

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Dana Chytrá

Charakterizace glycinové smyčky alfa podjednotky mitochondriální
procesující peptidasy *Saccharomyces cerevisiae*

Characterization of glycine-rich loop of mitochondrial processing
peptidase alpha subunit from *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2012

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za vedení mé diplomové práce.

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

Děkuji také celému kolektivu Laboratoře biologie sekundárního metabolismu Mikrobiologického ústavu AV ČR za velmi příjemné a přátelské prostředí.

Zvláštní poděkování patří mému manželovi za oporu, povzbuzení a vytvoření příjemného prostředí pro psaní této práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a především mamince, která mi umožnila studium a během studia mě podporovala.

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu Mikrobiologického ústavu AV ČR pod odborným vedením Ing. Jiřího Janaty, CSc. v období září 2009 – duben 2012 v rámci grantového projektu Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy (1M06011).

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.

Klíčová slova: α -MPP, β -MPP, GRL, presekvenče, prekurzor proteinu, primární interakce, aktivita, fluorescenční spektroskopie, tryptofanový zbytek, reportérová pozice.

Abstract

Mitochondrial processing peptidase (MPP) is a heterodimeric enzyme which belongs to M16B subfamily of metalloendopeptidases. A universal function of this enzyme is in recognition and cleavage of great number of mitochondrial preprotein presequences, which differ in length and amino acid sequence. MPP consists of catalytical β -MPP and probably recognizing α -MPP. The most conservative region in α -MPP is GRL – glycine-rich loop. Its function is supposed in primary interaction with preprotein presequence. It is possible to study conformational change of GRL after binding the substrate by fluorescence experiments.

In this diploma thesis the constructs coding the α -MPP with the single reporter tryptophan residue in the position 289 or 299 were prepared using site-directed mutagenesis. These forms of α -MPP were produced in *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL. Activities of MPP dimer containing α -MPP with the single tryptophan residue in the reporter position were compared with MPP from wild type of *S. cerevisiae*. Used substrate was yeast malate dehydrogenase precursor with fused presequence (pMDH) from three organisms (yeast, mouse and melon). These presequences differ in their length. Activities of MPP dimer containing α -MPP with the single reporter tryptophan residue in the position 289 were about 70 % while activities of MPP dimer containing α -MPP with the single reporter tryptophan residue in the position 299 were about 90 %.

Studying of dynamics of reporter tryptophan residue in GRL in the position 289 or 299 was performed by time-resolved fluorescence spectroscopy. The measurement results show that yeast pMDH binds into α -MPP. The mobility of this very flexible loop is reduced after binding the substrate. Results confirmed similar conformational change in the proximity of both reporter positions.

Key words: α -MPP, β -MPP, GRL, presequence, protein precursor, primary interaction, activity, fluorescence spectroscopy, tryptophan residue, reporter position.

Obsah:

Seznam zkratek	11
1. Úvod.....	12
2. Přehled literatury	14
2.1. Vývoj organel mitochondriálního typu	14
2.1.1. Mitochondrie	14
2.1.2. Organely odvozené od mitochondrie	16
2.2. Transport proteinových prekurzorů z cytosolu do mitochondrie.....	17
2.2.1. Translokace prekurzorů proteinů do matrix.....	17
2.2.2. Charakteristické prvky presekvenčí prekurzorů proteinů	21
2.2.2.1. Primární struktura.....	21
2.2.2.2. Sekundární struktura	22
2.3. Metaloendopeptidasy z rodiny M16.....	24
2.3.1. M16B skupina	25
2.3.1.1. RPP – hypotetická proteasa z <i>Rickettsia</i>	26
2.3.1.2. BHP – proteasa z <i>Bacillus halodurans</i>	28
2.4. Mitochondriální procesující peptidasa a její redukované formy.....	29
2.4.1. Struktura mitochondriální procesující peptidasy	29
2.4.1.1. α -podjednotka.....	30
2.4.1.2. β -podjednotka.....	30
2.4.2. Mechanismus katalytické funkce	31
2.4.3. Evoluční souvislosti	33
2.4.4. Hydrogenosomální procesující peptidasa	34
2.4.5. Mitosomální procesující peptidasa z <i>Giardia</i>	35
2.5. Studium primární interakce MPP-substrát	36
2.5.1. Glycinová smyčka α -podjednotky	36
2.5.1.1. Pohyblivost smyčky a interakce s presekvenčí	37
3. Materiál a metody	39
3.1. Materiál	39
3.1.1. Bakteriální kmeny	39
3.1.2. Vektory.....	40
3.1.3. Použité oligonukleotidy	41

3.1.4. Chemikálie	42
3.1.5. Enzymy	43
3.1.6. Pufry a roztoky	44
3.1.7. Kultivační média a agary	48
3.1.8. Komerční soupravy	48
3.1.9. Přístroje	49
3.1.10. Software	50
3.2. Metody	51
3.2.1. Práce s buňkami	51
3.2.1.1. Kultivace <i>E. coli</i>	51
3.2.1.2. Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	51
3.2.1.3. Transformace buněk <i>E. coli</i> teplotním šokem	51
3.2.2. Práce s DNA	52
3.2.2.1. Izolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i> alkalickou lýzí	52
3.2.2.2. Izolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i> pomocí komerční soupravy	52
3.2.2.3. Enzymatické úpravy DNA	53
3.2.2.4. Elektroforéza DNA v agarosovém gelu	54
3.2.2.5. Izolace DNA z agarosového gelu	54
3.2.2.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a příprava bodových mutací	54
3.2.2.7. Sekvenování DNA	55
3.2.3. Práce s proteiny	55
3.2.3.1. Heterologní exprese proteinů	55
3.2.3.2. Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)	56
3.2.3.3. Purifikace proteinů	57
3.2.3.4. Příprava dimeru MPP	59
3.2.3.5. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové	59
3.2.3.6. Stanovení aktivity forem MPP obsahující reportérovou α -MPP	60
3.2.3.7. Stanovení stability forem MPP obsahující reportérovou α -MPP	60
3.2.3.8. Nativní elektroforéza (Blue-Native PAGE)	60
3.2.4. Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie	61
4. Výsledky	62
4.1 Záměna tryptofanového zbytku v pozici 223 v α -MPP	62
4.1.1. Příprava klonovacího vektoru pJA2	64

4.1.2. Amplifikace sekvencí s bodovými záměnami	64
4.1.3. Přenos mutovaného úseku kazety do expresního vektoru pPA2	69
4.2. Příprava konstruktů kódujícího reportérovou α -MPP	70
4.3. Příprava proteinů α -MPP, β -MPP a substrátů.....	72
4.3.1. Nadprodukce a purifikace α -MPP	72
4.3.2. Nadprodukce β -MPP, spojení podjednotek a purifikace dimeru	74
4.3.3. Ověření aktivity dimeru MPP se substráty.....	75
4.4. Podrobný test aktivity dimeru MPP se třemi substráty.....	75
4.5. Měření časově rozlišené fluorescence reportérového tryptofanového zbytku	79
4.5.1. Zjištění stability proteinu pomocí nativní elektroforézy	79
4.5.2. Optimalizace podmínek pro měření časově rozlišené fluorescence	81
4.6. Zabudování analogu tryptofanového zbytku do reportérové pozice v α -MPP	85
4.6.1. Kultivace auxotrofního kmene <i>E. coli</i> s 5-hydroxy-tryptofanem	86
4.6.1.1. Záměna rezistenční kazety ve vektoru pPA3W289 a pPA3W299.....	86
4.6.1.2. Nadprodukce α -MPP s 5-hydroxy-tryptofanovým zbytkem.....	87
4.6.2. Kultivace auxotrofního kmene <i>E. coli</i> s 5-fluoro-tryptofanem.....	88
5. Diskuze.....	90
6. Souhrn	96
7. Seznam literatury	98

Seznam zkratek

A	amino acid alanine	aminokyselina alanin
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BHP	<i>Bacillus halodurans</i> protease	proteasa z <i>Bacillus halodurans</i>
COX IV	yeast mitochondrial cytochrome oxidase <i>c</i> subunit IV	podjednotka IV kvasinkové mitochondriální cytochromoxidasy <i>c</i>
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
E	amino acid glutamic acid	aminokyselina glutamová kyselina
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
Hsp60	heat shock protein	protein teplotního šoku (chaperon, 60kDa)
Hsp70	heat shock protein	protein teplotního šoku (chaperon, 70kDa)
Hsp90	heat shock protein	protein teplotního šoku (chaperon, 90kDa)
I	amino acid isoleucine	aminokyselina isoleucin
Icp55	intermediate cleaving peptidase	„intermediate“ štěpící peptidasa
IMP	inner membrane peptidase	vnitřní membránová peptidasa
L	amino acid leucine	aminokyselina leucin
MIP	mitochondrial intermediate peptidase	mitochondriální „intermediate“ peptidasa
MPP	mitochondrial processing peptidase	mitochondriální procesující peptidasa

MTS	mitochondrial targeting sequence	sekvence směřující protein do mitochondrie
NMR	nuclear magnetic resonance	jaderná magnetická resonance
PCR	polymerase chain reaction	polymerasová řetězová reakce
pADX	adrenodoxin prekursor	prekurzor adrenodoxinu
pMDH	malate dehydrogenase prekursor	prekurzor malátdehydrogenasy
PreP	presequence protease	proteasa presekvencí
R	amino acid arginine	aminokyselina arginin
RPP	rickettsial putative protease	hypotetická proteasa z <i>Rickettsia</i>
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
V	amino acid valine	aminokyselina valin
Y	amino acid tyrosine	aminokyselina tyrosin

Zkratky pro použité chemikálie jsou uvedeny v kapitole „Materiál a metody“.

1. Úvod

Mitochondriální procesující peptidasa (MPP) hraje zásadní úlohu v biogenezi mitochondrií a delece tohoto enzymu je letální. Dokladem je i to, že žádná z lidských dědičných poruch neobsahuje mutovanou MPP. Na druhou stranu řada lidských chorob je spjata s defekty proteolytických úprav mitochondriálních proteinů, které jsou způsobeny mutacemi v presekvenčních prekurzorů proteinů. Jedná se např. o hereditární splastickou paraplegii (PATEL *et al.* 2001) a onemocnění Hallervorden-Spatz (neurodegenerace s akumulací železa) (KOTZBAUER *et al.* 2005).

Jaderně kódované prekurzory proteinů určené do mitochondrie většinou obsahují na svém N-konci odštěpitelnou presekvenční. Funkcí MPP je rozpoznat a odštěpit široké spektrum presekvenčních prekurzorů proteinů lišících se délkou i primární sekvencí aminokyselinových zbytků. Protože je primární struktura presekvenčních velmi různorodá, předpokládá se, že zásadní úlohu v rozpoznání substrátu hraje sekundární struktura presekvenční. Jedna forma sekundární struktury se uplatňuje během translokace přes membrány mitochondrie a při primárním kontaktu MPP se substrátem a naopak jiná forma je během vazby presekvenční do centrální dutiny enzymu.

Enzym MPP je aktivní pouze v dimeru a skládá se z katalytické β -podjednotky (β -MPP) a z α -podjednotky (α -MPP), jejíž funkce je nejspíše v rozeznání substrátu a v nasměrování presekvenční do aktivního centra. Na této podjednotce se vyskytuje vysoce konzervovaná smyčka bohatá na glyciny (GRL – glycine-rich loop). Předpokládá se, že primární kontakt substrátu s MPP vyvolá konformační změny právě v oblasti glycinové smyčky.

Konformační změny GRL lze sledovat metodou časově rozlišené fluorescenční spektroskopie, kdy je do určité pozice v GRL zaveden reportérový tryptofanový zbytek, jehož lokální dynamika je sledována. Aby bylo možné získat vypovídající data, je optimální mít k dispozici protein α -MPP bez přirozeně se vyskytujících tryptofanových zbytků. Nativní α -MPP ze *S. cerevisiae* obsahuje tři tryptofanové zbytky v pozicích 147, 223 a 481. Doposud se kolegům z naší laboratoře podařilo zaměnit dva z nich, avšak záměna tryptofanového zbytku v pozici 223 vedla k produkci nefunkčního nerozpustného proteinu (JANATA *et al.* 2004).

Cílem této diplomové práce bylo:

1. Připravit konstrukt kódující α -MPP ze *S. cerevisiae* se zaměněným tryptofanovým zbytkem v pozici 223.
2. Zavést reportérový tryptofanový zbytek do určité pozice v GRL α -MPP, která obsahuje zaměněné všechny tři přirozeně se vyskytující tryptofanové zbytky.
3. Ověřit aktivitu a stabilitu dimeru MPP obsahujícího α -MPP s jediným tryptofanovým zbytkem v reportérové pozici a porovnat jeho aktivitu s MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*.
4. Metodou časově rozlišené fluorescenční spektroskopie sledovat lokální dynamiku reportérového tryptofanového zbytku v GRL α -MPP.
5. Zabudovat analog tryptofanového zbytku do α -MPP pro následnou možnost měření tryptofanové fluorescence MPP v dimeru.

2. Přehled literatury

2.1. Vývoj organel mitochondriálního typu

2.1.1. Mitochondrie

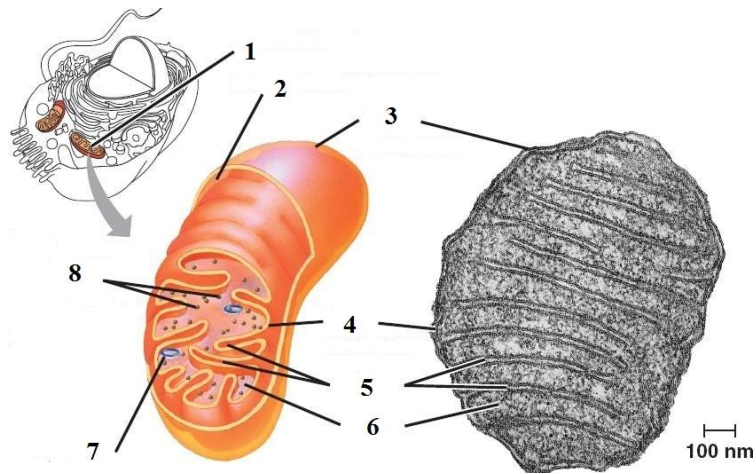
Vznik mitochondrie vysvětluje obecně přijímaná endosymbiotická teorie (ALCOCK *et al.* 2010; GRAY 1989; GROSS a BHATTACHARYA 2009, 2011; YANG *et al.* 1985), která předpokládá pohlcení aerobní α -proteobakterie blízké *Rickettsia prowazekii* hostitelskou anaerobní buňkou. Dodnes však není zcela jasné, zda tato hostitelská buňka patřila do skupiny archaeobakterie, nebo zda se již jednalo o primitivní formu eukaryotické buňky. Endosymbiotický prapředek přesunul značnou část své genetické informace do jádra (ADAMS a PALMER 2003; GROSS a BHATTACHARYA 2009; TIMMIS *et al.* 2004) a přestal být plně nezávislým organismem (DYALL *et al.* 2004). Většina mitochondriálních proteinů (> 90 %) je kódována jaderným genomem (GRAY *et al.* 2004). Mitochondriální genom kóduje méně než 70 proteinů (EMBLEY a MARTIN 2006) a pouze 8 proteinových komplexů je kódováno výlučně genomem kvasinkové mitochondrie.

Následkem tohoto přesunu je rozsáhlé zmenšení genomu, což odpovídá obecnému trendu endosymbiotických bakterií (MORAN *et al.* 2009). Sekvenováním genomu *Rickettsia prowazekii* bylo zjištěno, že tato eubakterie je příbuznější mitochondrii než kterékoliv jiné prokaryota (BOLHUIS *et al.* 2000; ESSER *et al.* 2004). Mitochondrie obsahuje i některé jiné prvky typické pro G- bakterie, např. dvojitou membránu (EMBLEY a MARTIN 2006) nebo ribosomy prokaryotního typu (Obr. 2.1).

Vzhledem k tomu, že ke správné funkci mitochondrie je potřeba i jaderně kódovaných proteinů, bylo nezbytné, aby během evoluce vznikl systém importující prekurzory proteinů do mitochondrie (GROSS a BHATTACHARYA 2011; LITHGOW a SCHNEIDER 2010). V současnosti se však vede debata o tom, zda za vývojem třídících mechanismů proteinů v mitochondrii stojí endosymbiont nebo hostitelská buňka (ALCOCK *et al.* 2010; GROSS a BHATTACHARYA 2011).

Mitochondrie nebo od mitochondrie odvozené organely jsou důležitou součástí eukaryotické buňky. Významnou funkcí mitochondrie je tvorba energie ve formě ATP pomocí oxidativní fosforylace (LITHGOW a SCHNEIDER 2010; RITZ a BERRUT 2005). Přestože většina mitochondriálního proteomu slouží přímo nebo nepřímo pro

účely oxidativní fosforylace, tato metabolická aktivita není nepostradatelnou funkcí pro všechny organismy; např. mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* nebo krevní forma *Trypanosoma brucei* může žít i bez oxidativní fosforylace. Přesto však mitochondrie vyžadují (LITHGOW a SCHNEIDER 2010). Tyto orgány jsou totiž jediným místem pro biogenezi Fe-S center, esenciálních kofaktorů mitochondriálních a cytosolických proteinů (LILL a MUHLENHOFF 2008). Mitochondrie mimo jiné hrají roli při biosyntéze hemu a homeostázi Ca^{2+} .



Obr. 2.1: Struktura mitochondrie. 1 – mitochondrie, 2 – mezimembránový prostor, 3 – vnější membrána, 4 – vnitřní membrána, 5 – kristy, 6 – matrix, 7 – mitochondriální DNA, 8 – volné ribosomy v mitochondriální matrix.

(Převzato z <http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch06/mitochondrion.html>).

2.1.2. Organely odvozené od mitochondrie

Organely odvozené od mitochondrie vznikly nejspíše jako důsledek adaptace na prostředí s nízkým obsahem kyslíku. Patří sem hydrogenosomy a mitosomy (EMBLEY a MARTIN 2006; LITHGOW a SCHNEIDER 2010). Tyto organely se vyskytují v různých organismech patřících do evolučně vzdálených skupin a žijících v anaerobním prostředí (HACKSTEIN *et al.* 1999; HACKSTEIN *et al.* 2001); jedná se o hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis* (BRADLEY *et al.* 1997; SCHNEIDER *et al.* 2011) nebo mitosomy *Giardia intestinalis* (TOVAR *et al.* 2003). Dříve se předpokládalo, že tyto organely a mitochondrie mají sice stejného prokaryotického předka, nicméně se od linie vedoucí k tvorbě mitochondrie oddělily (BRADLEY *et al.* 1997; BROWN *et al.* 2007; GRAY *et al.* 2004). V dnešní době však převažuje teorie, že hydrogenosomy a mitosomy vznikly redukcí mitochondrie (EMBLEY a MARTIN 2006; SMID *et al.* 2008). Tyto organely vykazují spolu s mitochondriemi několik společných rysů, např. obsahují Hsp70, Hsp60 (CLARK a ROGER 1995), dvojitou membránu (DOLEZAL *et al.* 2005; LITHGOW a SCHNEIDER 2010) a konzervovaný (ale redukovaný) způsob transportu prekurzorů proteinů do organely (BOXMA *et al.* 2005; BRADLEY *et al.* 1997; VAN DER GIEZEN *et al.* 2002). Na druhou stranu se liší 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 do organely importovány. Některé enzymy (hydrogenasa, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktasa) jsou specifické pro hydrogenosomy a u mitochondrií se nevyskytují (MULLER 1997).

Evoluční příbuznost těchto organel s mitochondriemi se nedá stanovit na základě genetické informace, avšak pomocným vodítkem je fylogenetická analýza proteinů charakteristických pro tyto organely.

2.2. Transport proteinových prekurzorů z cytosolu do mitochondrie

Většina mitochondriálních proteinů je kódována v jádře (GAKH *et al.* 2002) a je syntetizována na cytosolických ribosomech (MODEL *et al.* 2002; ROISE *et al.* 1988) jako prekurzory proteinů obsahující na svém N-konci odštěpitelnou signální sekvenci směřující prekurzor do mitochondrie (MTS – mitochondrial targeting sequence). Některé prekurzory neobsahují N-terminální signální sekvenci ale místo toho sekvenci vnitřní, jak je tomu u prekurzorů proteinů vnější membrány (HARTL *et al.* 1989; HUANG *et al.* 2009; LITHGOW a SCHNEIDER 2010).

Pro import proteinů do mitochondrie slouží kotranslační a posttranslační transport. Vzhledem k tomu, že rozšířenějším je posttranslační transport (NEUPERT a HERRMANN 2007), budu se v následujícím textu zabývat právě tímto způsobem importu prekurzorů proteinů do mitochondrie.

Prekurzory proteinů se v cytosolu vyskytují v komplexu s chaperony (Hsp70 a Hsp90), které je stabilizují, zabraňují jejich agregaci či degradaci (YOUNG *et al.* 2003), a pomáhají prekurzorům proteinů udržovat optimální konformaci potřebnou pro translokaci přes membrány do mitochondrie (MIHARA a OMURA 1996).

2.2.1. Translokace prekurzorů proteinů do matrix

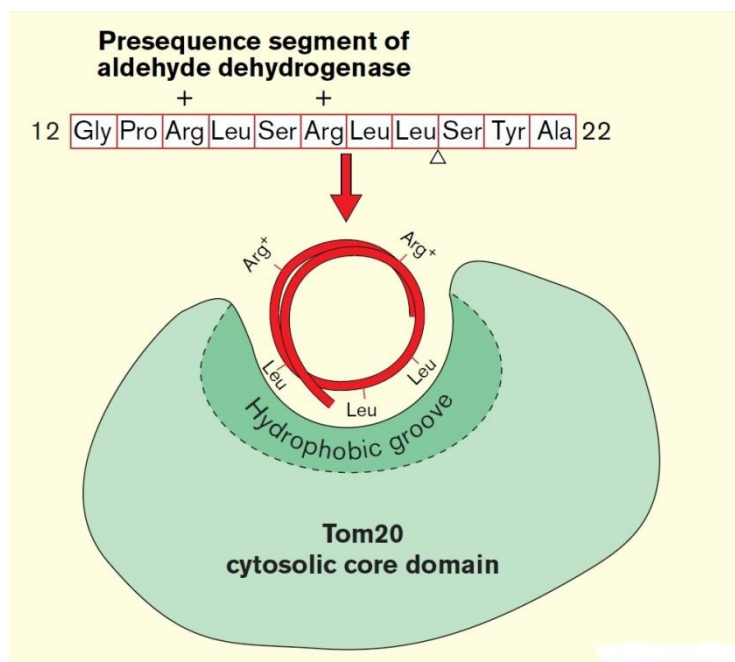
Translokaci prekurzorů proteinů do mitochondrie zprostředkovávají dva transportní komplexy (LITHGOW a SCHNEIDER 2010; NEUPERT a HERRMANN 2007) – TOM komplex (translocase of the outer mitochondrial membrane), uložený ve vnější mitochondriální membráně, a TIM komplex (translocase of the inner mitochondrial membrane) ve vnitřní mitochondriální membráně. Studie ukázaly, že významná část těchto importních komplexů je u eukaryot konzervovaná (DOLEZAL *et al.* 2006; IWAHASHI *et al.* 1997). Jako příklad udejme, že lidský a krysí Tom20 protein vykazuje celkovou 30% identitu s kvasinkovým Tom20 proteinem a může nahradit defektní kvasinkový Tom20 protein (IWAHASHI *et al.* 1997). Evoluční původ transportních komplexů není zatím objasněn (DELAGE *et al.* 2011); u bakterií není známa žádná proteinová translokasa, která by dala vzniknout TOM a TIM komplexům. Pro bakterie totiž není běžné, že by importovaly proteiny přes vnější a vnitřní membrány (LITHGOW a SCHNEIDER 2010).

