mitochondria - 2-Step Cleavage of Imported ATPase Subunit-9, *Eur J Biochem* 144, 581-88.
49. Daley, D. O., Adams, K. L., Clifton, R., Qualmann, S., Millar, A. H., Palmer, J. D., Pratje, E., and Whelan, J. (2002) Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2, *Plant J* 30, 11-21.
50. Branda, S. S., and Isaya, G. (1995) Prediction and Identification of New Natural Substrates of the Yeast Mitochondrial Intermediate Peptidase, *J Biol Chem* 270, 27366-73.
51. Moriwaki, K., Ogishima, T., and Ito, A. (1999) Analysis of recognition elements for mitochondrial processing peptidase using artificial amino acids: roles of the intervening portion and proximal arginine, *J Biochem* 126, 874-78.
52. von Heijne, G. (1986) Mitochondrial Targeting Sequences May Form Amphiphilic Helices, *Embo J* 5, 1335-42.
53. Roise, D., Theiler, F., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H., Allison, D. S., and Schatz, G. (1988) Amphiphilicity Is Essential for Mitochondrial Presequence Function, *Embo J* 7, 649-53.
54. Hendrick, J. P., Hodges, P. E., and Rosenberg, L. E. (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4056-60.

55. Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20, *Cell* 100, 551-60.
56. Pollock, R. A., Hartl, F. U., Cheng, M. Y., Ostermann, J., Horwich, A., and Neupert, W. (1988) The Processing Peptidase of Yeast Mitochondria - the 2 Cooperating Components Mpp and Pep Are Structurally Related, *Embo J* 7, 3493-500.
57. Jensen, R. E., and Yaffe, M. P. (1988) Import of Proteins into Yeast Mitochondria - the Nuclear Mas2 Gene Encodes a Component of the Processing Protease That Is Homologous to the Mas1-Encoded Subunit, *Embo J* 7, 3863-71.
58. Yang, M., Geli, V., Oppliger, W., Suda, K., James, P., and Schatz, G. (1991) The Mas-Encoded Processing Protease of Yeast Mitochondria - Interaction of the Purified Enzyme with Signal Peptides and a Purified Precursor Protein, *J Biol Chem* 266, 6416-23.
59. Luciano, P., Geoffroy, S., Brandt, A., Hernandez, J. F., and Geli, V. (1997) Functional cooperation of the mitochondrial processing peptidase subunits, *J Mol Biol* 272, 213-25.
60. Gakh, O., Obsil, T., Adamec, J., Spizek, J., Amler, E., Janata, J., and Kalousek, F. (2001) Substrate binding changes conformation of the alpha-, but not the beta-subunit of mitochondrial processing peptidase, *Arch Biochem Biophys* 385, 392-6.
61. Janata, J., Hola, K., Kubala, M., Gakh, O., Parkhomenko, N., Matuskova, A., Kutejova, E., and Amler, E. (2004) 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* 316, 211-17.
62. Kitada, S., Uchiyama, T., Funatsu, T., Kitada, Y., Ogishima, T., and Ito, A. (2007) A protein from a parasitic microorganism, *Rickettsia prowazekii*, can cleave the signal sequences of proteins targeting mitochondria, *J Bacteriol* 189, 844-50.
63. Dvorakova-Hola, K., Matuskova, A., Kubala, M., Otyepka, M., Kucera, T., Vecer, J., Herman, P., Parkhomenko, N., Kutejova, E., and Janata, J. (2010) 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* 396, 1197-210.
64. Kleiber, J., Kalousek, F., Swaroop, M., and Rosenberg, L. E. (1990) The General Mitochondrial Matrix Processing Protease from Rat-Liver - Structural Characterization of the Catalytic Subunit, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 7978-82.
65. Rocha, C. R. C., and Gomes, S. L. (1999) Characterization and submitochondrial localization of the alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*, *J Bacteriol* 181, 4257-65.
66. Nagayama, K., Itono, S., Yoshida, T., Ishiguro, S., Ochiai, H., and Ohmachi, T. (2008) Antisense RNA inhibition of the beta subunit of the *Dictyostelium discoideum*

