

Abstrakt

Mitochondriální procesující peptidasa (MPP) je heterodimerní enzym patřící do M16B skupiny metaloendopeptidas. Univerzální funkce tohoto enzymu je v rozeznání a odštěpení velké škály sekvenčně i délkou odlišných presekvenčí prekurzorů proteinů určených do mitochondrie. MPP se skládá z katalytické β -MPP a pravděpodobně rozpoznávací α -MPP. Nejkonzervovanější oblastí v α -MPP je tzv. glycinová smyčka (GRL – glycine-rich loop), jejíž předpokládaná funkce je v primární interakci s presekvenčí prekurzoru proteinu. Fluorescenčními experimenty je možné sledovat změnu konformace GRL po navázání substrátu.

V rámci této diplomové práce byly pomocí metody cílené mutagenese vytvořeny konstrukty kódující α -MPP s jediným reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 289 nebo 299. Tyto formy α -MPP byly nadprodukovány v buňkách *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL. Aktivity dimeru MPP obsahujícího α -MPP s jediným tryptofanovým zbytkem v reportérové pozici byly porovnány s MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*. Použitým substrátem byl prekurzor kvasinkové malátdehydrogenasy s fúzovanou presekvenčí (pMDH) ze tří organismů (kvasinky, myši, a melounu) lišící se svou délkou. Aktivity dimeru obsahujícího α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 289 se pohybovaly okolo 70 %, zatímco aktivity dimeru obsahujícího α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 299 byly okolo 90 %.

Sledování dynamiky reportérového tryptofanového zbytku v GRL v pozici 289 nebo 299 bylo provedeno použitím časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Z výsledků měření vyplývá, že se kvasinkový pMDH váže na α -MPP a vazbou substrátu dojde ke snížení pohyblivosti velmi flexibilní glycinové smyčky. Výsledky prokázaly podobnou míru konformační změny v okolí obou reportérových pozic.