Funkcí komplexu translokas ve vnější mitochondriální membráně je rozpoznání a translokace prekurzorů proteinů přes vnější membránu, popř. inserce proteinů určených do vnější membrány (KUNKELE *et al.* 1998). TOM komplex se skládá z receptorů a pórových proteinů tvořících importní kanál (NEUPERT a HERRMANN 2007).

Hlavními receptory jsou Tom20 a Tom70. Oba proteiny jsou u živočichů a hub ukotveny svou N-terminální částí ve vnější membráně a do cytosolu vystavují hydrofobní domény (ABE *et al.* 2000; RIMMER *et al.* 2011). Oba tyto receptory se částečně mohou ve své funkci nahradit, ale každý z nich primárně rozpoznává jiný substrát. Tom70 slouží jako receptor především pro hydrofobní prekurzory proteinů s interní signální sekvencí (MODEL *et al.* 2002; YAMANO *et al.* 2008), zatímco Tom20 receptor rozpoznává N-terminální presekvence (ABE *et al.* 2000).

Protože TOM proteiny obsahují také negativně nabitě oblasti, předpokládalo se, že pro vazbu na TOM receptory a pro úspěšný přenos presekvence do mitochondrie je důležitá interakce TOM receptorů s kladně nabitými částmi presekvenčí (PFANNER 2000). Kladně nabitě části presekvenčí se uplatní v dalších krocích translokace, ale pro vazbu na Tom20 receptor jsou to především hydrofobní interakce, které slouží k rozpoznání prekurzorů proteinů (BRIX *et al.* 1997). Na Obr. 2.2 je vidět, jakým způsobem je presekvence prekurzorů proteinů navázána do žlábků Tom20 receptoru: C-terminální část presekvence aldehyddehydrogenasy se do žlábků váže ve formě amfifilního α -helixu, kde jsou tři leuciny (silně hydrofobní aminokyseliny) orientovány směrem k hydrofobní části žlábků. Hydrofilní zbytky helixu směřují do vodného roztoku (PFANNER 2000).

Přestože neexistuje jednoduché pravidlo, které by určilo, jak má presekvence směřující prekurzor proteinu do mitochondrie vypadat, je možné nasměrovat i nemitochondriální protein až do matrix mitochondrie, pokud obsahuje N-terminální, bazickou, amfifilní a helikální sekvenci (LEMIRE *et al.* 1989). Stejná presekvence prekurzoru proteinu může sloužit jako MTS pro směrování proteinů do všech tří organel, tj. mitochondrií, hydrogenosomů i mitosomů (DOLEZAL *et al.* 2005).

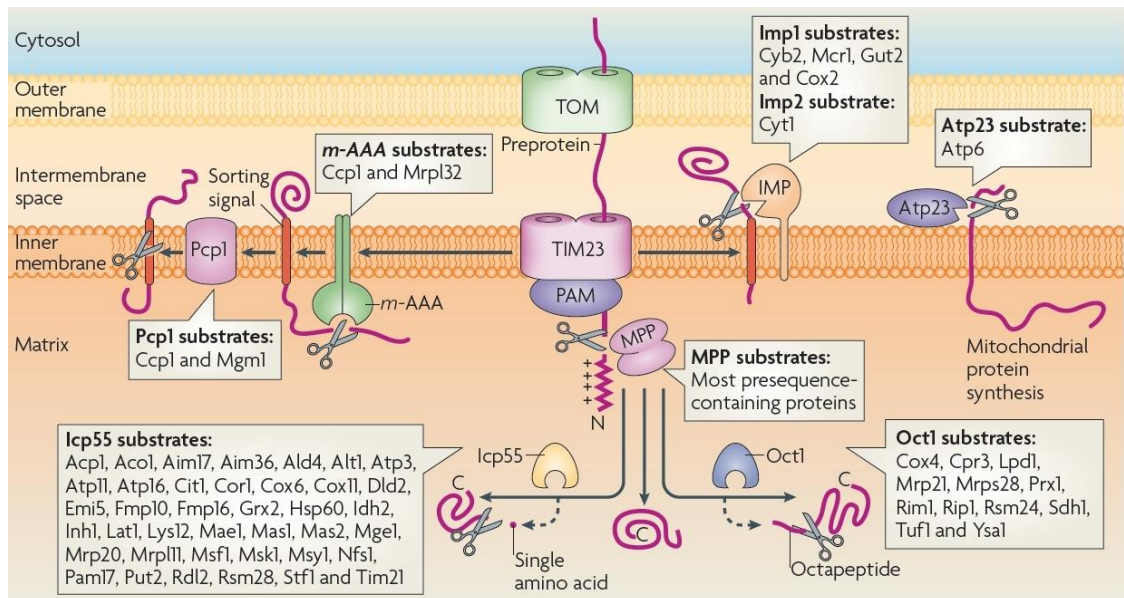


Obr. 2.2: Interakce mitochondriální presekvence s hydrofobním vazebným žlábkem importního receptoru Tom20 (použita a upravena NMR struktura stanovená Abe *et al.*, 2000). C-terminální polovina presekvence aldehyddehydrogenasy se váže na Tom20 receptor ve formě amfifilního α -helixu (trojúhelník u sekvence aminokyselin znázorňuje rozhraní mezi presekvencí a maturovaným proteinem). Hydrofobní vazebný žlábek Tom20 receptoru interaguje se třemi leucinovými zbytky presekvence, zatímco nabitě a hydrofilní aminokyselinové zbytky presekvence jsou vystaveny do vodného prostředí. (Převzato z Pfanner 2000).

Poté, co je prekurzor proteinu translokován do matrix, je jeho presekvence odštěpena (Obr. 2.3) především čtyřmi peptidasami (GAKH *et al.* 2002). Mitochondriální procesující peptidasa (MPP) štěpí většinu mitochondriálních prekurzorů proteinů (OSHIMA *et al.* 2005), a to jak těch, které zůstávají v matrix, tak těch, které obsahují další třídící sekvenci. Vnitřní membránová peptidasa (IMP – inner membrane peptidase) štěpí signál směřující prekurzor proteinu do mezimembránového prostoru poté, co byl pomocí MPP odštěpen signál směřující prekurzor proteinu do matrix. Mitochondriální „intermediate“ peptidasa (MIP – mitochondrial intermediate peptidase) je nutná, obsahuje-li presekvence tzv. oktapeptidový signál, který vyžaduje dvě štěpení, tj. enzymem MPP i MIP. Mezi takové proteiny patří především proteiny směřované do vnitřní membrány, ale i některé matrixové proteiny.

Nově objevená Icp55 peptidasa (intermediate cleaving peptidase) (NAAMATI *et al.* 2009; SCHMIDT *et al.* 2010; TEIXEIRA a GLASER 2012), následně upravující protein po štěpení MPP, odštěpuje N-koncovou aminokyselinu (nejčastěji L, F, Y), která má destabilizující účinek na maturovaný protein.

Po odštěpení presekvence je protein schopen zaujmout svou nativní konformaci v matrix mitochondrie, membránách nebo jiných mitochondriálních subkompartmentech (NEUPERT a HERRMANN 2007).



Obr. 2.3: Proteolytické úpravy prekurzorů mitochondriálních proteinů. Presekvence proteinů je odštěpena pomocí mitochondriální procesující peptidasy (MPP), která odštěpuje pozitivně nabitě MTS většiny proteinů. Některé proteasy, např. membránově vázaná vnitřní membránová peptidasa (IMP), mohou provést další štěpení signální sekvence. Takovéto proteasy štěpí uvnitř nebo za hydrofobním třídícím signálem. V matrixu mitochondrie může dojít k dalšímu procesujícímu kroku pomocí „intermediate“ štěpící peptidasy (Icp55), která odstraňuje jeden aminokyselinový zbytek, nebo pomocí mitochondriální „intermediate“ peptidasy (Oct1), která odstraňuje oktapeptidový signál. Ačkoliv je Icp55 nejnovější identifikovanou peptidasou, dlouhý seznam jejích substrátů ukazuje na její důležitost v proteolytických úpravách prekurzorů mitochondriálních proteinů. (Převzato z Schmidt *et al.* 2010).

2.2.2. Charakteristické prvky presekvenčí prekurzorů proteinů

2.2.2.1. Primární struktura

Primární sekvence presekvenčí bývá velmi různorodá, dokonce i u příbuzných ortologů. Délka presekvenče se u kvasinky pohybuje mezi 6 – 122 aminokyselinovými zbytky. Většina proteinů (~ 70 %) však obsahuje presekvenče o délce mezi 20 a 70 aminokyselinovými zbytky (HUANG *et al.* 2009). Odštěpitelné presekvenče typicky obsahují kladně nabitě aminokyselinové zbytky na N-konci, 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 je přítomnost proximálního argininového zbytku v pozici -2 od místa štěpení (tzv. R-2 motiv) z pohledu štěpení MPP (KITADA *et al.* 2003). Z pohledu maturovaného proteinu následně upraveného dalšími enzymy (MIP, Icp55) je štěpené místo MPP v pozici -2, -3 popř. -10 od N-konce výsledného proteinu (Obr. 2.4). Přestože R-2 motiv u presekvenčí převažuje, ve vzácných případech dochází ke štěpení i bez přítomnosti argininového zbytku v pozici -2 (Obr. 2.4).

Pro efektivní štěpení jsou také důležité (avšak ne nutné) vzdálené bazické aminokyseliny (ITO 1999), 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). Délka mezi proximálním argininem a distálním bazickým zbytkem není fixní; pohybuje se mezi 4 – 10 aminokyselinovými zbytky (KOJIMA *et al.* 2001; OGISHIMA *et al.* 1995).

Přesto je primární struktura presekvenčí velmi odlišná a tento fakt způsobuje obtíže při snaze predikovat štěpená místa prekurzorů proteinů. Pomocí cílené mutageneze bylo dokázáno, že arginin v pozici -2 hraje důležitou, ale ne nutně nepostradatelnou úlohu pro štěpení pomocí MPP, je však nutný pro rozeznání substrátu (KOJIMA *et al.* 2001).

R-2 motiv		MPP	Icp55
HMUT (A59145)	MLRAKNQLFLLSPHYLRQVKESGSRLIQQ	L	LHQQ..
HPDHE3 (P09622)	MQSWSRVYCSLAKRGHFNRIHGLQGLSAVPL	T	YADQP..
MAAT (J02622)	MALLHSGRVLSGVASAFHPGLAAAASA	A	SSWW..
RSCSA (J03621)	MVSGSSGLAAARLLSRTFLLQQNGI	H	GSYT..
YCOX8 (P04039)	MLCQQMIRTTAKRSSNIMTRPIIMK	S	VHFK..
YDHA7 (P46367)	MFSRSTLCLKTSASSIGRLQL	Y	FSHLP..
YIDH1 (P28834)	MLNRTIAK	T	LATAA..
YRMO2 (P12689)	MWNPILLDTSSFSFQKHVSGVFLQV	N	ATKR..

		MPP	MIP	
HOTC (K02100)	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMV	N	FRCGQPLQ	NKVQ..
MMDH (M16229)	MLSALARPVGAALR	S	FSTSAQNN	AKVA..
NCPB (P10255)	MFGPRHFVSLKTTGSLVSSTFSSSLKPTATFSCA	A	FSQTSSIM	SKVF..
YAT14 (Q12349)	MFPIASRRILLNASVLPRLCN	N	FTTTRISY	NVIQ..
YCOXIV (P04037)	MLSLRQSIRFFKPAT	T	LCSSRYLL	QQKP..
YDLDH (P09624)	MLRIRLLNNA	A	FSSTVRTL	TINK..
YFe/S (P08067)	MLGIRSSVKTCFKPMSLTSK	L	ISQLLAS	KSTY..
YRM07 (P36519)	MQRFSLVTH	S	FSHSCVKP	KSAC..

bez R-2 motivu		
BMPC (X05340)	..NAPHLQLVHDGLAGPRSDPAGPPGPPRRSRNLAAA	AVEE..
HFOA (M16453)	..GALRRLTPSAALPPAQLLLRAVRRRSHPVRYAAQ	TSPS..
NATP2 (P17614)	..GLISRSLGNSIPKSASRASSRASPKGFLNRAVQY	ATSA..
PCS (P00889)	MALLTAAARLFGAKNASCLVLAARHAS	ASST..
YATP6 (P00854)	MFNLLNTYIT	SPLD..
YADH3 (P07246)	MLRTSTLFTQRVQPSLFSRNILRLQST	AAIP..
YDHA1 (P22281)	MLATRNLVPIIRASIKWRIKL	SALH..

Obr. 2.4: Štěpené motivy presekvencí rozeznávané MPP, MIP a Icp55. (Převzato včetně použitých zkratk proteinů a upraveno z Gakh *et al.* 2002).

2.2.2.2. Sekundární struktura

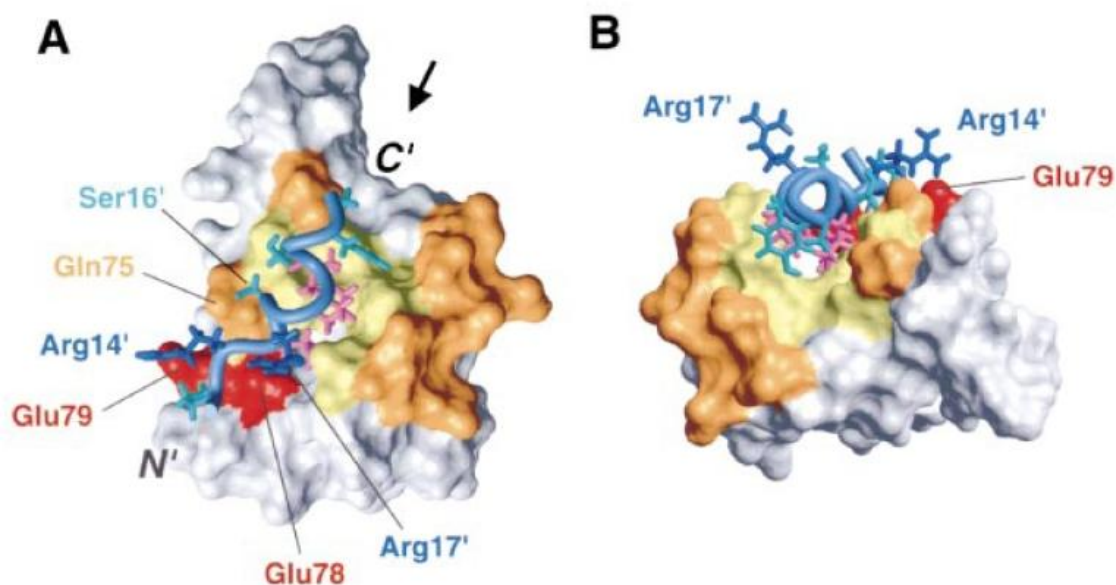
Presekvence jsou schopné zaujmout jak rozvinutou konformaci, která je nutná pro navázání substrátu do aktivní dutiny MPP, tak amfifilní α -šroubovici (Obr. 2.5) nutnou pro vazbu na Tom20 receptor (TAYLOR *et al.* 2001). Nukleární magnetická rezonance (NMR – nuclear magnetic resonance) ukázala, že při transportu tvoří N-koncová oblast presekvence substrátu COX IV (podjednotka IV kvasinkové mitochondriální cytochromoxidasy) α -helikální strukturu, zatímco C-koncová oblast nevykazuje pravidelnou sekundární strukturu v prostředí micel (ENDO *et al.* 1989).

HUANG a kol. (2009) zjistili, že 71 % presekvenčí tvoří v kvasinkách α -šroubovici pouze v rámci prvních 10 aminokyselin, což je méně než např. u presekvenčí z *Arabidopsis* nebo rýže. Na druhou stranu jsou domény obsahující β -listy u kvasinek mnohem častější (HUANG *et al.* 2009).

Šroubovice je tedy krátká (ne více než tři otáčky) a u dlouhých presekvenčí bývá přerušena krátkým linkerem obsahujícím glycinové a/nebo prolinové zbytky mezi proximálním a distálním argininem (OGISHIMA *et al.* 1995; THORNTON *et al.* 1993).

Důležitá je jistá forma nestability. Stabilní helikální struktura neumožňuje vazbu do aktivního místa enzymu (THORNTON *et al.* 1993). Takováto pevná helikální struktura funguje jako kompetitivní inhibitor enzymu.

Dostupné výsledky vedou k závěru, že pro vazbu presekvenče není ani tak důležitá primární sekvence aminokyselin jako její sekundární struktura, kterou MPP rozeznává, uplatňující se též při transportu (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010).

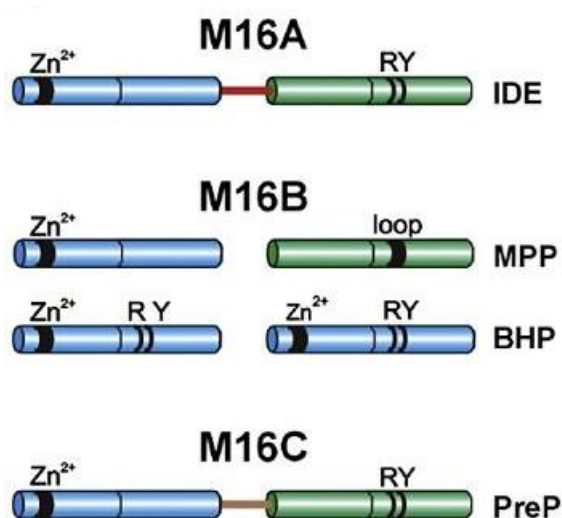


Obr. 2.5: Vazebný žlábek Tom20 receptoru s navázanou presekvenčí prekurzoru proteinu. A – část povrchu molekuly Tom20 receptoru obsahující hydrofobní místa, která se účastní vazby substrátu, jsou zobrazena barevně. Navázaný prekurzor proteinu tvoří amfifilní α -šroubovici. Hydrofobní zbytky směřují do žlábků Tom20 a kladně nabitě zbytky (Arg14', Arg17') směrem ven do cytoplazmy. N' a C' je označení pro N-koncovou a C-koncovou část presekvenče. B – jiný pohled na stejnou strukturu. (Převzato z Abe *et al.* 2000).

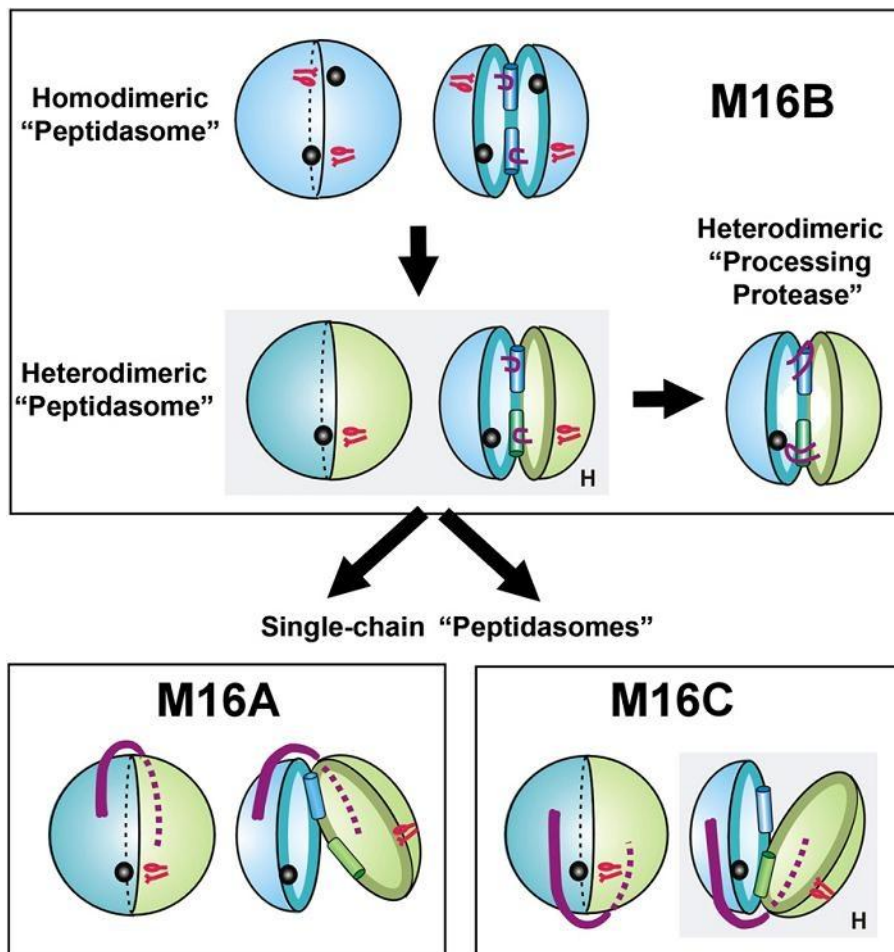
2.3. Metaloendopeptidasy z rodiny M16

Tato rodina peptidas obsahuje dvě odlišné podrodiny enzymů. Do pitrilysinové podrodiny (skupiny M16A a M16C) patří enzymy, které jsou také jinak nazývány peptidasomy (JOHNSON *et al.* 2006), protože jejich funkcí je degradovat různě dlouhé peptidy, tj. 30 – 70 aminokyselinových zbytků (ALESHIN *et al.* 2009). Enzymy této podrodiny jsou složeny z jednoho polypeptidového řetězce ze ~ 1000 aminokyselinových zbytků zahrnující dvě oblasti propojené dlouhým linkerem. V N-terminální doméně proteinu se vyskytuje katalytická oblast obsahující zinek-vázající motiv. C-terminální doména, která je také nutná pro aktivitu enzymu, obsahuje pro tuto rodinu typický R/Y motiv (Obr. 2.6).

Do druhé podrodiny (skupina M16B) patří procesující peptidasy a např. i některé bakteriální proteasy (RAWLINGS a BARRETT 1995). Tyto peptidasy se většinou skládají ze dvou podjednotek (každá je složena z ~ 500 aminokyselinových zbytků). C-terminální doména α -podjednotky eukaryotických procesujících peptidas na rozdíl od pitrilysinové rodiny postrádá R/Y motiv (ALESHIN *et al.* 2009). Místo tohoto motivu se v C-terminální doméně těchto peptidas vyskytuje glycinová smyčka, která dosahuje do aktivního místa enzymu a zabraňuje úplnému uzavření obou částí enzymu; proto dimer zůstává stále v částečně otevřené konformaci (Obr. 2.7). U prokaryotických členů této rodiny je GRL přítomna, ale je značně zkrácena.



Obr. 2.6: Organizace domén M16 peptidas. Hlavními znaky jsou: invertovaný Zn^{2+} vázající motiv (HXXEH), peptidasomový motiv (R/Y) nebo motiv procesující peptidasy (dlouhá glycinová smyčka). (Převzato z Aleshin *et al.* 2009).