- mitochondrial processing peptidase induces the expression of mitochondrial proteins, *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1836-46.
67. Schulte, U., Arretz, M., Schneider, H., Tropschug, M., Wachter, E., Neupert, W., and Weiss, H. (1989) A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetICS and biogenesis, *Nature* 339, 147-49.
 68. Deng, K. P., Zhang, L., Kachurin, A. M., Yu, L., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., and Yu, C. A. (1998) Activation of a matrix processing peptidase from the crystalline cytochrome bc(1) complex of bovine heart mitochondria, *J Biol Chem* 273, 20752-57.
 69. Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plumper, E., and Johnson, P. J. (1997) Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: Similarities with mitochondrial protein import, *Embo J* 16, 3484-93.
 70. Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., and Lucocq, J. M. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation, *Nature* 426, 172-76.
 71. Brown, M. T., Goldstone, H. M., Bastida-Corcuera, F., Delgadillo-Correa, M. G., McArthur, A. G., and Johnson, P. J. (2007) A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry, *Mol Microbiol* 64, 1154-63.
 72. Smid, O., Matuskova, A., Harris, S. R., Kucera, T., Novotny, M., Horvathova, L., Hrdy, I., Kutejova, E., Hirt, R. P., Embley, T. M., Janata, J., and Tachezy, J. (2008) Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *trichomonas vaginalis* and *giardia intestinalis*, *PLoS Pathog* 4, e1000243.
 73. Bolhuis, A., Koetje, E., Dubois, J. Y., Vehmaanpera, J., Venema, G., Bron, S., and van Dijl, J. M. (2000) Did the mitochondrial processing peptidase evolve from a eubacterial regulator of gene expression?, *Mol Biol Evol* 17, 198-201.
 74. Ohtsuka, J., Ichihara, Y., Ebihara, A., Nagata, K., and Tanokura, M. (2009) Crystal structure of TTHA1264, a putative M16-family zinc peptidase from *Thermus thermophilus* HB8 that is homologous to the beta subunit of mitochondrial processing peptidase, *Proteins* 75, 774-80.
 75. Dabonne, S., Moallic, C., Sine, J. P., Niamke, S., Dion, M., and Colas, B. (2005) Cloning, expression and characterization of a 46.5-kDa metallopeptidase from *Bacillus halodurans* H4 sharing properties with the pitrilysin family, *Biochim Biophys Acta* 1725, 136-43.
 76. Maruyama, Y., Chuma, A., Mikami, B., Hashimoto, W., and Murata, K. (2011) Heterosubunit Composition and Crystal Structures of a Novel Bacterial M16B Metallopeptidase, *J Mol Biol* 407, 180-92.
 77. Clontech, In-Fusion HD Cloning Kit, User Manual PT5162-1.
 78. Stratagene, QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, User Manual PT200518-9.

8 Seznam použitých zkratek

α -MPP	- α -podjednotka MPP
α -HPP	- α -podjednotka HPP
β -MPP	- β -podjednotka MPP
β -HPP	- β -podjednotka HPP
MPP	- mitochondriální „processing“ peptidasa (EC 3.4.24.64)
HPP	- hydrogenosomální „processing“ peptidasa
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
F	- aminokyselina fenylalanin
GRL	- smyčka bohatá na glycin v α -MPP
PCR	- Polymerase Chain Reaction – Polymerasová řetězová reakce
RPP	- rickettsial putative protease – hypotetická proteasa z <i>Rickettsia</i>
W	- aminokyselina tryptofan
Y	- aminokyselina tyrosin

Zkratky použitých chemikálií, vektorů, pufrů a kultivačních médií jsou uvedeny v sekci 4.1.