Obr. 2.7: Model evoluce M16 peptidas. Všechny evoluční kroky uzavřených a otevřených konformací jsou znázorněny pomocí šipek. Důležitým krokem je vznik heterodimerních procesujících peptidasomů. Zinkové ionty jsou znázorněny jako černé kuličky; R/Y motivy jako červené tyčky; glycinové smyčky jako fialové smyčky. Zn^{2+} vázající podjednotky/domény jsou znázorněny modře; mezidoménový linker v M16A/C peptidasomech jako fialová stužka. Struktury postrádající experimentální ověření jsou označeny „H“; jedná se o prokaryotické heterodimery, jejichž modelovým příkladem je BHP. (Převzato z Aleshin *et al.* 2009).

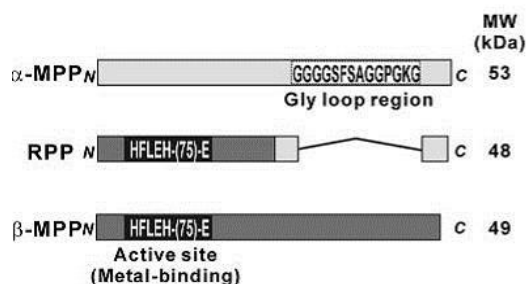
2.3.1. M16B skupina

Do této skupiny metalopeptidas patří např. MPP, core I a II proteiny *bc₁* komplexu, RPP (rickettsial putative protease) z *Rickettsia prowazekii*, (RAWLINGS *et al.* 2004), BHP (*Bacillus halodurans* protease), TTHA1264 a TTHA1265 z *T. thermophilus* a SPH2681/SPH2682 ze *Sphingomonas* sp.

2.3.1.1. RPP – hypotetická proteasa z *Rickettsia*

Tato proteasa z bakterie *Rickettsia prowazekii*, intracelulárního parazita, je vysoce podobná mitochondriálním procesujícím peptidasám (ANDERSSON *et al.* 1998). Odpovídající geny RPP byly nalezeny i u dalších zástupců skupiny Rickettsiales a jsou velmi konzervované. RPP enzymy z *R. prowazekii*, *R. typhi* a *R. conorii* byly porovnány s podjednotkami MPP a zjistilo se, že některé jsou geneticky podobné α -MPP a jiné β -MPP. Podobně jako β -MPP, RPP obsahuje ve své N-terminální doméně zinek vázající motiv (KITADA *et al.* 2007). Na druhou stranu, GRL, která je typická pro C-terminální doménu α -MPP, z velké části u RPP chybí. Přesto je C-terminální doména RPP podobná spíše α -MPP (Obr. 2.8).

Zdá se, že RPP mající rysy α - i β -MPP reflektuje dvojí funkci enzymu, tj. katalytickou i rozpoznávací.



Obr. 2.8: Schematické diagramy primární struktury podjednotek MPP ze *S. cerevisiae* a RPP. Světlé oblasti označují α -MPP a její homologní oblasti v RPP a tmavě šedé oblasti označují β -MPP a její homologní oblasti v RPP. (Převzato z Kitada *et al.* 2007).

KITADA a kol. (2007) purifikovali RPP z *R. typhi* a zjistili, že molekulová hmotnost RPP je zhruba 50 kDa, což odpovídá velikosti jedné podjednotky MPP. Předpokládá se tedy, že RPP funguje jako monomer.

RPP rozpoznává převážně bazické peptidy, zatímco kyselé a neutrální peptidy neštěpí. RPP peptidy většinou štěpí před hydrofobním aminokyselinovým zbytkem a v některých případech vedle bazického aminokyselinového zbytku (KITADA *et al.* 2007). Při pokusech odštěpit pomocí RPP některé mitochondriální presekvence byl použit prekurzor kvasinkové malátdehydrogenasy (pMDH) s presekvenčí dlouhou 9 aminokyselinových zbytků. Zjistilo se, že ačkoliv s nižší aktivitou, RPP odštěpuje prekurzor ve stejném místě jako MPP. RPP odštěpila i další presekvence různé (avšak vždy krátké) délky z různých organismů. (KITADA *et al.* 2007).

Při snaze štěpit myší pMDH (délka presekvence je 17 aminokyselinových zbytků) a hovězí pADX (délka presekvence je 58 aminokyselinových zbytků), se samotné RPP nepodařilo odštěpit ani jednu ze zmíněných presekvenčí. Je ovšem zajímavé, že při stechiometrické směsi RPP a β -MPP (RPP- β -MPP) byl tento dimer

úspěšný při odštěpení myší presekvence pMDH, ale nepodařilo se mu odštěpit hovězí presekvenční pADX (KITADA *et al.* 2007). Dimer α -MPP-RPP nedokázal odštěpit ani jednu z výše zmíněných presekvenčních. RPP sice odštěpuje některé presekvenční jako monomer, avšak v případě odštěpení myší pMDH měla tato proteasa regulační funkci pro katalytickou β -MPP. Vzhledem k tomu, že dimer RPP- β -MPP nedokázal odštěpit 58 aminokyselinových zbytků dlouhou presekvenční u pADX, tento fakt podporuje předpoklad, že GRL, která není v RPP přítomna, je nutná pro odštěpení dlouhých presekvenčních.

Přestože je RPP exprimována v buňkách skupiny Rickettsiales, její funkce *in vivo* ani její fyziologický substrát nejsou zatím zřejmé (KITADA *et al.* 2007). Její funkce v buňkách může být ale předpokládána na základě funkce produktu genu *ymxG* *Bacillus subtilis*, kde se jedná o proteasu z rodiny M16, která je vysoce homologní s MPP a má vysokou hodnotu podobnosti (~ 60 %) s RPP a MPP-podobnými proteiny z *Mycobacterium leprae* a *Mycobacterium tuberculosis* (BOLHUIS *et al.* 2000). **YmxG** hraje roli při negativní regulaci exprese *aprE* genu (subtilisin), což je hlavní extracelulární serinová proteasa *B. subtilis*. Je možné, že i RPP funguje jako regulátor proteinové exprese pomocí proteasové aktivity (KITADA *et al.* 2007).

ALESHIN a kol. (2009) předpokládají, že evoluční cesta ke vzniku heterodimerní MPP začíná u proteinů podobných RPP či BHP, tj. u proteasy obsahující jak zinek-vázací motiv, tak zkrácenou verzi GRL a R/Y motiv na každé z podjednotek. Následným evolučním krokem byla ztráta zinek-vázacího motivu na jedné z podjednotek (např. produkt genu *BH2393* *B. halodurans* nemající peptidasovou aktivitu) a ztráta R/Y motivu na druhé (např. produkt genu *BH2392* *B. halodurans*). Podobným příkladem je i protein **TTHA1264** z *T. thermophilus* (OHTSUKA *et al.* 2009), který se v roztoku vyskytuje jako monomer a postrádá R/Y motiv, tudíž i vnitřní proteasovou aktivitu (Obr. 2.9). Aby tento protein mohl být aktivní, je nutné vytvořit heterodimer. Podle ALESHIN a kol. (2009) se vhodným kandidátem v tomto případě jeví produkt přílehlého genu **TTHA1265**, který zase postrádá zinek-vázací motiv. Dalším příkladem bakteriálního heterodimerního typu proteasy je **SPH2681/SPH2682** ze *Sphingomonas* sp. (MARUYAMA *et al.* 2011). Dva heterodimery se v roztoku spojují do tetrameru. Komplex tvoří otevřenou a uzavřenou konformaci mezi dvěma heterodimery, kam se váže substrát. V C-koncové doméně podjednotky SPH2682 se

vyskytuje jak R/Y motiv, tak zkrácená verze glycinové smyčky, která ovšem neinteraguje se substrátem.

Původní monomerní proteasa, která nebyla v bakterii esenciální, byla během evoluce přenesena z endosymbionta do hostitelské buňky a stala se nepostradatelnou součástí symbiosy eukaryotické buňky a organely.

2.3.1.2. BHP – proteasa z *Bacillus halodurans*

Tato proteasa z bakterie *Bacillus halodurans* tvoří stabilní homodimer. Bez navázaného substrátu je v částečně otevřené konformaci (vlastnost typická pro peptidasy skupiny M16B), ale po navázání substrátu se dimer zcela uzavře, což je charakteristické pro proteasy pitrilysinové rodiny (ALESHIN *et al.* 2009). Každá z podjednotek obsahuje zinek vázající motiv a motiv R/Y, který byl popsán u PreP (presequence protease – proteasa presekvenčí) jako motiv nutný pro aktivitu enzymu. BHP ve své C-koncové doméně (Obr. 2.9) obsahuje zkrácenou verzi glycinové smyčky (ALESHIN *et al.* 2009).

GROUP/GENE	PRODUCT	$\alpha 1$	$\alpha 9$	G-rich loop	$\alpha 10$
		HHHHH	HHHHHHH	LLLLLLLLLLLLLLLLL	HHHHHHHHH
M16A	IDE	108 HFCEH 112 -> 332 591 NMAYL 595 -> 808	HYLGH LIGHEG----- LELFCQII-----	-----PGS	LLSELKSGWVNTL 359 SEPCFNTLRKEQLGY 831
M16C	PreP	134 HILEH 138 -> 377 652 PLFCQ 656 -> 831	GFLDHLCLGTP----- AYVISKHI-----	-----ASPLR	KILLESGLGEAL 404 SNTWLWDRVYVSGGA-Y 911
M16B.016	BHP	46 HFLEH 50 -> 254	LVL LNNVLGGS-----	-----MSS	RFLFQDI REKRGLCY 281
M16B.016	BHP	46 HFLEH 50 -> 254	LVL LNNVLGGS-----	-----MS	RFLFQDI REKRGLCY 281
M16B.014	BH2392	67 HFLEH 71 -> 278	INV LLELMFGQ-----	-----GS	KQYEQLDDEGLIND 308
M16B.UNB	BH2393	88 HIITI 92 -> 283	MQVMNGLFGGF-----	-----SHS	KLPINVRKEESLAY 310
M16B.UPB	TTHA1264	46 HFLEH 50 -> 255	GQVLAHLLGEE-----	-----GSR	RLHFALVDKGLAEV 282
M16B.UNB	TTHA1265	45 ALLEG 49 -> 251	ARLAL EVLGGG-----	-----MSS	RFLFQDI REKRGLVY 278
M16B	BC1-I	91 YFVEH 95 -> 289	LQVANAIIGHYDCTYGGGAHLS-	-SPLASIAATNKLQCSF	341
M16B	BC1-II	81 HLLRL 85 -> 286	FSVLQHVLGAGPHVKRGSN---	-ATS	SLYQAVAKGVHQPFF 321
M16B	MPP- β	70 HFLEH 74 -> 285	ALATQAIIVGNWDRAIGTGTN---	-SP	SPLAVAASQNGSLA 320
M16B	MPP- α	62 HILDR 66 -> 276	LATLQTL LGGGGSFSAGGPGKGMYSR	LYTHV LNLQYYFVE	314

Obr. 2.9: Charakteristické motivy peptidasomů a procesujících peptidas. Sekvenční fragmenty vybraných funkčních párů C- a N-terminálních domén. Ve všech případech (kromě homodimerní skupiny M16.016) C-terminální doména postrádá Zn-vázající motiv, ale všechny peptidasomy (M16A/C skupina a prokaryotické podrodiny M16B) obsahují ve své C-terminální doméně R/Y motiv. Eukaryotické M16B enzymy postrádají R/Y motiv, ale obsahují dlouhou glycinovou smyčku (červeně), která má analogickou funkci. Peptidasomy (kromě C-terminálních domén M16A/C skupiny) obsahují krátkou smyčku uloženou ve stejné pozici, která však není přímo zahrnuta v katalytické funkci. (Převzato z Aleshin *et al.* 2009).

2.4. Mitochondriální procesující peptidasa a její redukované formy

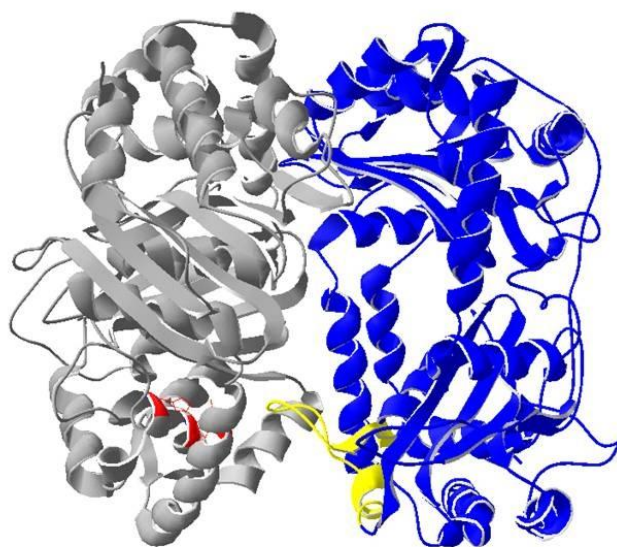
2.4.1. Struktura mitochondriální procesující peptidasy

MPP (~ 100 kDa) je složena ze dvou strukturně podobných, ale funkčně odlišných podjednotek, α -MPP a β -MPP (Obr. 2.10), vyskytujících se převážně v matrix mitochondrie. Celková sekvenční podobnost mezi podjednotkami MPP ze *Saccharomyces cerevisiae* je 48 %. Každá podjednotka kvasinkové MPP se skládá ze dvou topologicky velmi podobných domén (každá složena z ~ 210 aminokyselinových zbytků), které jsou spojeny linkerem složeným ze 16 zbytků u α -MPP a 22 zbytků u β -MPP (TAYLOR *et al.* 2001). MPP je aktivní pouze v dimeru, samostatné podjednotky jsou nefunkční (YANG *et al.* 1988). NAGAYAMA a OHMACHI (2010) jako první uveřejnili, že by aktivita MPP *Dictyostelia discoidea* mohla být v průběhu životního cyklu organismu konrolována pomocí neznámé proteasy přeměňující nefunkční α -MPP na funkční α -podjednotku odštěpením krátkého úseku na jejím N-konci. Tato N-koncová signální sekvence však neodpovídá typické MTS, proto není odštěpena pomocí MPP. Je však více než pravděpodobné, že tento specifický způsob regulace hladiny funkční α -MPP je typický pouze pro organismus *Dictyostelia discoidea*.

Evolučně konzervovaná MPP má vysoký stupeň identity mezi organismy, např. kvasinková α -podjednotka MPP má 43% identitu s α -MPP *N. crassa* (SCHNEIDER *et al.* 1990) a kvasinková β -MPP má 45 – 52% identitu s krysí a *N. crassa* β -podjednotkou (PACES *et al.* 1993).

Pro aktivitu MPP je nutná přítomnost dvojmocných iontů, především Co^{2+} , Mn^{2+} a Zn^{2+} (LUCIANO *et al.* 1998). Optimální pH pro aktivitu MPP je mezi 7 – 8 (MCADA a DOUGLAS 1982).

Trojrozměrná struktura kvasinkové MPP byla stanovena pomocí rentgenové strukturní analýzy a poskytla základ pro model rozpoznání MTS substrátu (TAYLOR *et al.* 2001).



Obr. 2.10: Krystalová struktura dimeru MPP ze *S. cerevisiae*. Šedivě je označena β -podjednotka, modře α -podjednotka, červeně katalytické místo a žlutě GRL. (Použito a upraveno z Taylor *et al.* 2001).

2.4.1.1. α -podjednotka

V této podjednotce MPP (52 – 57 kDa) se vyskytuje degenerovaná N-koncová katalytická doména, která potvrzuje evoluční původ z více konzervované β -MPP (GAKH *et al.* 2001). Předpokládá se, že α -MPP vznikla duplikací genu, ztratila katalytickou funkci a převzala nejspíše funkci rozpoznávací.

Důležitou součástí podjednotky je flexibilní mezidruhově konzervovaná GRL (Obr. 2.11), jejíž funkce je pravděpodobně v rozpoznání substrátu, 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).

2.4.1.2. β -podjednotka

Katalytickou funkci enzymu zajišťuje β -MPP (50 – 55 kDa). N-koncová doména β -MPP obsahuje dva vysoce konzervované úseky. První z nich tvoří amfifilní α -šroubovici s negativně nabitými zbytky na jedné straně. Další oblast, která je velmi konzervovaná a přítomná u všech β -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-x₇₆-E). Zn²⁺ ionty jsou koordinovány dvěma histidinovými zbytky a distální glutamovou kyselinou (Obr. 2.12). Proximální

glutamová kyselina umožňuje, aby se molekula vody vážala jako čtvrtý ligand na Zn^{2+} iont (AMATA *et al.* 2011; TAYLOR *et al.* 2001).

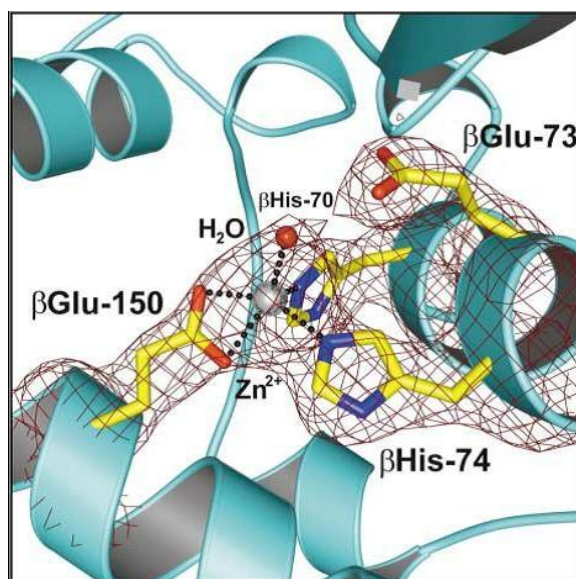
V	L	N	M	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	F	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>H. sapiens</i>
V	L	N	M	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	F	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>R. norvegicus</i>
V	L	N	M	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	F	S	R	L	Y	L	N	V	L	N	<i>M. musculus</i>
V	L	N	I	M	M	G	G	G	S	F	S	A	G	G	P	G	K	G	M	Y	S	R	L	Y	T	K	V	L	N	<i>D. 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	L	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. 2.11: Konzervované funkční domény α -MPP (GRL). Porovnání sekvencí bylo provedeno programem MegAlign 4.04 (Lasergene, DNASTAR). Konzervované aminokyselinové zbytky jsou na černém pozadí a oblast bohatá na glycinové zbytky je šedivá (Převzato z Gakh *et al.* 2002).

2.4.2. Mechanismus katalytické funkce

Mechanismus inzerce presekvence do aktivní dutiny je zatím neznámý, ale předpokládá se, že důležitou úlohu hraje GRL, díky níž se R-2 motiv presekvence dostane do blízkosti Zn^{2+} iontu, kde je jádro katalytického místa enzymu. Tato flexibilní smyčka se vyskytuje při vstupu do dutiny (ITO 1999; NAGAO *et al.* 2000; TAYLOR *et al.* 2001). Pokud je část GRL deletována, afinita pro substrát i katalytická aktivita enzymu jsou značně sníženy (NAGAO *et al.* 2000). ITO a kol. (1999) předpokládají, že pokud MPP postrádá část délky glycinové smyčky, „skulina“ vedoucí do aktivního místa enzymu je příliš úzká. Je tedy pravděpodobné, že GRL rozevívá „skulinu“ mezi podjednotkami a navádí presekvenci do blízkosti aktivního místa.

KITADA a kol. (2003) předpokládají, že během inzerce presekvence do dutiny MPP skenuje rozvinutý substrát vážající se do vazebné konstrukce od N-konce k C-konci a určí štěpené místo presekvence. V aktivní dutině enzymu interaguje krátký substrát především s β -MPP a N-koncová část peptidu téměř dosahuje k α -MPP. MPP se k presekvenci obsahující bazické aminokyselinové zbytky v aktivní dutině enzymu váže pomocí elektrostatických interakcí. Pro efektivní štěpení jsou vyžadovány proximální a distální bazické aminokyseliny na C-koncové části presekvence (KITADA *et al.* 2003).

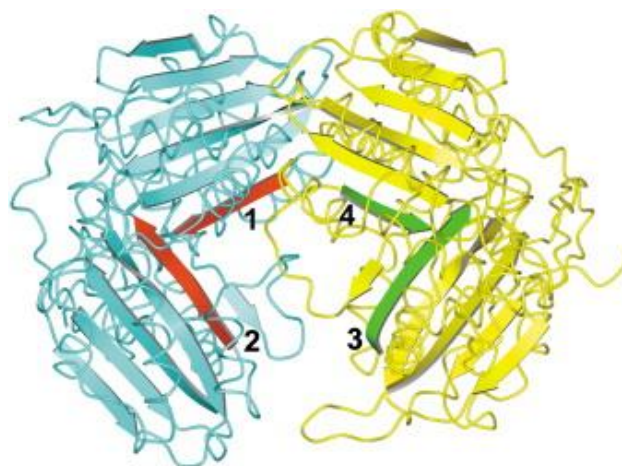


Obr. 2.12: Vazebné místo pro zinek vyskytující se v β -podjednotce MPP *S. cerevisiae*. β His-70 (histidin v pozici 70 na β -MPP), β His-74 (histidin v pozici 74 na β -MPP) spolu s distální β Glu 150 (kyselina glutamová v pozici 150 na β -MPP) koordinují umístění Zn^{2+} iontu. Proximální β Glu-73 (kyselina glutamová v pozici 73 na β -MPP) tvoří vodíkový můstek s molekulou H_2O , polarizuje jí a umožňuje molekule H_2O být čtvrtým ligandem na Zn^{2+} iont. (Převzato z Taylor *et al.* 2001).

Metodou FRET (fluorescence resonance energy transfer – přenos energie fluorescenční rezonancí) byla získána strukturní informace o vazbě substrátu na MPP. Zjistilo se, že část okolo štěpeného místa (proximální arginin) a distální arginin, vzdálený 4 až 10 aminokyselin od proximálního argininu, jsou lokalizovány ve specifických místech na MPP bez ohledu na pozici distálního argininu. Pokud je presekvence delší, utvoří se struktura smyčky (KOJIMA *et al.* 2001). Zatímco distální bazický zbytek nemusí být nutně arginin, je-li proximální arginin nahrazen jiným bazickým zbytkem, štěpení neproběhne. α -MPP rozeznává spíše vzdálenější aminokyselinové zbytky presekvencí od štěpeného místa (KOJIMA *et al.* 1998).

Předpokládanou vazbu substrátu do aktivní dutiny znázorňuje Obr. 2.13. Centrální dutina je tvořena čtyřmi β -listy; dva v každé podjednotce. Krátké substráty se váží ke dvěma β -listům v β -MPP pomocí vodíkových vazeb. Jeden z β -listů je umístěn poblíž aktivního místa a ten další je v C-doméně β -MPP. Druhé dva β -listy lokalizované na α -MPP slouží jako vazebné místo pro delší presekvence pro stabilizaci komplexu enzym-substrát.

Předpokládá se, že distální bazický aminokyselinový zbytek delší presekvence interaguje s kyselými aminokyselinovými zbytky α -podjednotky a aminokyselinový zbytek v pozici +4 interaguje s GRL (KOJIMA *et al.* 2001; NISHINO *et al.* 2007).



Obr. 2.13: Předpokládané uspořádání vazebné konstrukce pro substrát v aktivní dutině MPP tvořené čtyřmi β -listy. Červeně znázorněné listy 1 a 2 jsou na modré β -MPP a zeleně znázorněné listy 3 a 4 jsou na žluté α -MPP. (Převzato z Taylor *et al.* 2001).

2.4.3. Evoluční souvislosti

Mitochondriální procesující peptidasa se vyvinula z již existující bakteriální proteasy patřící do M16B skupiny peptidas a stala se součástí cytochrom bc_1 komplexu (BRAUN a SCHMITZ 1995) dýchacího řetězce (core I a II proteiny). 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.

U fotosyntetizujících rostlin jsou podjednotky MPP integrovány do bc_1 komplexu (GAKH *et al.* 2002) – core II protein bc_1 komplexu odpovídá α -MPP a core I protein odpovídá β -MPP. Core proteiny u rostlin vykonávají dvě funkce (BRAUN *et al.* 1992). Jednak stabilizují bc_1 komplex a jednak odštěpují presekvence prekurzorů proteinů, které jsou transportovány z cytosolu do matrix mitochondrie.

Ve většině organismů, např. u *Saccharomyces cerevisiae* nebo savců, došlo k duplikaci genů, čímž vznikly dvojice paralelních párů proteinů a oddělily se funkce regulace respirace a proteolytické úpravy proteinů (GAKH *et al.* 2002).

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

Kvasinkový a savčí core II protein postrádá pro α -MPP charakteristickou GRL; obsahuje pouze krátkou oblast bohatou na glycinové zbytky (NAGAO *et al.* 2000). Na druhou stranu rostlinný core II protein, který zároveň funguje jako α -MPP, tuto konzervovanou smyčku obsahuje. Tento fakt naznačuje, že glycinová smyčka MPP hraje nepostradatelnou roli v rozpoznávání širokého spektra různých substrátů.

2.4.4. Hydrogenosomální procesující peptidasa

ŠMÍD a kol. (2008) prokázali, že se hydrogenosomální procesující peptidasa (HPP – hydrogenosomal processing peptidase) skládá z α i β podjednotky a nikoliv ze dvou homologních β -podjednotek (BROWN *et al.* 2007). ŠMÍD a kol. (2008) ve své práci ukazují, že zatímco kvasinková α -MPP neinteragovala s β -HPP *T. vaginalis*, α -HPP *T. vaginalis* byla schopna utvořit heterodimer s kvasinkovou β -MPP, přestože tento heterodimer nebyl schopen odštěpit jak mitochondriální, tak hydrogenosomální presekvence.

Presekvence směřující do hydrogenosomů jsou kratší (4 – 21 aminokyselinových zbytků) ve srovnání s presekvenkami dlouhými 20 – 70 aminokyselinových zbytků, které rozeznává MPP (SMID *et al.* 2008), a většinou postrádají kladně nabitě zbytky (kapitola 2.2.2.). HPP tedy představuje vývojový mezistupeň mezi MPP a GPP (kapitola 2.4.5.), což dokazuje i schopnost štěpit pouze kratší mitochondriální presekvence (SMID *et al.* 2008).

Primární struktura β -HPP je s β -MPP *S. cerevisiae* identická z 24 % (BROWN *et al.* 2007). Katalytická podjednotka také obsahuje konzervovaný zinek-vázací motiv (GAKH *et al.* 2002). V α -podjednotce HPP se nachází oblast bohatá na glycinové zbytky (BROWN *et al.* 2007), která je podobná GRL v α -MPP, avšak s redukováným počtem glycinových zbytků. Naskýtá se otázka, zda je nějaká evoluční souvislost s kratší délkou rozeznávaných presekvenek a redukovanou formou GRL.

2.4.5. Mitosomální procesující peptidasa z *Giardia*

Primární struktura mitosomální procesující peptidasy z *Giardia* (GPP – *Giardia* mitochondrial processing peptidase) se od β -MPP *S. cerevisiae* značně liší (identita pouze 13 %). Na rozdíl od heterodimeru MPP, kdy jsou pro aktivitu enzymu nutné obě podjednotky (LUCIANO *et al.* 1997), je GPP obsahující pouze jednu β -MPP podobnou katalytickou podjednotku schopna samostatně štěpit presekvence prekurzorů proteinů, které se do mitosomu dostaly. Presekvence, které β -GPP rozeznává, svým proximálním argininem interagují přímo s negativně nabitou oblastí katalytického místa enzymu (SMID *et al.* 2008). Zbytek aktivního místa β -GPP je na rozdíl od β -MPP kladně nabitý.

Důsledkem značně zúženého spektra rozeznávaných substrátů v mitosomech *Giardia* došlo k reduktivní evoluci heterodimeru MPP a vznikla unikátní monomerní struktura GPP (SMID *et al.* 2008).

2.5. Studium primární interakce MPP-substrát

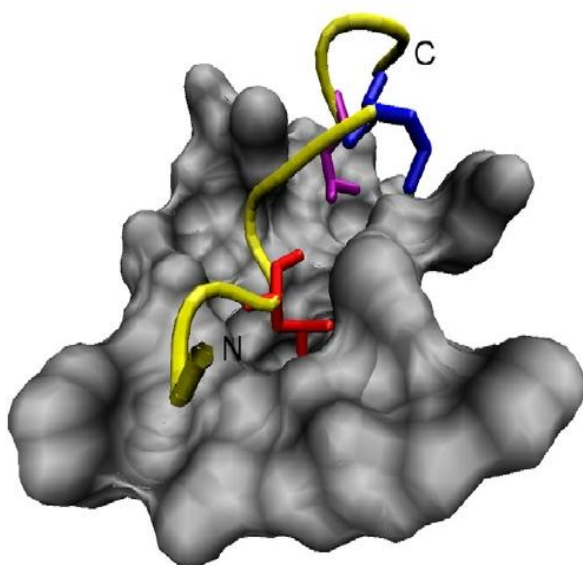
LUCIANO a kol. (1997) uvádějí, že kvasinková α -MPP váže substrát stejně efektivně jako celý enzym, tudíž je to právě tato podjednotka, která je zodpovědná za primární kontakt substrátu s MPP.

2.5.1. Glycinová smyčka α -podjednotky

Bylo popsáno více modelů, kde se smyčka uplatňuje ve funkci enzymů. Flexibilita smyček, která je dána počtem glycinů, hraje nepostradatelnou roli pro správné nasměrování katalyticky důležitých aminokyselinových zbytků (GUNASEKARAN a NUSSINOV 2004).

Oblasti bohaté na glyciny se vyskytují u těch enzymů, které rozpoznávají různé proteinové substráty; jedná se většinou o protein kinasy. Vysoký obsah glycinových zbytků je nutný k tomu, aby bylo zabráněno sterickým restrikcím pro jakýkoliv potenciální substrát (BOSSEMEYER 1994).

Glycinové smyčky v α -MPP se přikládá důležitá role ohledně primárního kontaktu enzymu se substrátem (Obr. 2.14). Používají se různé metody s cílem primární kontakt popsat. Jednou z nich je měření časově rozlišené fluorescenční spektroskopie za účelem sledování změn v pohyblivosti GRL α -MPP po navázání substrátu.



Obr. 2.14: Znárodnění prvotního kontaktu presekvence prekurzoru proteinu na GRL α -MPP pomocí simulace molekulární dynamiky. Molekulární povrch GRL je znázorněn šedivě (zbytky 284 – 308 α -MPP). Navázaná presekvence potkaní aldehyddehydrogenasy (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.* 2010).

V naší laboratoři byly experimenty prováděny na samostatné α -podjednotce, která je dostačující pro studování primárního kontaktu enzym-substrát a eliminuje

rušivý vliv β -MPP (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). Přítomnost β -MPP by způsobila obtíže při snaze odlišit slabou primární interakci substrátu od silné konečné interakce presekvence ke katalytické β -MPP pomocí elektrostatických interakcí. Výsledky ukázaly, že i za nepřítomnosti katalytické β -podjednotky je samotná α -podjednotka schopna rozeznat a navázat substrát, což způsobí změnu pohyblivosti GRL (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010).

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

2.5.1.1. Pohyblivost smyčky a interakce s presekvenčí

NAGAO a kol. (2000) zjistili, že konzervované aminokyselinové zbytky Phe²⁸⁹, Lys²⁹⁶ a Met²⁹⁸ v GRL interagují s esenciálními aminokyselinami presekvence v blízkosti štěpeného místa. Dále došli k závěru, že v pozici 289 musí být aromatický aminokyselinový zbytek, jehož funkce je ve vazbě na proximální arginin v pozici -2 od štěpeného místa.

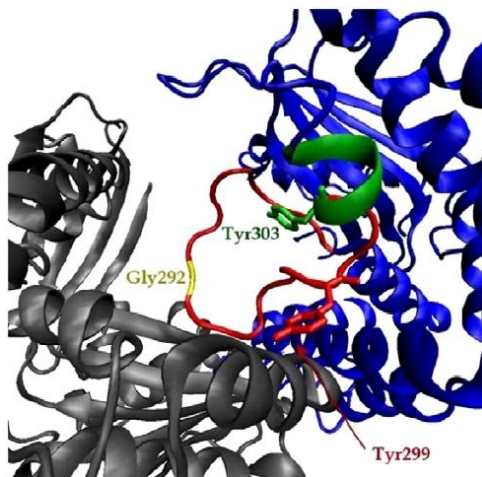
Pro zjištění lokální dynamiky vysoce konzervované GRL na α -podjednotce kvasinkové MPP byla v/bez přítomnosti substrátu pMDH (prekurzor malátdehydrogenasy) ze *S. cerevisiae* použita měření tryptofanové fluorescence. Pomocí cílené mutagenese byly do GRL a jeho bezprostředního okolí zavedeny reportérové tryptofanové zbytky (Obr. 2.15), Y299W nebo Y303W (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). Změny byly navrženy v takových místech (v pozicích aromatických aminokyselin), aby minimalizovaly vznikající stérické modifikace postranních řetězců.

Aby byla možnost sledovat reportérový tryptofanový zbytek, bylo nejprve potřeba pomocí cílené mutagenese zaměnit tři nekonzervované tryptofanové zbytky přirozeně se vyskytující na α -MPP *S. cerevisiae* – Trp¹⁴⁷, Trp²²³ a Trp⁴⁸¹. Po navázání substrátu je Trp²²³, který je původně umístěn hlouběji do hydrofobního prostředí, vystaven více do okolního prostředí. Oba Trp²²³ a Trp⁴⁸¹ jsou lokalizovány mimo centrální dutinu, kam se váže substrát, a nejsou vazby substrátu přímo účastněny.

Podářilo se zaměnit dva z nich, ale ačkoli Trp²²³ 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 reportérového tryptofanového zbytku do pozice 299 způsobilo pokles aktivity enzymu na 60 %, na druhou stranu substituce v pozici 303, která se nevyskytuje přímo v GRL, ale v přilehlém α -helixu, neovlivnila enzymatickou aktivitu MPP.



Obr. 2.15: GRL α -MPP (červeně). Tyr²⁹⁹ a Tyr³⁰³ byly zaměněny za reportérové zbytky Trp. Gly²⁹² byl deletován v mutantní formě α -MPP*-Y303W/ Δ G292. (Převzato z Dvorakova-Hola *et al.* 2010).

V naší pracovní skupině byly pro sledování samotné dynamiky reportérového tryptofanového zbytku použity metody časově rozlišené a ustálené fluorescenční spektroskopie. Výsledky měření ukázaly, že substrát, který se váže na GRL v oblasti, kde se vyskytuje reportérový tryptofanový zbytek v pozici 299, vyvolá změnu pohyblivosti GRL. Dynamika reportérového tryptofanového zbytku v pozici 299 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 α -helix vyskytující se v blízkosti GRL obsahující zavedený tryptofanový zbytek v pozici 303 je vazbou substrátu ovlivněn jen nepatrně. Při kombinaci mutace Y303W s delecí jednoho glycinového zbytku v pozici 292 (Δ G292) nebyla MPP schopna vázat dokonce ani krátkou presekvenci kvasinkové pMDH. Potvrdila se tedy nepostradatelnost celé GRL i pro štěpení krátkých presekvencí.

Tento systém měření reportérového tryptofanového zbytku však nebyl optimální, vzhledem k tomu, že bylo nutné odečíst signál, který dával tryptofanový zbytek v pozici 223, jež se nepodařilo odstranit. Tato diplomová práce navazuje na výše zmíněnou práci kolegů a jedním z jejích cílů bylo optimalizovat systém pro fluorescenční měření.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Bakteriální kmeny

Escherichia coli **JM109** (Promega):

recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^fZΔM15]. Kmen byl použit jako recipientní kmen pro transformaci plasmidy a pro modrobílou selekci.

Escherichia coli **GM2929**:

dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 recF143 mcrA0 mcrB9999 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 supE44 leuB6 rfbD fhuA13. Tento kmen bez methylační aktivity byl použit jako recipientní kmen pro transformaci plasmidy nesoucí restriční místo, jež rozpoznávají restriktázy neštěpící methylovanou DNA.

Escherichia coli **XL1-Blue** (Stratagene):

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^C. Kmen byl použit jako recipientní kmen pro transformaci amplifikované DNA po mutagenezi.

Escherichia coli **BL21(DE3)** (Novagen):

F⁻ *ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm*. Kmen s profágem λ nesoucím gen pro T7 RNA polymerasu (DE3) byl použit pro heterologní expresi proteinů.

Escherichia coli **BL21(DE3)+pGroESL**:

F⁻ *ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm*. Kmen upravený v naší laboratoři s profágem λ nesoucím gen pro T7 RNA polymerasu (DE3) a s plasmidem pGroESL obsahujícím geny pro chaperony byl použit pro heterologní expresi proteinů.

Escherichia coli **KC8(DE3)+pGroESL:**

hsdR leuB600 trpC9830 pyrF::Tn5 hisB463 lacΔX74 strA galU galK. Auxotrofní kmen s profágem λ nesoucím gen pro T7 RNA polymerasu (DE3) a s plasmidem pGroESL obsahujícím geny pro chaperony byl použit pro heterologní expresi proteinů. Tento kmen byl připraven v naší laboratoři použitím buněk *E. coli* KC8 (CloneTech).

3.1.2. Vektory

pBluescript II KS+ (Stratagene, 2,96 kbp):

Klonovací a sekvenovací vektor se syntetickým polylinkerem, který obsahuje 21 unikátních restrikčních míst a gen pro rezistenci k ampicilinu. Umožňuje tzv. modrobílou selekci klonů nesoucích rekombinantní plasmid.

pJAKO (2,96 kbp):

Klonovací vektor odvozený od pBluescript II KS+ (Stratagene) připravený v naší laboratoři (J. Janata, J. Kopecký). Tento vektor nese modifikovaný polylinker, který umožňuje přenos fragmentů mezi klonovacími a expresními vektory.

Vektory odvozené od pJAKO:

- **pJA2** (4,2 kbp) – nese gen pro α -MPP *S.cerevisiae* (vložen do míst NdeI a XhoI) se dvěma zaměněnými tryptofanovými zbytky v pozicích 147 a 481.
- **pJA2W289** (4,2 kbp) – nese gen pro α -MPP *S.cerevisiae* (vložen do míst NdeI a XhoI) se dvěma zaměněnými tryptofanovými zbytky v pozicích 147 a 481 a reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 289.
- **pJA2W299** (4,2 kbp) – nese gen pro α -MPP *S.cerevisiae* (vložen do míst NdeI a XhoI) se dvěma zaměněnými tryptofanovými zbytky v pozicích 147 a 481 a reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 299.

pET (Novagen, ~ 5,5 kbp):

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

Vektory odvozené od pET:

- **pETYAH** (6,72 kbp) – nese gen pro α -MPP kvasinky *S.cerevisiae* v pET28b(+) (vložen do míst NdeI a XhoI) a gen pro kanamycinovou rezistenci. Obsahuje histidinovou kotvu na N-konci.
- **pPA2** (6,72 kbp) – nese gen pro α -MPP kvasinky *S.cerevisiae* v pET28b(+) (vložen do míst NdeI a XhoI) se dvěma zaměněnými tryptofanovými zbytky v pozicích 147 a 481 a gen pro kanamycinovou rezistenci. Obsahuje histidinovou kotvu na N-konci.
- **pETYB** (6,98 kbp) – nese gen pro β -MPP kvasinky *S.cerevisiae* v pET11d(+) (vložen do míst NdeI a XhoI) a gen pro ampicilinovou rezistenci.
- **pETYpmMDHH+** (6,28 kbp) – nese gen pro prekurzor kvasinkové MDH s presekvencí z kvasinky v pET42b(+) (vložen do míst NdeI a XhoI) a gen pro kanamycinovou rezistenci. Obsahuje histidinovou kotvu na C-konci.
- **pETMYpmMDHH+** (6,28 kbp) – nese gen pro prekurzor kvasinkové MDH s presekvencí z myši v pET42b(+) (vložen do míst NdeI a XhoI) a gen pro kanamycinovou rezistenci. Obsahuje histidinovou kotvu na C-konci.
- **pETWYpmMDHH+** (6,28 kbp) – nese gen pro prekurzor kvasinkové MDH s presekvencí z melounu v pET42b(+) (vložen do míst NdeI a XhoI) a gen pro kanamycinovou rezistenci. Obsahuje histidinovou kotvu na C-konci.

pGroESL (Du Pont, 6,47 kbp)

Plasmid nesoucí geny *groES* a *groEL* pro chaperony a chloramfenikolovou rezistenci. Umožňuje nadprodukcii proteinů GroES (10 kDa) a GroEL (60 kDa) v *E. coli*.

3.1.3. Použité oligonukleotidy

Název primeru	sekvence
W223F forward	5' GTATCTCGGGGACTTCCAATCTACACACCCTCCG 3'
W223F reverse	5' CGGAGGGTGTGTAGATTGGAAGTCCCGAGATAC 3'
W223Y forward	5' GTATCTCGGTGACTATCAGTCTACACACCCTCCG 3'
W223Y reverse	5' CGGAGGGTGTGTAGACTGATAGTCACCGAGATAC 3'
W223L forward	5' GTATCTCGGTGACCTGCAGTCTACACACCCTCCG 3'
W223L reverse	5' CGGAGGGTGTGTAGACTGCAGGTCACCGAGATAC 3'

W223V forward	5' GTATCTCGGTGAC GTCCA ATCTACACACCCTCCG 3'
W223V reverse	5' CGGAGGGTGTGTAGATTGGACGTCACCGAGATAC 3'
Nsi I reverse	5' TTCGATCTTACTTATCATTTCGTTGA 3'
Sac I forward	5' GTCCCCTTTAATCTGCCCTA 3'

Pozn.: Tučně označené aminokyseliny se liší od sekvence genu pro α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*.

3.1.4. Chemikálie

Název	Zkratka	Firma
2'- deoxynukleosid-5'-trifosfátová směs	dNTP mix	Top-bio
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina	HEPES	Sigma
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid	X-gal	Serva
5-fluoro-tryptofan	5-F-Trp	Sigma
5-hydroxy-tryptofan	5-OH-Trp	Sigma
Adenosin-5'-trifosfát	ATP	Sigma
Agarosa		Serva
Akrylamid	AA	Bio-Rad
Ampicilin	amp	Serva
β -merkapt ethanol		Sigma
Bacto-trypton		Chemos
Betain		Sigma
BisTris		Fluka
Bromfenolová modř	BPB	Bio-Rad
Coomasie Brilliant Blue R-250	CBB	Serva
Coomassie blue G-250		Serva
D-glukosa	Glc	Lachema
Dodecylsulfát sodný	SDS	Serva
Epsilon aminokapronová kyselina		Serva
Ethanol	EtOH	Lachema
Ethidium bromid	EtBr	Sigma
Ethylendiamintetraacetát	EDTA	Sigma
Glycerol		Merck

Histidin	His	Sigma
Hovězí sérový albumin	BSA	Exbio
Chloramfenikol	Cm	Serva
Imidazol		Sigma
Isopropanol		Lachema
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	IPTG	Sigma
Kanamycin	kan	Serva
kvasničný extrakt		Oxoid
Leucin	Leu	Sigma
Močovina		Serva
N, N-dimethyl formamid	DMF	Sigma
n-dodecyl β -D-maltozid	DDM	Sigma
N, N'-methylen-bisakrylamid	bisAA	Bio-Rad
N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin	TEMED	Serva
Ni-sepharosová matrice		GE Healthcare
Peroxodisíran sodný	APS	Sigma
Polyethylenglykol (7500)	PEG	Sigma
Ponceau S		Sigma
Thiamin-HCl	Thi-HCl	Sigma
Tricin		Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Sigma
Tryptofan	Trp	Sigma
Tween		Serva
Uracil	Ura	Sigma

Ostatní použité chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty

3.1.5. Enzymy

- restrikční endonukleasy: AatII, AccI, AvaI, AvaII, BamHI, BlnI, BsaI-HF, BsrGI, BstYI, DpnI, Hind III, PciI, PstI (New England Biolabs)
- alkalická fosfatasa CIP (New England Biolabs)
- RNasa A (Fermentas)
- T4 DNA ligasa (New England Biolabs nebo Fermentas)

- LA polymerasa (Top-Bio), Phusion Hot Start DNA polymerasa (Finnzymes), *PfuUltra* HF DNA polymerasa (Stratagene)

3.1.6. Pufry a roztoky

Obecné pufry a roztoky:

TE ⁻¹ pufr:	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
1 x TAE pufr:	40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,0
10 x DNA vzorkový pufr:	40% sacharosa, 0,25% BPB, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0
Ligační pufr:	10 x pufr pro T4 DNA ligasu (Fermentas)
Restrikční pufr:	pufry pro restriktázy (New England Biolabs)
Polymerační pufr:	10 x LA complete PCR pufr (Top-Bio), 5 x Phusion GC pufr (Finnzymes), 10 x reakční pufr pro <i>PfuUltra</i> HF DNA polymerasu (Stratagene)

Roztok IPTG: 100 mM isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

Roztoky antibiotik:	ampicilin:	100 mg.ml ⁻¹ (1000 x)
	kanamycin:	30 mg.ml ⁻¹ (1000 x)
	chloramfenikol:	34 mg.ml ⁻¹ (1000 x)

Roztoky pro izolaci plasmidové DNA z *E. coli* alkalickou lyzí:

Roztok I:	25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, pH 8,0
Roztok II:	1% (w / v) SDS, 0,2 M NaOH (připravovat vždy čerstvý)
Roztok III:	3 M CH ₃ COOK, pH 5,0 (pH upravovat ledovou CH ₃ COOH)

Roztoky pro přípravu kompetentních buněk *E. coli*:

Roztok A:	LB médium, 0,2% glukosa, 10 mM MgSO ₄ .7H ₂ O
Roztok B:	LB médium, 36% glycerol, 12% PEG (Mr 7500), 12 mM MgSO ₄ .7H ₂ O, (sterilizace filtrací)

Roztoky a pufry pro SDS-PAGE:

Startovací gel (3%):	0,45 ml 40% AA / 1,7% bisAA 0,625 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,9
----------------------	--

	0,125 ml 4% SDS
	3,5 ml H ₂ O
	10 µl 30% APS
	10 µl TEMED
Rozdělovací gel (8%)	4 ml 40% AA / 1,7% bisAA
	4 ml 1,875 M Tris-HCl, pH 8,9
	0,5 ml 4% SDS
	11,5 ml H ₂ O
	20 µl 30% APS
	20 µl TEMED
10 x elektrodový pufr:	30 g Tris, 144 g glycin, 10 g SDS, doplnit H ₂ O do 1 l
2 x SDS vzorkový pufr:	125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 5% β -merkaptoethanol, 20% glycerol, 0,002% bromfenolová modř
Barvicí roztok:	10% CH ₃ COOH, 10% isopropanol, 0,25% CBB
Odbarvovací roztok:	10% CH ₃ COOH, 10% methanol

Roztoky a pufrы pro Blue-Native PAGE:

Startovací gel (3%):	83 µl 48% AA/1,7% bisAA
	333 µl Gel pufr 3 x
	580 µl H ₂ O
	2,77 µl 30% APS
	0,8 µl TEMED
Rozdělovací gradientový gel:	
• 8%:	483 µl 48% AA / 1,7% bisAA
	1 ml Gel pufr 3 x
	1,5 ml H ₂ O
	5,53 µl 30% APS
	1,6 µl TEMED
• 18%:	0,5 g glycerolu
	916 µl 48% AA / 1,7% bisAA
	833 µl Gel pufr 3 x
	350 µl H ₂ O

	2,77 μ l 30% APS
	0,8 μ l TEMED
Gel pufr 3 x:	150 mM BisTris/HCl, 1,5 M aminokapronová kyselina, pH 7,0
Katodový pufr:	50 mM Tricin, 15 mM BisTris/HCl, 0,02% Coomassie blue G-250, pH 7,0
Anodový pufr:	50 mM BisTris/HCl, pH 7,0
Vzorkový pufr:	48% glycerol, 150 mM BisTris/HCl, pH 7,0

Pufry pro purifikaci α -MPP:

HEPES pufry:

Pro uchování buněk: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% glycerol, pH 7,4

Pufry pro metaloafinitní chromatografii:

- Ekvilibrační pufr: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% glycerol, pH 7,4
- Pufr 1: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% glycerol,
30 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 2: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% glycerol,
50 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 3: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% glycerol,
100 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 4: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% glycerol,
250 mM imidazol, pH 7,4

Pufr pro odsolení: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7,4

Tris pufry:

Pro uchování buněk: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 20% glycerol, pH 7,4

Pufry pro metaloafinitní chromatografii:

- Ekvilibrační pufr: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 20% glycerol, pH 7,4
- Pufr 1: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 20% glycerol,
30 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 2: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 20% glycerol,
50 mM imidazol, pH 7,4

- Pufr 3: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 20% glycerol, 100 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 4: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 20% glycerol, 250 mM imidazol, pH 7,4

Pufr pro odsolení: 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,6

Pufry pro purifikaci β -MPP:

Pufry jsou stejné jako u α -MPP, pouze neobsahují glycerol

HEPES pufry:

- Dialyzační pufr : 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,4

Tris pufry:

- Dialyzační pufr: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7,4

Pufry pro purifikaci substrátů:

HEPES pufry:

Pro uchování buněk: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,4

Denaturační pufr: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 8 M močovina, pH 7,4

Pufry pro metaloafinitní

chromatografii:

- Ekvilibrační pufr: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 8 M močovina, pH 7,4
- Pufr 1: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 30 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 2: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 50 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 3: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 100 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 4: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 250 mM imidazol, pH 7,4

Pufr pro odsolení: 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 4 M močovina, pH 7,4

Tris pufry:

Pro uchování buněk: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7,4

Denaturační pufr: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 8 M močovina, pH 7,4

Pufry pro metaloafinitní chromatografii:

- Ekvilibrační pufr: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 8 M močovina, pH 7,4
- Pufr 1: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 30 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 2: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 50 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 3: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 100 mM imidazol, pH 7,4
- Pufr 4: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 8 M močovina, 250 mM imidazol, pH 7,4

Pufr pro odsolení: 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 4 M močovina, pH 8,6

3.1.7. Kultivační média a agary

LB médium: 10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, H₂O do 1 l, pH 7,5

LB agar: 15 g agar do 1 l LB média

5 x M9 soli: 64 g Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5 g NH₄Cl, H₂O do 1 l

M9 doplněné médium: 20 ml 5 x M9 soli, 200 µl 1 M MgSO₄, 100 µl 0,1 M CaCl₂, 5 ml 20% glukosy, 10 ml 20% casamino kyseliny, 100 µl 1 M Thiamin-HCl, 1 ml 1% Leu / 0,2% His, 1 ml 0,2% Ura, 1 ml 0,2% Trp (popř. 5-OH-Trp nebo 5-F-Trp), 61,5 ml deionizované H₂O

AIX miský: 15 g agar, 1 ml 3% x-gal v DMF, 1 ml ampicilinu, 1 ml 100 mM IPTG do 1 l LB média

NZY⁺ bujón: 10 g kasein hydrolyzáta, 5 g kvasničný extrakt, 5 g NaCl, H₂O do 1 l, pH 7,5; poté přidat 12,5 ml 1 M MgCl₂, 12,5 ml 1 M MgSO₄, 20 ml 20% (w/v) glukosy

3.1.8. Komerční soupravy

Izolace plasmidové DNA z *E. coli*:

NucleoBond[®] Xtra Midi/Maxi (Machinery-nagel).

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega).

Izolace DNA z agarosového gelu:

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Pro výměnu pufrů pro restriktasy:

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Standardy molekulových hmotností:

DNA agarosová elektroforéza: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Standard obsahuje 20 fragmentů od 100 bp do 12000 bp.

Pozn.: Při nanesení 5 µl standardu obsahuje fragment o velikosti 1650 bp 40 ng DNA.

Této vlastnosti bylo využito při přibližném odhadu množství a koncentrace vzorku.

Proteinová SDS-PAGE: Page Ruler[™] Plus (Thermo Scientific) obsahuje 9 standardů o velikostech od 10 kDa do 250 kDa.

Proteinová Blue-Native PAGE: Electrophoresis calibration kit (Pharmacia) obsahuje 5 standardů o velikostech od 67 kDa do 669 kDa.

Zjištění koncentrace proteinů podle Bradfordové:

Quick Start[™] Bradford (Bio-Rad).

3.1.9. Přístroje

Analytické váhy ER-182A	Ohaus, Švýcarsko
Box s laminárním prouděním vzduchu	Clean Air, Nizozemsko
Centrifuga 5415R	Eppendorf, Německo
Centrifuga BR4i	Thermo Scientific, USA
Centrifuga MR23i	Thermo Scientific, USA
Centrifuga J6-MI	Beckman coulter, USA
Digitální fotoaparát	Olympus, Německo
Digitální váhy MXX-212	Denver Instrument, NY
Digitální váhy XE-410D	Denver Instrument, NY
Inkubační třepačka Unitron	Infors-HT, Švýcarsko
Mikrocentrifuga 24S	Dorvalo Instrumenst, USA

Multiscan EX	Thermo-Electron Co, China
Nanodrop ND 1000 Spektrofotometr	NanoDrop Technologies, USA
Odparka SPD1010	SpeedVac [®] System, USA
pH-metr MP225	Mettler Toledo, USA
Peristaltická pumpa P-1	Pharmacia, Sweden
Skener 8600T	Canon, Japonsko
Spektrofotometr Hélios Gama	ATI Unicam, UK
Thermoblok	Grant, GB
Thermocycler T1	Whatman Biometra, Německo
Ultrazvuková sonikační sonda	Cole Parmer instrument Co, USA
Vodní lázeň CC1	Huber, Německo
Vortex MS2 Minishaker IKA	IKA-Works, USA
Zdroj elektroforézy EC-103	E-C Apparatus Corporation, NY

3.1.10. Software

Clone Manager:

Tento program (verze 4.01) byl použit pro vytváření map jednotlivých rekombinantních vektorů.

DNASar Edit Sequence:

Tento program (verze 4.03) byl použit pro práci se sekvencemi.

Geneious:

Tento program (verze 5.0.4) byl použit pro porovnání jednotlivých sekvencí.

EndNote:

Tento program (verze 9) byl použit pro práci s citacemi při psaní této práce.

3.2. Metody

Protokoly AUSUBEL (1998) nebo podle specifických návodu výrobců.

3.2.1. Práce s buňkami

3.2.1.1. Kultivace *E. coli*

Kmeny *E. coli* byly kultivovány na LB agaru nebo v LB médiu při 37 °C. Pro selekci buněk nesoucích určitý plasmid byla do LB agaru (rozehrátý a zchlazený na 55 °C) nebo média přidána odpovídající antibiotika. Pro selekci buněk nesoucích plasmidy odvozené od pJAKO a od pET11d(+) byl přidán ampicilin na konečnou koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro selekci buněk nesoucích plasmidy odvozené od pET28b(+) a pET42b(+) byl přidán kanamycin na konečnou koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro selekci buněk nesoucích plasmid pGroESL byl přidán chloramfenikol na konečnou koncentraci 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.1.2. Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky se vyznačují tím, že jsou schopny přijmout cizí DNA. Tato schopnost vyžaduje určité genetické vlastnosti bakterie a kultivaci v podmínkách, které zajistí tvorbu prostupné buněčné stěny.

100 ml roztoku A bylo zaočkováno přes noc narostlou bakteriální kulturou tak, aby OD_{600} byla mezi 0,01 – 0,1. Kultura byla kultivována na rotační třepačce při 37 °C a 200 rpm do $\text{OD}_{600} \sim 0,4 - 0,5$. V této fázi byla kultura zchlazena na ledu po dobu 10 min a poté zcentrifugována (1500 g, 10 min, 4 °C). Sediment byl opatrně resuspendován v 1 ml roztoku A. Poté bylo přidáno 5 ml vychlazeného roztoku B. Směs byla rozdělena na alikvoty po 100 μl a buňky byly uchovány při -70 °C.

3.2.1.3. Transformace buněk *E. coli* teplotním šokem

K transformaci jsou používány kompetentní buňky, které jsou schopny přijmout cizí DNA. Během transformace dojde pomocí tepelného šoku k destabilizaci cytoplasmatické membrány.

Ke zmraženému alikvotu kompetentních buněk bylo přidáno odpovídající množství plasmidové DNA (50 – 150 ng), popř. ligační směsi. Směs byla inkubována na ledu po dobu 20 min. Poté byly buňky podrobeny teplotnímu šoku (42 °C) po dobu 1 min ve vodní lázni a následně zchlazeny na ledu. Po uplynutí 2 min byl ke směsi přidán

1 ml LB média přehřátého na 37 °C. Směs byla kultivována při 37 °C na rotační třepače (200 rpm) po dobu 1 – 1,5 h, což zabezpečilo plnou expresi rezistence k antibiotiku. Buňky byly poté krátce zcentrifugovány, většina LB média odstraněna a buňky byly resuspendovány ve zbývajících cca 150 µl LB média a vysety na plotny s LB agarem a příslušným antibiotikem. Plotny byly inkubovány 12 – 20 h při 37 °C.

3.2.2. Práce s DNA

3.2.2.1. Izolace plasmidové DNA z *E. coli* alkalickou lýzí

Prvním krokem při izolaci plasmidové DNA je narušení buněk a denaturace proteinů a DNA roztokem obsahujícím SDS a NaOH. Následnou neutralizací octanem draselným plasmidová DNA rychle renaturuje a je dobře oddělitelná od většiny chromosomální DNA (BIRNBOIM a DOLY 1979).

Bakteriální kolonie rostoucí na agarové plotně byla zaočkována do 2 až 10 ml LB média (podle toho, obsahuje-li vysokokopiový nebo nízkokopiový plasmid) s přidavkem příslušného antibiotika. Kultura byla kultivována 12 – 15 h při 37 °C a 200 rpm na rotační třepače. Kultura byla následně centrifugována při 3500 g pod dobu 10 min za laboratorní teploty. Buňky byly důkladně resuspendovány ve 100 µl roztoku I a poté bylo přidáno 200 µl roztoku II. Suspenze byla opatrně promíchána převrácením zkumavky. Následně bylo přidáno 150 µl roztoku III a suspenze byla opět opatrně promíchána. Následovala centrifugace za laboratorní teploty při 13000 g po dobu 15 min. K supernatantu byl přidán 2,5 objemový násobek 96% ledového ethanolu. Směs byla opatrně promíchána a ponechána na ledu po dobu 5 min. Následovala centrifugace při 13000 g a 4 °C po dobu 15 min. Sediment byl promyt 0,5 ml 70% ethanolem a opět zcentrifugován. Získaná vysrážená DNA v sedimentu byla vysušena ve vakuu (2 – 8 min při 45 °C) a následně resuspendována ve 20 µl destilované vody (nebo TE⁻¹ pufru) s RNasou A (20 µg.ml⁻¹). Roztok DNA byl inkubován 30 min za laboratorní teploty a nakonec zmražen do -20 °C.

3.2.2.2. Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí komerční soupravy

Pro izolaci plasmidové DNA v dostatečné čistotě za účelem dalšího použití (enzymatické úpravy DNA, ligace) byla použita komerční souprava NucleoBond[®] Xtra Midi/Maxi (Machinery-nagel) nebo Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega). Princip metody je obdobný výše zmíněné izolaci, pouze je do této

metody vřazen ještě jeden stupěň, a to vazba DNA na „skleněné mléko“ oddělující DNA od proteinů a degradované RNA.

Při používání komerčních souprav byly dodržovány pokyny výrobce.

3.2.2.3. Enzymatické úpravy DNA

Restrikce

Restrikční endonukleasy rozeznávají dsDNA, kterou štěpí uvnitř vláknů ve specifickém místě.

Při práci s restrikčními endonukleasami bylo postupováno podle doporučení výrobce. Pro testování připravených konstruktů byl celkový objem reakce 20 μ l, pro přípravu konstruktů, kdy bylo štěpeno větší množství plasmidové DNA, byl celkový objem až 200 μ l. Množství přidaného enzymu do reakční směsi se pohybovalo mezi 5 – 10 U na 1 μ g plasmidové DNA.

Ligace

Ligací se rozumí vzájemné spojování dvou či více molekul DNA nebo cirkularizace lineárních.

Pro ligace byl celkový objem reakce 20 μ l. Mezi vektorem a fragmentem byl dodržován molární poměr 1 : 3 – 1 : 5. Byla používána T4 DNA ligasa a odpovídající ligační pufr. Do reakce bylo přidáváno ATP v konečné koncentraci 1 mM. Reakční směs obsahující T4 DNA ligasu od New England Biolabs (400 U / μ l) byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 1 h, reakční směs obsahující T4 DNA ligasu od Fermentas (1 Weiss U / μ l) byla inkubována 1,5 h při 16° C a poté byl enzym inaktivován inkubací při 65 °C po dobu 10 min.

Defosforylace

Defosforylace konců linearizovaného plasmidu po naštěpení příslušnými restrikčními endonukleasami slouží k zabránění opětovnému spojení jeho konců a vzniku kruhové molekuly neobsahující vkládaný fragment. K těmto účelům byla používána alkalická fosfatasa CIP (3,5 U / μ g DNA). Reakce probíhaly při 37 °C po dobu 1 h. Enzym a pufr byl odstraněn komerční soupravou určenou pro tyto účely.

3.2.2.4. Elektroforéza DNA v agarosovém gelu

DNA elektroforéza je metoda, během níž dojde k separaci záporně nabitých molekul na základě rozdílné pohyblivosti v gelu. Elektroforetická pohyblivost molekul DNA závisí na koncentraci agarosy, molekulové hmotnosti DNA, konformaci DNA a na velikosti napětí.

Pro naše účely byl používán agarosový gel a pufr TAE (1 x). V závislosti na velikosti analyzovaných fragmentů byla volena koncentrace agarosy od 0,8 % do 2 %. Do gelu byl pro vizualizaci DNA pod UV světlem přidáván roztok ethidium bromidu (konečná koncentrace rovna 0,005 %). Před nanesením DNA byl ke vzorkům přidáván DNA vzorkový pufr v poměru 1 : 5 nebo 1 : 10. Fragменты byly separovány při konstantním napětí 3 – 5 V na 1 cm délky gelu. Jako standard bylo nanášeno 5 µl „1 kb Plus DNA ladder“, kdy fragment o velikosti 1650 bp obsahuje 40 ng DNA.

3.2.2.5. Izolace DNA z agarosového gelu

Pro izolaci požadovaného fragmentu z gelu separovaného pomocí agarosové elektroforézy byla po vyříznutí proužku s daným fragmentem použita komerční souprava Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Byly dodržovány pokyny výrobce.

3.2.2.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a příprava bodových mutací

Metoda PCR umožňuje *in vitro* amplifikaci definovaného úseku DNA. Tato metoda používá dva oligonukleotidy (primery) komplementární k opačným řetězcům a ohraničující cílovou sekvenci DNA, která má být amplifikována. Reakce probíhá v cyklech zahrnujících denuraci templátu, nasednutí primerů (hybridizace) a prodlužování nasednutých primerů termostabilní polymerasou.

Použití PCR pro cílenou mutagenezi

Reakce probíhala v objemu 50 µl. Složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v kapitole 4.1.2. Hybridizační teplota použitých oligonukleotidů byla určena experimentálně. PCR reakce byla použita pro přípravu mutantních forem α -MPP použitím kitu QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis. Amplifikace požadovaného úseku DNA probíhala mezi dvěma primery (forward a reverse), které byly navrženy tak, aby amplifikovaná část obsahovala takovou záměnu nukleotidové sekvence, která vede

jednak ke změně aminokyseliny v konečném proteinu a jednak obsahuje tichou mutaci závadějící unikátní restrikční místo, která se v konečném proteinu neprojeví.

Po skončení amplifikace byl ke směsi přidán 1 μ l DpnI (10 U) restrikční enzym a směs byla inkubována 1 h při 37 °C, čímž došlo k naštípání templátové methylované DNA. Amplifikovaná nemethylovaná DNA byla transformována do superkompetentních buněk *E.coli* XL1-Blue.

3.2.2.7. Sekvenování DNA

Sekvenování DNA bylo prováděno servisní laboratoří v AV ČR nebo byly vzorky posílány do Německa (GATC Biotech), popř. Koreji (Macrogen). Vzorky byly dodávány ve formě PCR produktu o koncentraci 10 – 50 ng / μ l a ve formě plasmidové DNA o koncentraci 30 – 100 ng / μ l.

3.2.3. Práce s proteiny

3.2.3.1. Heterologní exprese proteinů

Heterologní exprese proteinů probíhá v buňkách jiného organismu. Pro expresi proteinů přirozené a mutantní α -MPP *S. cerevisiae* (~ 53 kDa) byl používán bakteriální kmen *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL. Pro expresi β -MPP *S. cerevisiae* a prekurzorů kvasinkové MDH s presekvenecemi z kvasinky, myši a melounu byl používán bakteriální kmen *E. coli* BL21(DE3).

Pro produkci proteinů byl používán pET expresní systém (Novagen), kdy je po přidání IPTG indukována syntéza T7-RNA polymerasy, jejíž gen je umístěn na chromosomu buněk pod kontrolou *lac* operátoru. T7-RNA polymerasa poté přepisuje gen vložený pod T7 inducibilní promotor. V hostitelské buňce je dále přítomen *lac* represor, který je kódován též pET vektorem a brání expresi vloženého genu bez přítomnosti IPTG.

Přes noc narostlé buňky na LB agaru s příslušným antibiotikem byly smyty na 37 °C vytemperovaným LB médiem a bylo jimi zaočkováno 0,5 l LB média s příslušným antibiotikem na $OD_{600} \sim 0,1 - 0,14$. Buňky byly následně kultivovány při 37 °C a 200 rpm na rotační třepačce do té doby, než dosáhly $OD_{600} \sim 0,6 - 0,8$. Bylo odebráno 5 ml pro porovnání indukované a neindukované frakce. Při expresi přirozené α -MPP, β -MPP a prekurzorů MDH byla poté kultura indukována IPTG na konečnou koncentraci 0,4 mM a inkubována při 37 °C a 200 rpm po dobu 1 h. Při expresi

mutantní α -MPP byla kultura před indukcí zchlazena na ledu po dobu 10 min a poté inkubována při 20 °C a 200 rpm po dobu 12 – 18 h. Po uplynutí dané doby inkubace byly kultury na 30 min zchlazeny v ledu a poté stočeny při 2000 g a 4 °C po dobu 15 min. Sediment byl resuspendován v 30 ml odpovídajícího pufru pro uchování buněk (HEPES nebo Tris) a suspenze byla opět zcentrifugována za stejných podmínek. Sedimentované buňky obsahující daný protein byly následně uchovány v -20 °C až do následného použití.

Zabudování analogu tryptofanu

Pro zabudování analogu tryptofanu (ROSS *et al.* 1992), tj. 5-OH-Trp nebo 5-F-Trp do mutantní α -MPP (PA3W289 nebo PA3W299) byl použit auxotrofní kmen *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL. Přes noc narostlé buňky na LB agaru s ampicilinem a chloramfenikolem byly smyty na 37 °C vytemperovaným LB médiem a bylo jimi zaočkováno 100 ml LB média s ampicilinem a chloramfenikolem na $OD_{600} \sim 0,1 - 0,14$. Buňky byly následně kultivovány při 37 °C a 200 rpm na rotační třepačce do té doby, než dosáhly $OD_{600} \sim 0,4 - 0,5$. Buňky byly sklizeny centrifugací (2000 g, 4 °C, 10 min) a resuspendovány ve stejném množství na 37 °C vytemperovaného M9 doplněného média obsahující analog tryptofanu. Byla přeměřena OD_{600} a kultura byla dále kultivována, než OD_{600} stoupla o dalších 0,3. Kultura byla poté zchlazena na ledu po dobu 10 min, bylo odebráno 5 ml pro porovnání indukované a neindukované frakce a zbytek kultury byl indukován IPTG na konečnou koncentraci 0,4 mM a inkubován při 20 °C a 200 rpm po dobu 12 – 18 h. Po uplynutí dané doby inkubace bylo z indukované i neindukované kultury odebráno po 1 ml, který byl stočen při 2000 g a 4 °C po dobu 15 min. Sediment byl resuspendován v 300 μ l Tris pufru pro uchování buněk, opět zcentrifugován a resuspendován v 300 μ l téhož pufru. Buňky byly rozrušeny ultrazvukovou sondou (6x 10 s, 25W). Po každém 10 s zásahu byla suspenze chlazena na ledu po dobu 1 min. Rozpustná a nerozpustná frakce bezbuněčného extraktu byla oddělena centrifugací (16000 g, 4 °C, 30 min). Expres byla kontrolována pomocí SDS-PAGE.

3.2.3.2. Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro analýzu proteinů byla používána vertikální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Jedná se o metodu umožňující oddělit proteiny migrující v elektrickém poli skrze póry polyakrylamidového gelu. Oddělení proteinů je pouze na

základě jejich velikosti, jelikož SDS, způsobující denaturaci proteinu, udílí proteinům jednotný záporný náboj na jednotku hmoty. K denaturaci proteinů slouží také β -merkaptoethanol.

Elektroforéza probíhala v SDS elektrodoovém pufru při konstatním napětí 200 V. Ke vzorkům byl přidán 2 x vzorkový pufr v poměru 1 : 1 a směs byla povařena 10 min v termobloku při 80 °C.

Pro vizualizaci vzorků byly gely barveny cca 5 min v barvicím roztoku a poté promyty vodou a odbarveny horkým odbarvovacím roztokem.

3.2.3.3. Purifikace proteinů

Purifikace α -MPP a jejích mutantních forem

Rozmražené buňky z 0,5 l buněčné kultury obsahující α -MPP byly resuspendovány v 30 ml příslušného pufru pro uchování buněk (HEPES nebo Tris) a rozrušeny ultrazvukovou sondou (6x 20 s, 50W). Po každém 20 s zásahu byla suspenze chlazená na ledu po dobu 1 min. Rozpustná a nerozpustná frakce bezbuněčného extraktu byla oddělena centrifugací (16000 g, 4 °C, 30 min). Expres byla kontrolována pomocí SDS-PAGE.

Metaloafinitní chromatografie

Na N-konci (α -MPP) nebo na C-konci (pMDH) fúzních proteinů se nachází histidinová kotva, která umožňuje jejich purifikaci pomocí metaloafinitní chromatografie na kolonce s niklovou náplní. Tato metoda využívá schopnosti histidinové kotvy vázat se na nikelnaté ionty, které jsou prostřednictvím chelatačního činidla nesený sepharosou v kolonce. Navázaný protein je poté uvolněn z vazby na kolonku pufru se zvyšujícími se koncentracemi imidazolu (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010).

Supernatant obsahující rozpustný protein našeho zájmu byl spojen s Ni-sepharosovou maticí promytou příslušným ekvilibračním pufrům (HEPES nebo Tris) a směs byla ponechána 5 min na ledu. Směs byla poté nanášena na kolonku a matrice následně promyta 10 ml pufru (matrice nesměla vyschnout). Poté bylo na kolonku nanášeno po 5 ml pufru se vzestupným obsahem imidazolu (30 mM, 50 mM, 100 mM a 250 mM imidazol) a frakce byly jímány vždy po 1 ml a uloženy do ledu. Pro další účely byl používán protein z frakcí obsahující 250 mM imidazol, popř. 100 mM imidazol. Přítomnost bílkovin v jednotlivých frakcích byla testována na nitrocelulosové

membráně 0,45 μm (Whatman), která byla obarvena Ponceau S a odbarvena vodou. Pozitivní frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Gelová chromatografie

Po metaloafinitní chromatografii byly získány frakce purifikovaných proteinů, které jsou však v pufru obsahující vysoký obsah imidazolu. Odstranění imidazolu (tzv. odsolení) z prostředí bílkoviny bylo provedeno prostřednictvím gelové chromatografie. Odsolení bylo spojeno s výměnou pufru. K těmto účelům byly použity kolonky HiTrapTM Desalting (GE Healthcare) a bylo postupováno dle pokynů výrobce. Frakce byly jímány po 0,5 ml a ihned ukládány do ledu. Přítomnost bílkovin v jednotlivých frakcích byla testována na nitrocelulosové membráně 0,45 μm (Whatman), která byla obarvena Ponceau S a odbarvena vodou. Pozitivní frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Purifikace β -MPP

β -MPP je produkována v nerozpustné formě a je izolována z inkluzních tělísek (GELI 1993). Po sonikaci a centrifugaci (viz. purifikace α -MPP) byl sediment opět promyt příslušným pufrům pro uchování buněk (HEPES nebo Tris) a suspenze byla centrifugována (16000 g, 4 °C, 30 min). Následovala denaturace inkluzních tělísek, kdy byl sediment resuspendován v 10 ml pufru obsahující 8 M močovinu a suspenze byla ponechána 1 h na rotační třepačce (200 rpm) při 37 °C. Následovala centrifugace (16000 g, 30 min, 15 °C; močovina za nízkých teplot tvoří krystalky), při které byla již rozpustná β -MPP od nerozpustné frakce oddělena. Renaturace proteinu byla provedena dialýzou, kdy došlo k odstranění močoviny výměnou pufrů (objem pufru byl minimálně 100 x větší než objem supernatantu). Vzorek byl přenesen do dialyzační membrány Membra-Cell-dialysis MWCO3500, 16 mm (Serva). Dialýza probíhala přes noc při 4 °C za stálého míchání na magnetické míchačce pro lepší prostupnost pufrů. Vysrážené proteiny byly poté odstraněny centrifugací (16000 g, 4 °C, 30 min). Supernatant obsahující β -MPP byl zkontrolován na SDS-PAGE.

Purifikace pMDH

pMDH je také produkován v nerozpustné formě a je izolován z inkluzních tělísek (viz. purifikace β -MPP). Po hodinové denaturaci pMDH v příslušném pufru

(HEPES nebo Tris) obsahující 8 M močovinu byla suspenze centrifugována (16000 g, 30 min, 15 °C). Protein byl následně purifikován pomocí metaloafinitní chromatografie a odsolen příslušným pufrům obsahujícím 4 M močovinu.

Zakoncentrování pMDH

Pro zakoncentrování substrátů byl použit Amicon Ultra centrifugal filter Devices (Millipore) velikosti 10 K, který zachytí proteiny větší než 10 kDa. Na filtr byly nanášeny 4 ml (maximální kapacita) z odsolených frakcí obsahující substrát. Následnou centrifugací (7500 g, 15 °C, 30 min) byly odstraněny případné nečistoty do 10 kDa a také většina pufru. Doba centrifugace závisela na požadovaném konečném objemu, ve kterém byl substrát zakoncentrován. Vzorek byl poté přenesen do nové sterilní mikrozkušavky.

3.2.3.4. Příprava dimeru MPP

Pro zjištění aktivity enzymu bylo potřeba spojit obě podjednotky MPP. Podjednotky by měly být smíchány v poměru 1 : 1, ale do reakce je dáno 2 x více β -MPP z toho důvodu, že po renaturaci je aktivní pouze 30 – 50 % β -MPP. Pouze tento podíl β -MPP je schopen se vázat na α -MPP.

Ke směsi byl přidán MnCl_2 na konečnou koncentraci 1 mM. Směs byla promíchána a ponechána po dobu 30 min na ledě. Následovala centrifugace (16000 g, 4 °C, 30 min), kdy se dimer vyskytoval v rozpustné frakci.

3.2.3.5. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Kit Quick StartTM Bradford (Bio-Rad) umožňuje kolorimetricky stanovit koncentraci proteinů. Principem je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu.

Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno po 5 μl vzorku (nanášky byly v triplicátech, z nichž byl určen průměr), řady BSA standardu (0,125 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,75 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), z které byla vytvořena kalibrační křivka, vody jako blanku pro BSA standard a příslušného pufru jako blanku pro vzorek. Ke všem vzorkům bylo nanášeno 250 μl reakčního činidla. Po 5 minutách reakce probíhající za pokojové teploty byla koncentrace stanovena na základě změřené OD při 560 nm.

3.2.3.6. Stanovení aktivity forem MPP obsahující reportérovou α -MPP

Aktivitou MPP se míní schopnost odštěpit presekvenční substrát (pMDH), a tím ho převést do zpracované formy (MDH). Podmínky testování aktivity MPP obsahující α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem byly zvoleny stejné, jaké byly experimentálně stanoveny pro MPP (JANATA *et al.* 2004); tj. 30 °C, pH 7,4. Ke směsi byl přidán MnCl₂ na konečnou koncentraci 2 mM. Aktivity MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* a MPP obsahující reportérovou α -MPP byly měřeny v časech 1, 2, 4 a 8 min. Reakční směsi odebrané v daných časech (15 μ l) byly poté rozděleny na SDS-PAGE, kde se oddělila zpracovaná MDH od prekurzorové MDH na základě rozdílu velikosti.

3.2.3.7. Stanovení stability forem MPP obsahující reportérovou α -MPP

Z hlediska stability byla sledována schopnost proteinu neagregovat při daných podmínkách skladování. Testovány byly teploty -20 °C, 4 °C, 16 °C a laboratorní teplota. Stabilita byla kontrolována pomocí Blue-native PAGE.

3.2.3.8. Nativní elektroforéza (Blue-Native PAGE)

Tato metoda patří mezi separační metody umožňující rozdělit proteinové komplexy v enzymaticky aktivním stavu. Protein získá negativní náboj interakcí s barvou Coomassie blue G-250. Separace proteinu probíhá jednak na základě rozdílné hmotnosti, ale zásadním faktorem je především tvar proteinu.

Blue-Native polyakrylamidová elektroforéza byla použita pro kontrolu stability proteinů (zda netvoří agregáty) a probíhala za chladu při konstantním napětí 100V v zaostřovacím gelu a při 300V v rozdělovacím gradientovém gelu. Ke vzorkům i standardu byl přidáván vychlazený 3 x vzorkový pufr v poměru 2 : 1 (vzorek : vzorkový pufr).

Pro vizualizaci vzorků byly gely barveny cca 5 min v barvicím roztoku a poté promyty vodou a odbarveny horkým odbarvovacím roztokem.

3.2.4. Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Pro zjištění okolí lokální dynamiky reportérového Trp v pozicích 289 nebo 299 v GRL α -MPP byla použita metoda časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Měření byla prováděna ve spolupráci s katedrou experimentální biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci (RNDr. Martin Kubala, PhD.) a fyzikálním ústavem Univerzity Karlovy v Praze (doc. RNDr. Petr Heřman, CSc., doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.).

Časově rozlišená fluorescence je měřena pomocí pulsní excitace (délka pulsu je kratší než doba dohasínání fluorescence) nebo pomocí fázově modulovaného budícího záření a umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů, především anizotropie fluorescence. Tato metoda poskytuje informace o rotačních pohybech fluoroforu a jeho bezprostředního okolí.

4. Výsledky

4.1 Záměna tryptofanového zbytku v pozici 223 v α -MPP

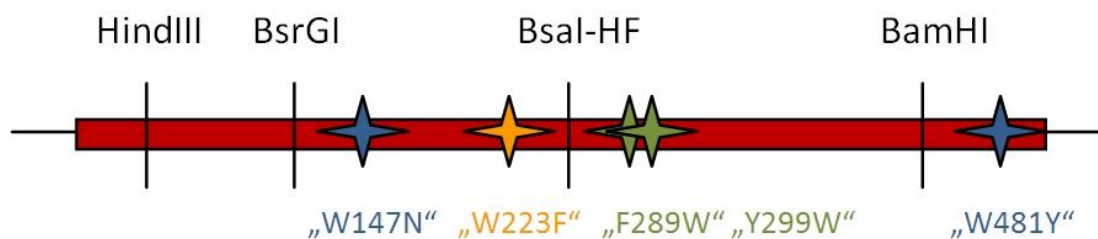
Protein α -MPP kvasinky *S. cerevisiae* nese ve své aminokyselinové sekvenci tři tryptofanové zbytky. V tomto proteinu byly již dříve nahrazeny dva tryptofanové zbytky v pozicích 147 (W147N) a 481 (W481Y). Záměna třetího přirozeně se vyskytujícího tryptofanového zbytku v pozici 223 musela být provedena tak, aby byla zachována stabilita i aktivita proteinu. Byly proto vybrány čtyři aminokyseliny, které jsou svými vlastnostmi nejbližší tryptofanu (aromatické, hydrofobní, s objemným postranním řetězcem aminokyselinového zbytku). Jednalo se o valin, tyrosin, leucin a fenylalanin.

K dispozici byl gen kódující maturovanou podjednotku α -MPP *S. cerevisiae* upravený v předchozím období v naší laboratoři. Produkovaný protein je kratší o 13 aminokyselinových zbytků presekvence a na svém N-konci obsahuje histidinovou kotvu (23 aminokyselinových zbytků), která umožňuje metaloafinitní purifikaci proteinu.

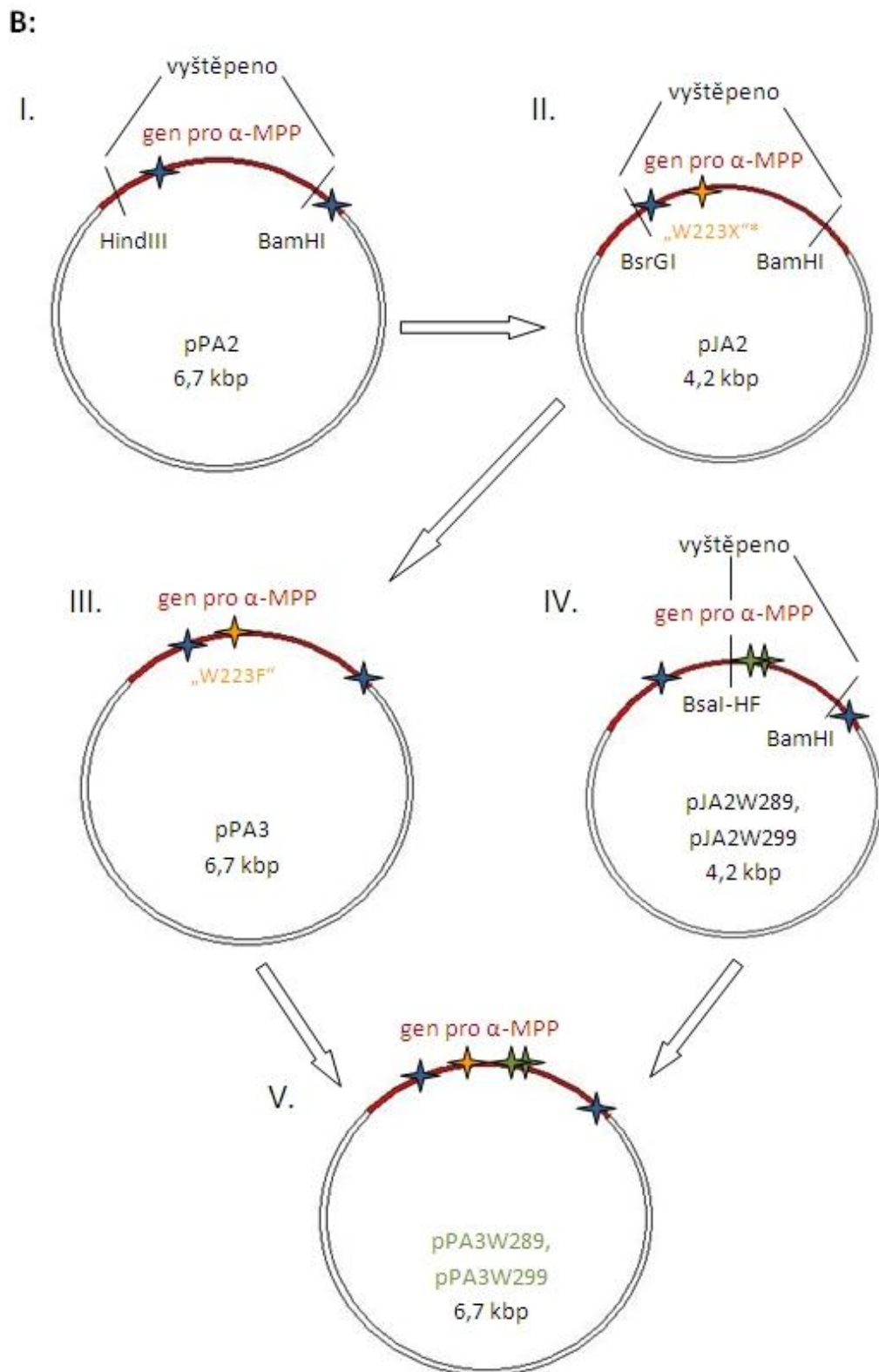
Uvedené pozice tryptofanových zbytků odpovídají původnímu nezkrácenému proteinu, který není fúzován s His-kotvou. Pro přehlednost je však číslování těchto pozic v následujícím textu zachováno.

Postup záměny tryptofanového zbytku v pozici 223 α -MPP znázorňuje Obr. 4.1, část B.

A:



Gen kódující mutantní α -MPP *S. cerevisiae*



Obr. 4.1: Postup záměny tryptofanového zbytku v pozici 223 α -MPP.

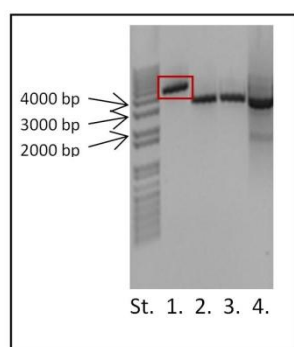
A: Schematické znázornění rozložení unikátních restričních míst v genu pro α -MPP *S. cerevisiae* využitých při přípravě konstruktů. Hvězdičkami jsou označeny oblasti kódující příslušné zaměněné aminokyselinové zbytky.

B: Příprava konstruktů použitých při syntéze bodových změn v genu kódující α -MPP. Podrobné kroky jsou popsány v kapitolách 4.1.1., 4.1.4. a 4.2.

*X = L, V, Y, F

4.1.1. Příprava klonovacího vektoru pJA2

Z expresního vektoru pPA2 byla použitím enzymů HindIII a BamHI vyjmuta část kazety obsahující gen pro α -MPP se zaměněným tryptofanovým zbytkem v pozici 147 (Obr. 4.1). Tato část kazety (1293 bp) byla vložena do klonovacího vektoru pJAKO (2960 bp). Připravený konstrukt byl označen pJA2 (4243 bp). Vektor pJA2 byl transformován do kmene *E. coli* JM109 a buňky byly vysety na AIX misky umožňující modrobílou selekci. Ze tří bílých pozitivních kolonií byl vyizolován plasmid, který byl následně kontrolně naštěpen enzymem HindIII (Obr. 4.2).



Obr. 4.2: Restriční kontrola pJA2. 0,8% agarosový gel. St. = standard, 1. – 3. = pJA2 po ligaci a restrikci HindIII, 4. = pJAKO. Velikosti plasmidu s inzertem odpovídá pouze vzorek č.1.

4.1.2. Amplifikace sekvencí s bodovými záměnami

Při navrhování primerů pro mutaci genu kódující α -MPP, jež vedla k záměně tryptofanového zbytku v pozici 223 za jeden ze čtyř vybraných aminokyselinových zbytků (L, V, Y, F), byl použit kit QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis. Kromě změny nukleotidové sekvence kódující danou substitucí tryptofanového zbytku byla také zavedena tichá mutace, tj. takové restriční místo, které nevede ke změně aminokyselin. Využívá se zde degenerace genetického kódu.

Návrhy primerů obsahující změny nukleotidové sekvence kódující danou substitucí tryptofanového zbytku v pozici 223 spolu s tichými mutacemi:

W223V forward

5' GTATCTCGGTGACGTCCAATCTACACACCCTCCG 3'
AatII

W223Y forward

5' GTATCTCGGTGACTATCAGGTCTACACACCCTCCG 3'
AccI

W223L forward

5' GTATCTCGGTGACCTGCAGGTCTACACACCCTCCG 3'

PstI

W223F forward

5' GTATCTCGGGGACTTCCAATCTACACACCCTCCG 3'

AvaI

Pozn.: Červeně je označen triplet kódující danou aminokyselinu zaměněnou za tryptofanový zbytek v pozici 223, tučně jsou označeny nukleotidy, které se liší od sekvence genu pro α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* a podtržené nukleotidy označují sekvenci rozpoznávanou danou restriční endonukleasou (tichá mutace).

Mutagenese byla provedena na vektoru pJA2 pomocí PCR s použitím *PfuUltra* HF polymerasy a specifických forward a reverse primerů pro jednotlivé bodové změny. Během každého cyklu PCR reakce byl syntetizován celý plasmid. Složení PCR směsi a podmínky PCR jsou uvedeny v Tab. 4.1 a Tab. 4.2.

Tab. 4.1: Složení PCR směsi pro mutagenesi tryptofanového zbytku v pozici 223:

Primery (W223X* forward a reverse)	125 ng (každý)
Templát (pJA2)	50 ng
dNTP mix	10 mM (celkem)
10 x pufr pro <i>PfuUltra</i> HF DNA polymerasu	1 / 10 objemu
<i>PfuUltra</i> HF DNA polymerasa	2,5 U
dH ₂ O	doplnit na celkový objem 50 μ l

*X = L, V, Y, F

Tab. 4.2: Výchozí podmínky PCR pro mutagenesi tryptofanového zbytku v pozici 223:

Fáze amplifikace	[°C]	[min]	Počet cyklů
1. denaturace	98	0,5	} 30
2. a. denaturace	98	0,17	
b. hybridizace	50	0,5	
c. syntéza	72	1,5	}
3. závěrečná syntéza	72	5	

Po skončení amplifikace sekvencí s bodovými záměnami byl ke směsi přidán 1 µl DpnI (10 U) restriční enzym a směs byla inkubována 1 h při 37 °C, čímž došlo k naštěpení templátové methylované DNA.

Amplifikovaná nemethylovaná DNA s příslušnou mutací byla transformována do superkompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue. Pro kultivaci byl použit NZY⁺ bujón a buňky byly poté vysety na plotny s LB agarem a přidavkem ampicilinu.

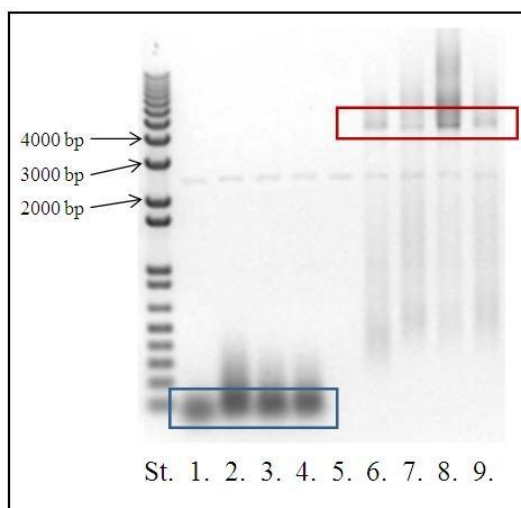
Na miskách, které byly kultivovány přes noc, nenarosty žádné kolonie, proto bylo nutné mutagenezi zopakovat. Mutagenní PCR probíhala nejprve za původních podmínek, poté následovala řada experimentů s variacemi v koncentraci primerů, použité polymerase, přidávaných aditivech aj. Na Obr. 4.3 je patrná tvorba dimeru primerů při koncentraci primerů v reakci 100 pmol / µl. Dimerizované primery nenasedly na templátovou DNA a k amplifikaci sekvence nedošlo. Proto byly podmínky reakce optimalizovány.

Optimální složení PCR směsi je shrnuto v Tab. 4.3. Vzniklé plasmidy byly označeny pJA2W223X*.

Tab. 4.3: Optimalizované složení PCR směsi pro mutagenezi tryptofanového zbytku v pozici 223:

Primery (W223X* forward a reverse)	10 ng (každý)
Templát (pJA2)	15 ng
dNTP mix	10 mM (celkem)
Betain	7,625 µg
5 x Phusion GC Buffer	1 / 5 objemu
Phusion Hot Start polymerasa	1 U
dH ₂ O	doplnit na celkový objem 50 µl

*X = L, V, Y, F



Obr. 4.3: Amplifikace sekvencí s bodovými záměnami pomocí PCR. 0,8% agarosový gel. St. = standard, 1. – 4.: koncentrace primerů v reakci byla 100 pmol / μ l. 1. = mutace vedoucí k záměně W223L, 2. = mutace vedoucí k záměně W223V, 3. = mutace vedoucí k záměně W223F, 4. = mutace vedoucí k záměně W223Y. V modrém rámečku jsou označeny dimery primerů, které nenasedly na templátovou DNA, 5. = negativní kontrola (do reakce nebyla přidána polymerasa). 6. – 9.: koncentrace primerů v reakci byla 5 pmol / μ l. 6. = mutace vedoucí k záměně W223L, 7. = mutace vedoucí k záměně

W223V, 8. = mutace vedoucí k záměně W223F, 9. = mutace vedoucí k záměně W223Y. V červeném rámečku jsou vidět amplifikované sekvence s bodovými záměnami o velikosti 4,2 kbp odpovídající velikosti vzniklého plasmidu pJA2W223X*.

*X = L, V, Y, F

Amplifikovaná nemetylovaná DNA s příslušnou mutací byla transformována do superkompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue.

Z narostlých kolonií každé mutace byla provedena koloniová PCR za účelem ověření úspěšné transformace amplifikovaného úseku obsahující mutace. Očekávaný fragment byl dlouhý 733 bp. Složení směsi pro koloniovou PCR a podmínky koloniové PCR jsou uvedeny v Tab. 4.4 a Tab. 4.5.

Tab. 4.4: Složení směsi pro koloniovou PCR, která byla provedena za účelem kontroly úspěšné transformace amplifikovaného úseku DNA do buněk *E. coli* XL1-Blue:

Primer SacI F	20 pmol
Primer NsiI R	20 pmol
dNTP mix	10 mM (celkem)
10 x LA pufr	1 / 10 objemu
LA polymerasa	5 U
dH ₂ O	doplnit na celkový objem 50 μ l

Templátová DNA jednotlivých mutací byla do reakce nanášena sterilním párátkem jako celá kolonie narostlá na misce s pevným agarem.

Tab. 4.5: Podmínky koloniové PCR, která byla provedena za účelem kontroly úspěšné transformace amplifikovaného úseku DNA do *E. coli* XL1-Blue:

Fáze amplifikace	[°C]	[min]	Počet cyklů
1. denaturace	94	10	
2. přidavek enzymu	65	---	
3. a. denaturace	94	0,25	} 21
b. hybridizace	50	0,5	
c. syntéza	68	4	
4. závěrečná syntéza	72	5	

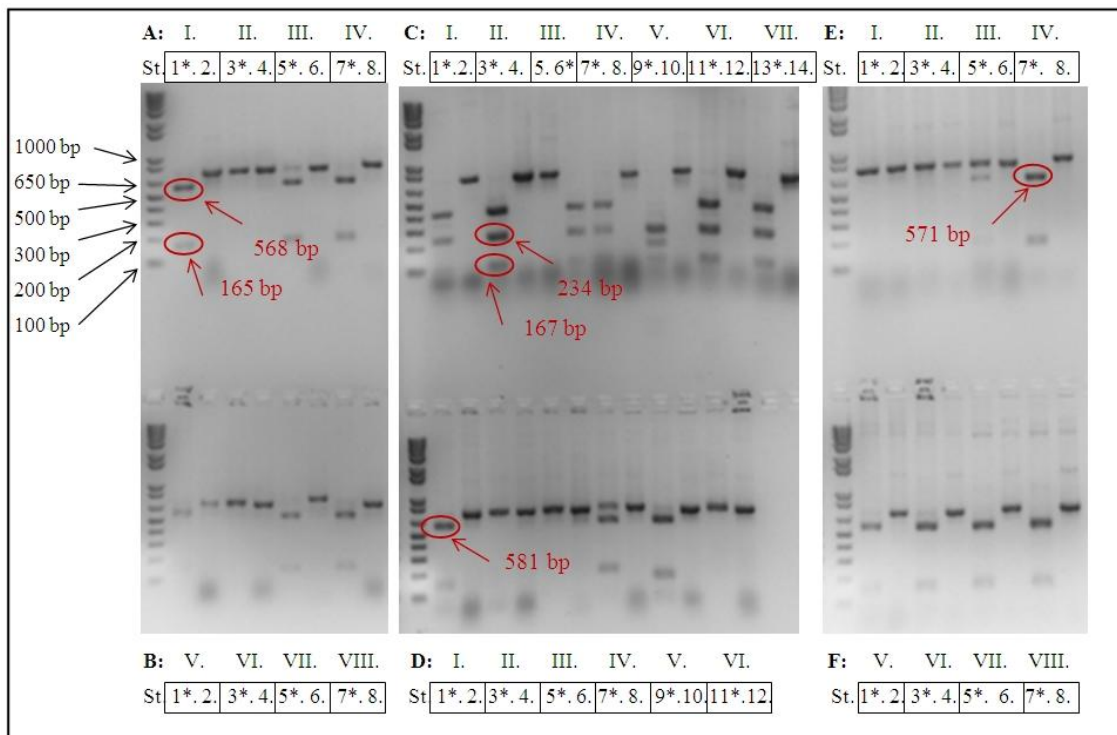
Amplifikovaný úsek DNA byl podroben restriční kontrole restričními endonukleasami štěpícími v místech vzniklých tichou mutací (Obr. 4.4). Velikosti očekávaných fragmentů shrnuje Tab. 4.6.

Tab. 4.6: Očekávané fragmenty amplifikované DNA po štěpení restričními endonukleasami.

Amplifikovaný úsek DNA / použitý restriční enzym	Velikosti fragmentů po štěpení příslušnými restričními endonukleasami (bp)
SacIF-NsiIR – F / AvaI	152, 581
SacIF-NsiIR – V / AatII	162, 571
SacIF-NsiIR – L / PstI	165, 568
SacIF-NsiIR – Y / AccI	167, 234, 332

SacIF-NsiIR označuje primery ohraničující amplifikovanou sekvenci dlouhou 733 bp. F, V, L, Y označují aminokyselinové zbytky v pozici 223 proteinu α -MPP, které vznikly na základě bodových mutací genu pro α -MPP.

Z vybraných pozitivních transformantů každé mutace byla izolována plasmidová DNA použitím kitu Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega) a správnost mutovné sekvence byla ověřena pomocí sekvenace.



Obr. 4.4: Restriční kontrola amplifikovaných úseků jednotlivých mutací. 2% agarosový gel. St. = standard, A, B: kontrolní restrikce enzymem PstI štěpícím v místě tiché mutace, která byla zavedena spolu s nukleotidovými sekvencemi vedoucími k záměně W223L. Analyzovány byly amplifikované úseky z 8 vybraných kolonií (I. – VIII.), C: kontrolní restrikce enzymem AccI štěpícím v místě tiché mutace, která byla zavedena spolu s nukleotidovými sekvencemi vedoucími k záměně W223Y. Analyzovány byly amplifikované úseky ze 7 vybraných kolonií (I. – VII.), D: kontrolní restrikce enzymem AvaI štěpícím v místě tiché mutace, která byla zavedena spolu s nukleotidovými sekvencemi vedoucími k záměně W223F. Analyzovány byly amplifikované úseky ze 6 vybraných kolonií (I. – VI.), E, F: kontrolní restrikce enzymem AatII štěpícím v místě tiché mutace, která byla zavedena spolu s nukleotidovými sekvencemi vedoucími k záměně W223V. Analyzovány byly amplifikované úseky z 8 vybraných kolonií (I. – VIII.). Čísla vzorků označená hvězdičkou jsou po štěpení příslušnými restriktasami. Očekávané fragmenty amplifikované DNA po štěpení příslušnými restriktasami jsou uvedeny v Tab. 4.6.

4.1.3. Přenos mutovaného úseku kazety do expresního vektoru pPA2

Vzhledem k tomu, že se opětovně nepodařilo vyštěpit daný úsek kazet z pJA2W223X* použitím restričních enzymů BamHI a HindIII, byl místo HindIII použit enzym BsrGI (Obr. 4.1). Vyštěpené fragmenty byly vloženy zpět do expresního vektoru pPA2. Vzniklé vektory označené pPA2W223X* byly transformovány do buněk *E. coli* JM109. Z vyrostlých kolonií každé mutace byl izolován plasmid, který byl

následně kontrolně naštěpen danými restrikcími endonukleasami štěpícími v místech vzniklých tichou mutací. Vybrané pozitivní vzorky byly ověřeny sekvenací.

Následovaly pokusné práce s rekombinantními proteiny produkovanými buňkami *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL na základě připravených konstruktů. Expres a purifikace beztryptofanových forem α -MPP, vytvoření dimerů MPP a následné testování aktivit těchto forem MPP bylo náplní práce Ing. Anny Matuškové. Nejvyššího výtěžku při purifikaci beztryptofanové α -MPP a zároveň největší aktivitu téměř srovnatelnou s MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* vykazovala α -MPP s náhradou W-223-F. V dalších experimentech byla proto používána již jen tato varianta beztryptofanové α -MPP. Expresní vektor obsahující gen kódující α -MPP se všemi zaměněnými tryptofanovými zbytky byl označen pPA3.

*X = L, V, Y, F

4.2. Příprava konstruktů kódujícího reportérovou α -MPP

Poté, co byl úspěšně vytvořen expresní vektor obsahující gen pro α -MPP bez všech tří přirozeně se vyskytujících tryptofanových zbytků, bylo potřeba naopak zavést reportérový tryptofanový zbytek do určitého místa v glycinové smyčce. Takto upravený protein je v následujícím textu i při vědomí nepřesnosti označován jako „reportérová α -MPP“.

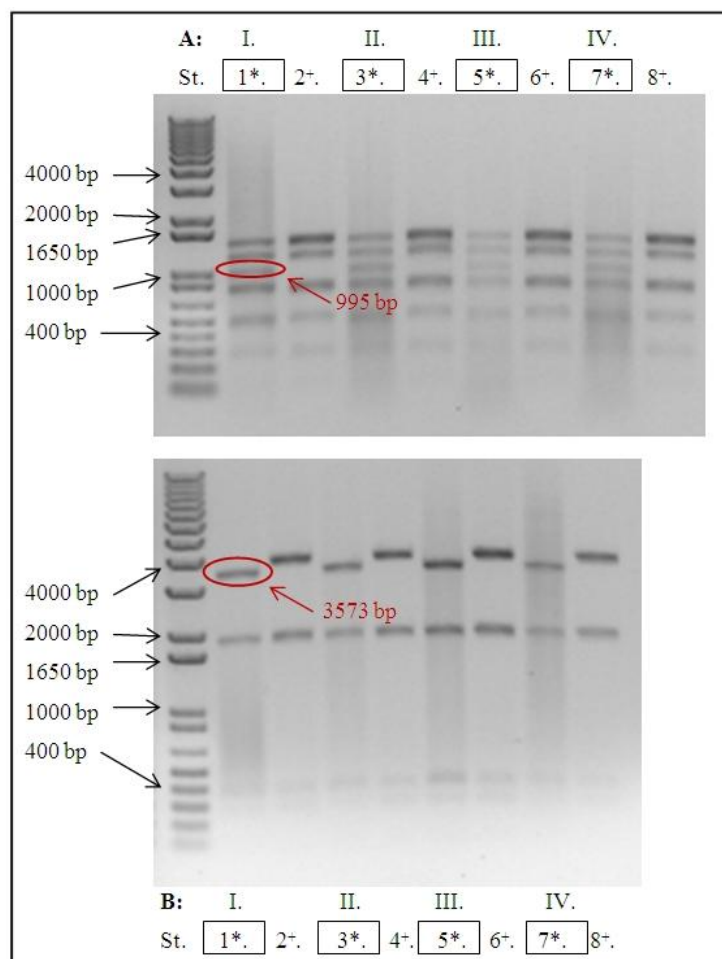
V pozicích 299 a 303 je vhodná aromatická aminokyselina tyrosin a v pozici 289 je aromatická aminokyselina fenylalanin. V naší laboratoři byly v předchozím období připraveny klonovací vektory obsahující gen pro α -MPP s reportérovými tryptofanovými zbytky v pozicích 289 nebo 299 (pJA2W289 a pJA2W299), proto byla zvolena právě tato místa.

Do kmene *E. coli* GM2929, který je bez methylační aktivity, byly transformovány vektory pPA3, pJA2W289 a pJA2W299. Kmen neschopný methylace byl použit z důvodu, že enzym BsaI-HF, posléze použitý na opracování vektoru, neštěpí methylovanou DNA. Plasmidy pJA2W289 a pJA2W299 byly vyizolovány a opracovány enzymy BsaI-HF a BamHI (Obr. 4.1). Získané fragmenty byly rozděleny elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Fragment o velikosti 552 bp, nesoucí nukleotidové sekvence kódující tryptofanový zbytek v pozici 289 popř. 299, byl z gelu vyizolován. Plasmid pPA3 byl taktéž vyizolován a opracován enzymy BsaI-HF a

BamHI a fragment o velikosti 6161 bp byl oddělen pomocí elektroforézy v 0,7% agarosovém gelu. Restrikční místo BsaI-HF leží vně vyměňované části sekvence genu pro α -MPP, proto při výměně části genu nedošlo ke ztrátě místa kódující zaměněný tryptofanový zbytek v pozici 223 (Obr. 4.1, část A). Do takto opracovaného expresního vektoru (6161 bp) byl vložen připravený fragment (552 bp) z pJA2W289 popř. pJA2W299. Připravené konstrukty byly označeny pPA3W289 a pPA3W299.

Ligace probíhala za dvou různých podmínek. Jednak po dobu jedné hodiny a jednak po dobu 18 h. Lepších výsledků bylo dosaženo, pokud ligace probíhala 1 h, kdy na negativní kontrole nevyrostly žádné kolonie. Po 18 hodinové ligaci vyrostly kolonie i na agarové plotně s negativní kontrolou.

Po izolaci plasmidů obsahující gen pro α -MPP s jediným tryptofanovým zbytkem v reportérové pozici následovalo kontrolní štěpení danými restrikčními endonukleasami štěpícími v místech vzniklých tichou mutací. Tato místa byla zavedena spolu se záměnou nukleotidové sekvence vedoucí k zavedení reportérového tryptofanového zbytku v pozicích 289 (restrikční místo vzniklé tichou mutací rozpoznávané enzymem BstYI) a 299 (restrikční místo vzniklé tichou mutací rozpoznávané enzymem AvaII). Výrazný očekávaný fragment v případě štěpení enzymem BstYI u pPA3W289, který se u výchozího konstruktu pPA3 nevyskytuje, má velikost 995 bp (Obr. 4.5). Výrazným posunem u pPA3W299 oproti pPA3 je odštěpení fragmentu o velikosti 390 bp z 3964 bp velkého fragmentu (Obr. 4.5). Sekvence obou variant genu kódující reportérový tryptofanový zbytek v pozici 289 nebo 299 byla ověřena sekvenací.



Obr. 4.5: Restrikční kontrola pPA3W289 a pPA3W299. 0,8% agarosový gel. St. = standard, A: kontrolní restrikce pPA3W289 enzymem BstYI ze 4 vybraných kolonií (I. – IV.), B: kontrolní restrikce pPA3W299 enzymem AvaII ze 4 vybraných kolonií (I. – IV.). Čísla vzorků označená hvězdičkou odpovídají pPA3W289 popř. pPA3W299 po naštěpení příslušnými restriktásami, čísla vzorků označená symbolem „plus“ odpovídají pPA3 po naštěpení restriktásami.

4.3. Příprava proteinů α -MPP, β -MPP a substrátů

Před samotným testováním aktivity MPP obsahující reportérovou α -MPP, bylo třeba připravit obě podjednotky MPP a všechny substráty (prekurzor kvasinkové MDH s fúzovanou presekvencí z kvasinky, myši a melounu).

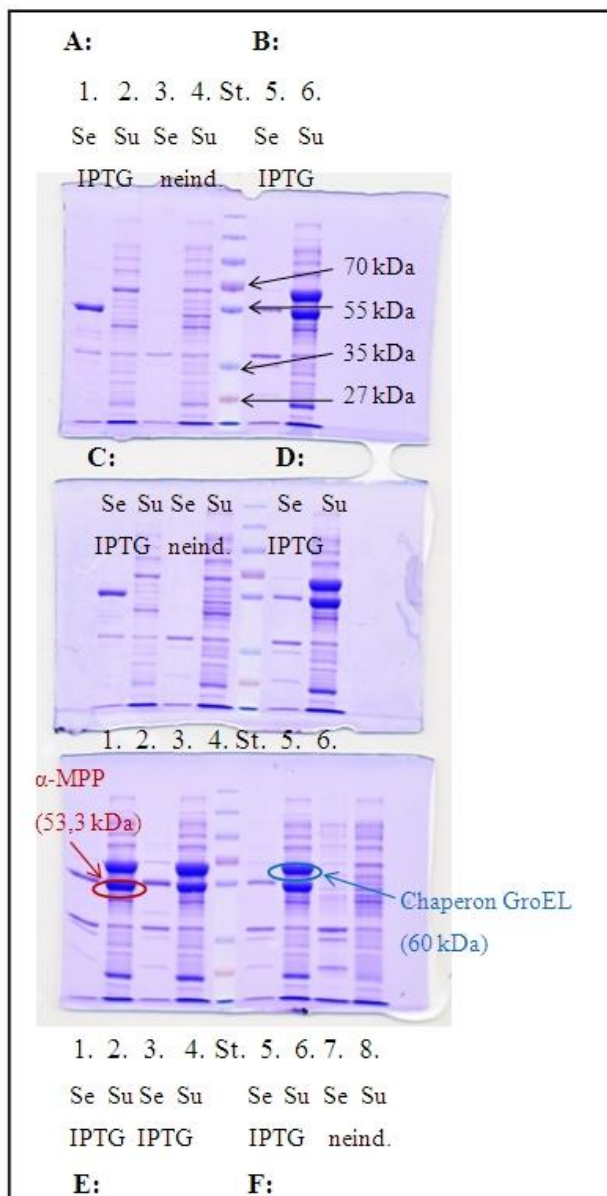
4.3.1. Nadprodukce a purifikace α -MPP

Vektory pPA3W289, pPA3W299 a pPA3 byly transformovány do buněk *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL. V těchto buňkách dochází ke koexpresi α -MPP s chaperony GroES a GroEL, jež jsou nezbytné pro správné složení proteinu α -MPP. Testování exprese (kapitola 3.2.3.1) α -MPP bylo provedeno za dvou podmínek. Jednak po dobu 1

h při 37 °C, což jsou standardní podmínky, za kterých je protein α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* exprimován, a jednak za snížené teploty (20 °C) a za prodloužené doby inkubace (12 – 18 h). Takto upravené podmínky byly testovány z důvodu pozměněné sekvence proteinu α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem (celkem čtyři pozměněné zbytky), proto se dal očekávat delší čas nutný ke správnému sbalení proteinu tak, aby zůstal v rozpustné formě. Nižší teplota, která způsobuje zpomalení buněčných procesů, včetně produkce proteinů, tomuto procesu napomáhá a zvyšuje podíl proteinu zaujímající po sbalení správnou aktivní konformaci.

Po uplynutí dané doby inkubace byla exprese ukončena a byl připraven buněčný lyzát. Vzorky rozpustné a nerozpustné frakce byly podrobeny analýze na SDS-PAGE. Z Obr. 4.6 je patrné, že během kultivace při 37 °C se α -MPP (PA3W289) ani α -MPP (PA3W299) v supernatantu vůbec netvořila, pouze malé množství se nacházelo v sedimentu. Naopak při 20 °C postindukční kultivaci zůstávala většina proteinu v rozpustné formě.

α -MPP byla z rozpustné frakce purifikována podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3.3.

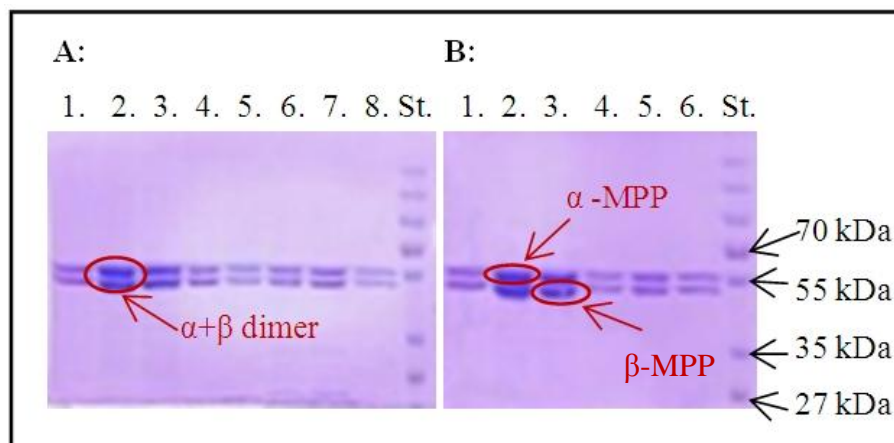


Obr. 4.6: Analýza exprese α -MPP s reportérovými tryptofanovými zbytky v pozicích 289 nebo 299 a beztryptofanové α -MPP. Porovnání podmínek exprese. 8% SDS-PAGE. A = 37 °C, α -MPP (PA3W289), B, D a F = 20 °C, α -MPP (PA3), C = 37 °C, α -MPP (PA3W299), E: 1. – 2. = 20 °C, α -MPP (PA3W289), E: 3. – 4. = 20 °C, α -MPP (PA3W299). St = standard, Se = sediment, Su = supernatant, IPTG = indukce tvorby proteinu, neind. = kultivace bez indukce.

4.3.2. Nadprodukce β -MPP, spojení podjednotek a purifikace dimeru

Vektor pETYB byl transformován do kmene *E. coli* BL21(DE3). Protože β -MPP se produkuje ve formě inkluzních tělísek v nerozpustné frakci, je potřeba inkuzní tělíska denarovat a protein převést do rozpustné formy. Denaturace probíhala pomocí denaturačního pufru obsahujícího 8 M močovinu. Protein byl následně renarován při dialýze, kdy dochází k odstranění močoviny výměnou za pufr bez močoviny. Následnou centrifugací byla získána rozpustná frakce obsahující β -MPP, která byla analyzována na SDS-PAGE. β -MPP byla poté spojena s α -MPP (z divokého kmene *S. cerevisiae* nebo PA3W289 popř. PA3W299; spojení podjednotek viz. kapitola 3.2.3.4.).

Dimerní forma MPP byla izolována zachycením na Ni-sepharosovou kolonku za His-kotvu umístěnou na N-konci α -MPP a uvolněna pufrům obsahujícím 250 mM imidazol. Odstranění imidazolu z prostředí proteinů (odsolení) bylo spojeno s výměnou pufrů. Tento krok byl proveden pomocí gelové chromatografie (kapitola 3.2.3.3.). Kontrola čistoty dimeru byla zjištěna pomocí SDS-PAGE.



Obr. 4.7: Kontrola čistoty dimeru MPP. 8% SDS-PAGE. Jednotlivé frakce po odsolení dimeru MPP. St. = standard, A: MPP obsahující α -MPP (PA3W289), B: MPP dimer z divokého kmene *S. cerevisiae*.

4.3.3. Ověření aktivity dimeru MPP se substráty

Dimer MPP obsahující buď α -MPP (PA3W289), α -MPP (PA3W299) nebo α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* byl podroben ověření aktivity přidáním prekurzoru kvasinkové MDH (purifikace substrátu viz. kapitola 3.2.3.3.) s presekvencí z myši (pMyMDH), melounu (pWyMDH) a kvasinky (pYMDH). Reakce probíhaly po dobu 30 min při 30 °C a byly ukončeny přidáním vzorkového pufru a následně analyzovány na SDS-PAGE. Vzhledem k tomu, že i reportérové formy α -MPP štěpily presekvence prekurzorů MDH, bylo možné přistoupit k podrobnému testu aktivit těchto forem dimeru vzhledem k dimeru MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*.

4.4. Podrobný test aktivity dimeru MPP se třemi substráty

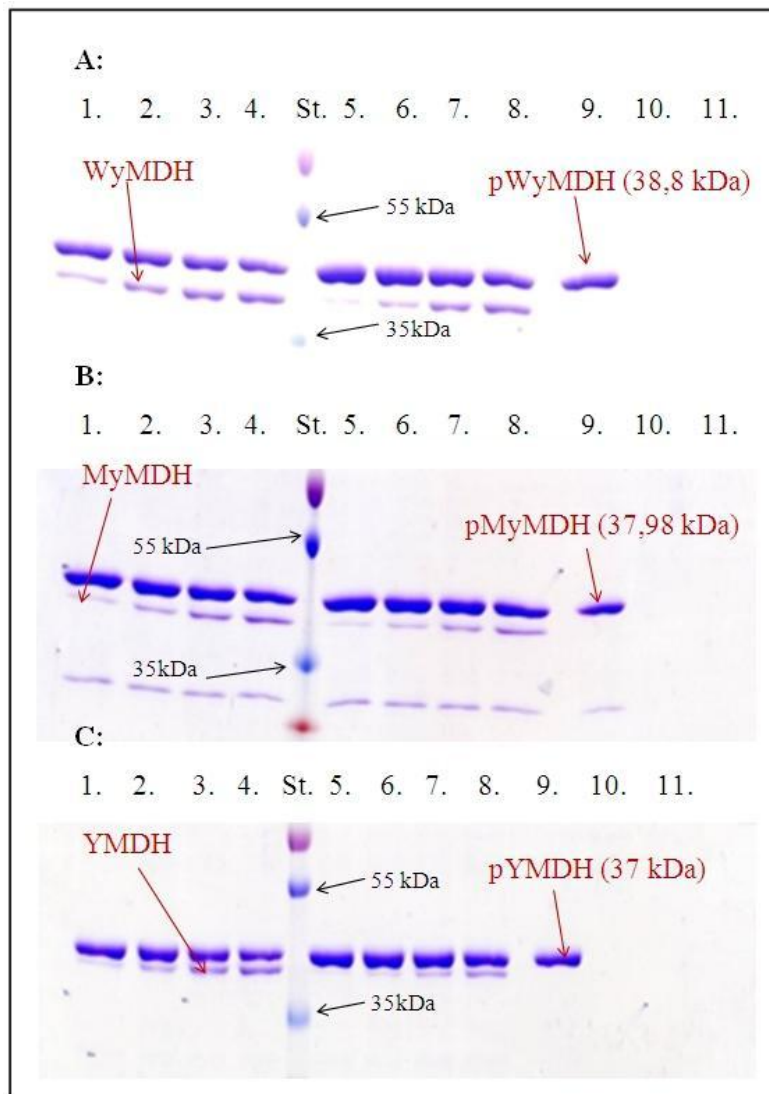
Aby bylo možné porovnat aktivitu dimeru obsahujícího α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) s dimerem z divokého kmene *S. cerevisiae*, bylo potřeba zachytit čas, ve kterém byl nárůst produktu lineární. Tento časový úsek je velmi krátký (několik minut). Přeměna substrátu na protein bez presekvence rozpoznávané MPP byla měřena v čase 1, 2, 4 a 8 min. Substrát byl přidáván v nadbytku, aby i po uplynutí 8 minut zůstala většina substrátu nepřeměněna. Pro porovnání aktivity dimerů MPP bylo

potřeba vložit do reakce stejné množství enzymů. Dále je také nutné znát vhodný poměr enzym : substrát, kdy je na gelu dobře patrná přeměna substrátu.

Výsledky porovnání aktivit forem MPP s reportérovou α -MPP a MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* jsou uvedeny v Tab. 4.7, na Obr. 4.8. a na Obr. 4.9.

Tab. 4.7: Aktivity MPP obsahující α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) s pMDH obsahující presekvenci z melounu, myši a kvasinky.

reportérová forma α -MPP / přidaný substrát	Relativní enzymatická aktivita (% aktivity ve srovnání s MPP z divokého kmene <i>S. cerevisiae</i>)
α -MPP (PA3W289) / pWyMDH	60 – 70
α -MPP (PA3W289) / pMyMDH	70 – 80
α -MPP (PA3W289) / pYMDH	60
α -MPP (PA3W299) / pWyMDH	90
α -MPP (PA3W299) / pMyMDH	120
α -MPP (PA3W299) / pYMDH	70 - 80



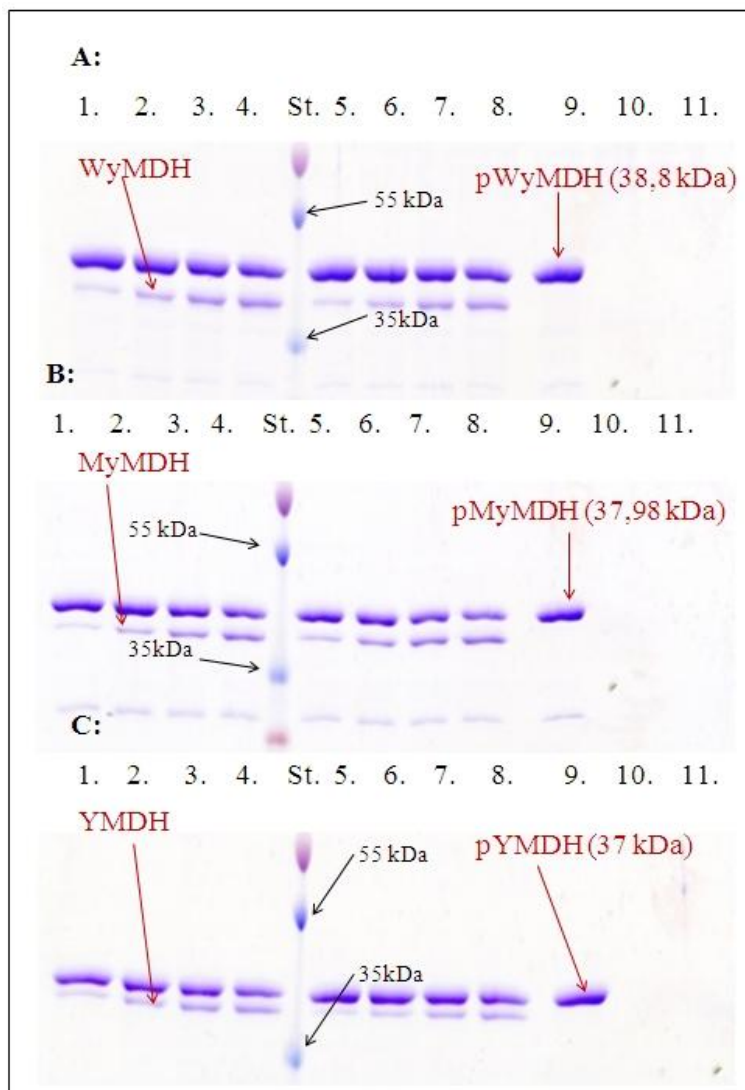
Obr. 4.8: Srovnání aktivity MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* s MPP obsahující α -MPP (PA3W289). 8% SDS-PAGE.

A: Aktivita MPP s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenci z melounu. 1. – 4. = aktivita MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*: 1. = aktivita po 1 min, 2. = aktivita po 2 min, 3. = aktivita po 4 min, 4. = aktivita po 8 min. St. = standard. 5. – 8. = aktivita MPP s reportérovou α -MPP : 5. = aktivita po 1 min, 6. = aktivita po 2 min, 7. = aktivita po 4 min, 8. = aktivita po 8 min, 9. = NK1 (substrát bez enzymu), 10. = NK2 (samotná MPP z divokého kmene), 11. = NK3 (samotná MPP s reportérovou α -MPP). MPP odštěpuje presekvenci dlouhou 27 AK. Aktivita MPP obsahující α -MPP (PA3W289) ve srovnání s divokým kmenem se pohybuje mezi 60 – 70 %.

B: Aktivita MPP s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenci z myši. Podmínky jsou stejné viz A. MPP odštěpuje presekvenci dlouhou 17 AK. Aktivita MPP obsahující α -MPP (PA3W289) ve srovnání s divokým kmenem se pohybuje mezi 70 – 80 %.

C: Aktivita MPP s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenci z kvasinky. Podmínky jsou stejné viz A. MPP odštěpuje presekvenci dlouhou 9 AK. Aktivita MPP obsahující α -MPP (PA3W289) ve srovnání s divokým kmenem se pohybuje okolo 60 %.

Pozn.: WyMDH, MyMDH a YMDH – jedná se o stejně velkou formu kvasinkové MDH po odštěpení různé dlouhých presekvencí.



Obr. 4.9: Srovnání aktivity MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* s MPP obsahující α -MPP (PA3W299). 8% SDS-PAGE.

A: Aktivita MPP s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenční z melounu. 1. – 4. = aktivita MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*: 1. = aktivita po 1 min, 2. = aktivita po 2 min, 3. = aktivita po 4 min, 4. = aktivita po 8 min. St. = standard. 5. – 8. = aktivita MPP s reportérovou α -MPP: 5. = aktivita po 1 min, 6. = aktivita po 2 min, 7. = aktivita po 4 min, 8. = aktivita po 8 min, 9. = NK1 (substrát bez enzymu), 10. = NK2 (samotná MPP z divokého kmene), 11. = NK3 (samotná MPP s reportérovou α -MPP). MPP odštěpuje presekvenční dlouhou 27 AK. Aktivita MPP obsahující α -MPP (PA3W299) ve srovnání s divokým kmenem se pohybuje okolo 90 %.

B: Aktivita MPP s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenční z myši. Podmínky jsou stejné viz A. MPP odštěpuje presekvenční dlouhou 17 AK. Aktivita MPP obsahující α -MPP (PA3W299) ve srovnání s divokým kmenem se pohybuje okolo 120 %.

C: Aktivita MPP s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenční z kvasinky. Podmínky jsou stejné viz A. MPP odštěpuje presekvenční dlouhou 9 AK. Aktivita MPP obsahující α -MPP (PA3W299) ve srovnání s divokým kmenem se pohybuje mezi 70 – 80 %.

Pozn.: WyMDH, MyMDH a YMDH – jedná se o stejně velkou formu kvasinkové MDH po odštěpení různých dlouhých presekvencí.

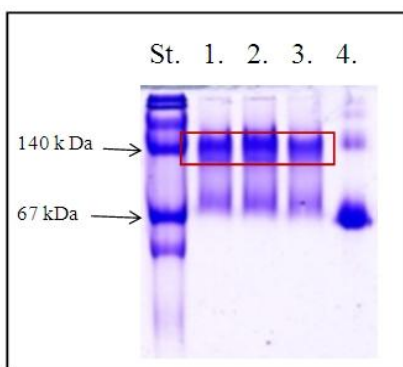
4.5. Měření časově rozlišené fluorescence reportérového tryptofanového zbytku

Poté, co bylo prokázáno, že formy MPP obsahující reportérovou α -MPP vykazují dostatečnou aktivitu, mohlo se přistoupit k samotnému měření změny pohyblivosti glycinové smyčky α -MPP po navázání substrátu. Fluorescence tryptofanového zbytku byla měřena v Olomouci na Katedře experimentální biofyziky RNDr. Martinem Kubalou, PhD. Substráty byly připraveny předem, avšak α -MPP (PA3W289) a α -MPP (PA3W299) musely být připraveny v den měření. Nejprve bylo nutné zjistit, zda substráty nevykazují vysokou anizotropii, což by znesnadnilo měření. Substráty neobsahují žádný tryptofanový zbytek, který by vykazoval fluorescenci, ale pokud by nebyl dostatečně odmyt imidazol, mohl by dávat nežádoucí signál. Molární poměr enzym : substrát by měl být během měření 1 : 1, do reakce byl však přidán nadbytek substrátu. Koncentrace α -MPP v kyvetě během měření byla 0,1 mg / ml. Tato nízká koncentrace je proto, že ze zkušenosti je α -MPP o koncentraci větší než 0,2 mg / ml nestabilní, a to především za vyšších teplot. Pufr, ve kterém byly vzorky měřeny, obsahoval 50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2M močovinu, pH 7,4. Měření probíhalo za pokojové teploty.

Výsledkem prvního měření bylo zjištění, že α -MPP tvoří agregáty, proto nebylo možné změřené vzorky vyhodnotit. Následným krokem bylo zjištění stability α -MPP pomocí nativní elektroforézy. Snahou bylo zjistit, zda byla α -MPP ve formě agregátů již před měřením, nebo zda silný impuls z laseru způsobil agregaci proteinu.

4.5.1. Zjištění stability proteinu pomocí nativní elektroforézy

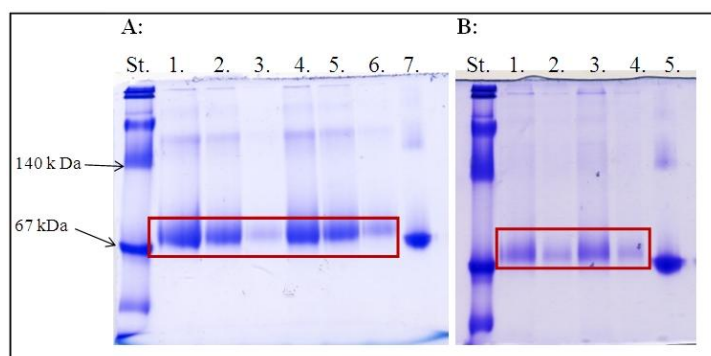
Po odsolení byly vzorky α -MPP (PA3W299) z jednotlivých frakcí analyzovány pomocí nativní elektroforézy (Blue-Native PAGE). Během purifikace byl protein uchovávan na ledu, avšak roztoky a kolonky byly nechlazené. Z Obr. 4.10 je vidět, že protein je za těchto podmínek převážně ve formě dimeru. Pro kontrolu velikosti proteinu byl použit BSA, který odpovídá velikosti 67 kDa. α -MPP v polyakrylamidovém gelu putovala pomaleji a velikost její monomerní formy se jevila jako 70 kDa. Tento způsob zjišťování míry agregace je pouze orientační, pro naše účely však dostačující.



Obr. 4.10: Zjištění míry agregace proteinu α -MPP (PA3W299) za méně chlazených podmínek pomocí Blue-Native PAGE. St. = standard, 1. – 3. = jednotlivé frakce α -MPP (PA3W299) po odsolení. Protein je převážně ve formě dimeru, 4. = BSA o velikosti 67 kDa.

Následná purifikace byla důsledně chlazená, chlazené byly i roztoky a kolonky. Byla připravena tři ředění vypurifikovaného proteinu α -MPP (PA3W299): 0,8 mg / ml, 0,4 mg / ml a 0,1 mg / ml. K naředěným vzorkům byla přidána aditiva, která měla pomoci stabilitě proteinu. Jednalo se o betain o koncentraci 75 mM nebo dodecylmaltosid o koncentraci 0,2 mM. Pro srovnání byl použit i protein α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 299 a s jedním přirozeně se vyskytujícím tryptofanovým zbytkem v pozici 223; α -MPP (PA2W299), u kterého již bylo měření časově rozlišené fluorescenční spektroskopie reportérového tryptofanového zbytku prováděno dříve. (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). Z Obr. 4.11 je zřejmé, že se většina proteinu obou forem nacházela v monomerní formě.

Takto připravená α -MPP (PA3W299) byla stabilní i po 4 dnech jak v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tak při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 4.11: Zjištění míry agregace proteinu α -MPP (PA3W299) za důsledně chlazených podmínek pomocí Blue-Native PAGE. St. = standard, A: 1. – 6. = jednotlivé frakce α -MPP (PA3W299) po odsolení. Protein je převážně ve formě monomeru, 7. = BSA o velikosti 67 kDa. B: 1. – 4. =

jednotlivé frakce α -MPP (PA2W299) po odsolení. Protein je převážně ve formě monomeru, 5. = BSA o velikosti 67 kDa.

Závěrem lze shrnout, že s největší pravděpodobností byl protein agregován až po ozáření silným laserem. Z tohoto důvodu nebylo možné dále tento laser pro změření vzorků použít. Další experimenty byly tedy prováděny ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc na Katedře biofyziky Univerzity Karlovy v Praze, která vlastní laser umožňující měření časově rozlišené fluorescence.

4.5.2. Optimalizace podmínek pro měření časově rozlišené fluorescence

Během měření byla koncentrace α -MPP v kyvetě nízká (0,1 mg / ml), což znesnadňovalo odečítání pozadí, které bylo při nízké koncentraci proteinu velmi vysoké. Pro další měření byla proto koncentrace α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) zvýšena na 0,6 mg / ml, což mělo pomoci při vyhodnocování dat.

Dalším faktorem, který negativně ovlivňuje výsledky měření, je vysoký obsah močoviny v pufru. Substrát je během purifikace odsolen do pufru obsahující 4 M močovinu, avšak ideálně by se množství močoviny v kyvetě během měření mělo pohybovat pod 1 M. Bylo tedy nutné mít k dispozici velmi vysokou koncentraci substrátu, aby podíl substrátu v reakci činil maximálně 20 % objemu. Takto vysoké koncentrace substrátu (bylo potřeba dosáhnout koncentrace 2 - 3 mg / ml) nelze získat pouhou purifikací proteinu a je třeba jednotlivé frakce obsahující substrát zakonzentrovat. Avšak v souladu s předešlými zkušenostmi při práci s α -MPP došlo při smíchání příliš koncentrovaného substrátu s koncentrovanou α -MPP k vysrážení proteinů a měření nebylo možné provést.

Vzhledem k tomu, že měření, které pro každý vzorek trvá cca 30 – 60 min, probíhá při teplotě 16 °C, bylo dále potřeba zjistit, zda je protein α -MPP i při nízké koncentraci 0,1 mg / ml za této teploty stabilní. Ze zkušeností naší laboratoře má α -MPP větší aktivitu v HEPES pufru, avšak stabilnější je v Tris pufru. Proto byly vyzkoušeny obě varianty pufrů při kontrolní reakci zjišťující stabilitu proteinu při 16 °C po dobu 1 h. Následovala řada experimentů simulující podmínky během měření s variacemi v koncentraci jednotlivých proteinů účastnících se reakce a ve složení pufru obsahující také různá aditiva.

Optimální podmínky, za kterých byly vzorky změřeny, jsou následující:

Konečná koncentrace v kyvetě: α -MPP (PA3W289) popř.
 α -MPP (PA3W299) = 0,1 mg / ml
 Substrát (pYMDH) = 0,2 mg / ml
 Konečné složení pufru v kyvetě: 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 M močovina,
 0,2 mM DDM, 10% glycerol, pH 8,6.

Výsledky měření, které bylo úspěšné, jsou uvedeny v Tab. 4.7 a na Obr. 4.12:

Tab. 4.8: Parametry dohasínání anizotropie α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 289 popř. 299 v pufru obsahující 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 M močovinu, 0,2 mM DDM, 10% glycerol, pH 8,6.

	τ_{mean} (ns)	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)
W289	3.4	0.057	2.1	0.172	59
W289+S	4.1	0.019	2.1	0.204	72
W299	3.0	0.044	1.9	0.182	44
W299+S	4.0	0.003	1.6	0.215	59

Přesnost parametrů: τ_{mean} : 0.1 ns; β_1, β_2 : 0.005; ϕ_1 : 0.2 ns; ϕ_2 : 10 ns. τ_{mean} = doba života excitovaného stavu?, β_1 a ϕ_1 = faktory poskytující informace o rotačních pohybech fluoroforu (tryptofanu) a jeho bezprostředního okolí, β_2 a ϕ_2 = faktory poskytující informace o rotačních pohybech celé molekuly. W289 popř. W299 značí α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem v glycinové smyčce v pozici 289 popř. 299. +S značí přítomnost substrátu; prekursoru MDH z kvasinky (pYMDH).

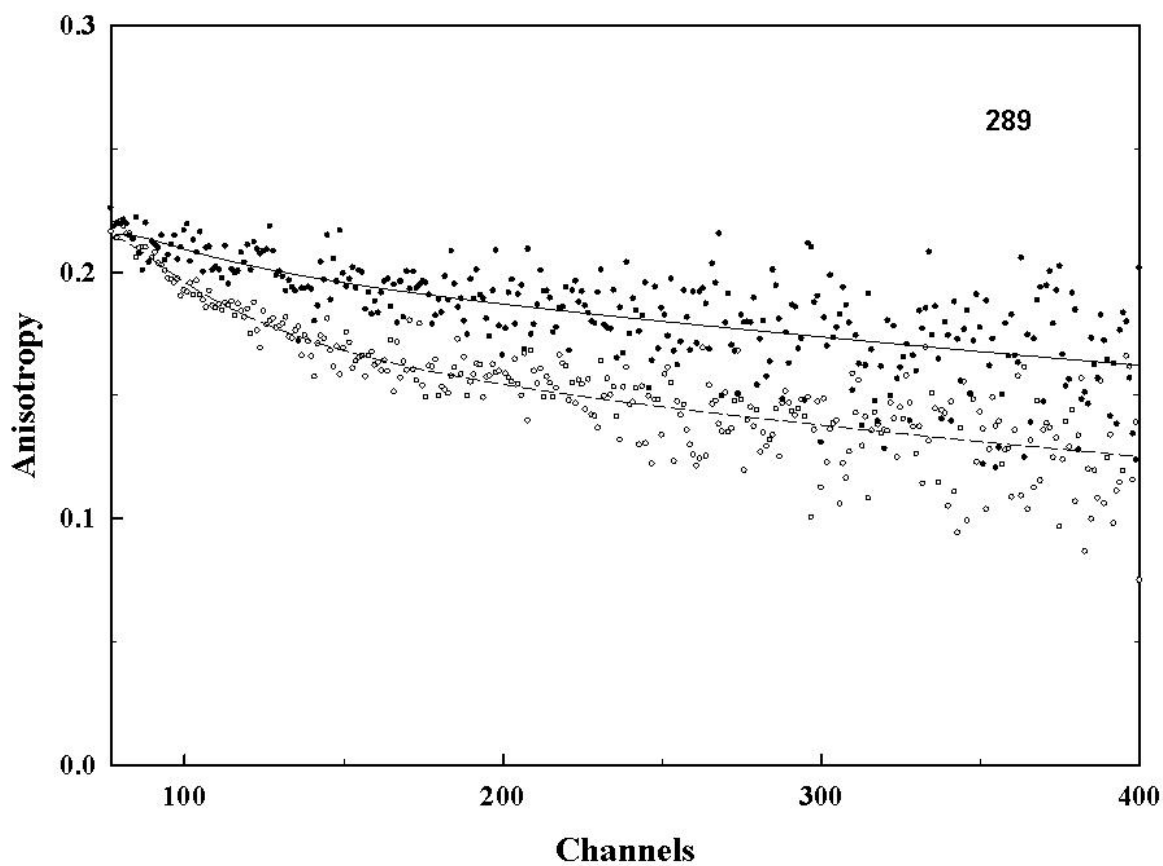
Jedním z důvodů, proč byla pro reportérový tryptofanový zbytek vybrána dvě místa v glycinové smyčce, byl předpoklad, že různá změna pohyblivosti tryptofanového zbytku v určité pozici v GRL po vazbě substrátu umožní více objasnit primární interakce signálních sekvencí substrátů s GRL. Přesto, že se jednotlivé hodnoty τ_{mean} , β_1 , ϕ_1 , β_2 a ϕ_2 u α -MPP (PA3W289) a α -MPP (PA3W299) lišily, tento rozdíl byl v rámci chyby měření. Poměrový rozdíl hodnot mezi samotnou α -MPP a α -MPP se substrátem, který značí změnu pohyblivosti GRL, byl u obou variant srovnatelný.

Snížení hodnoty β_1 označuje snížení pohyblivosti reportérového tryptofanového zbytku a jeho bezprostředního okolí po přidání substrátu. Toto snížení pohyblivosti

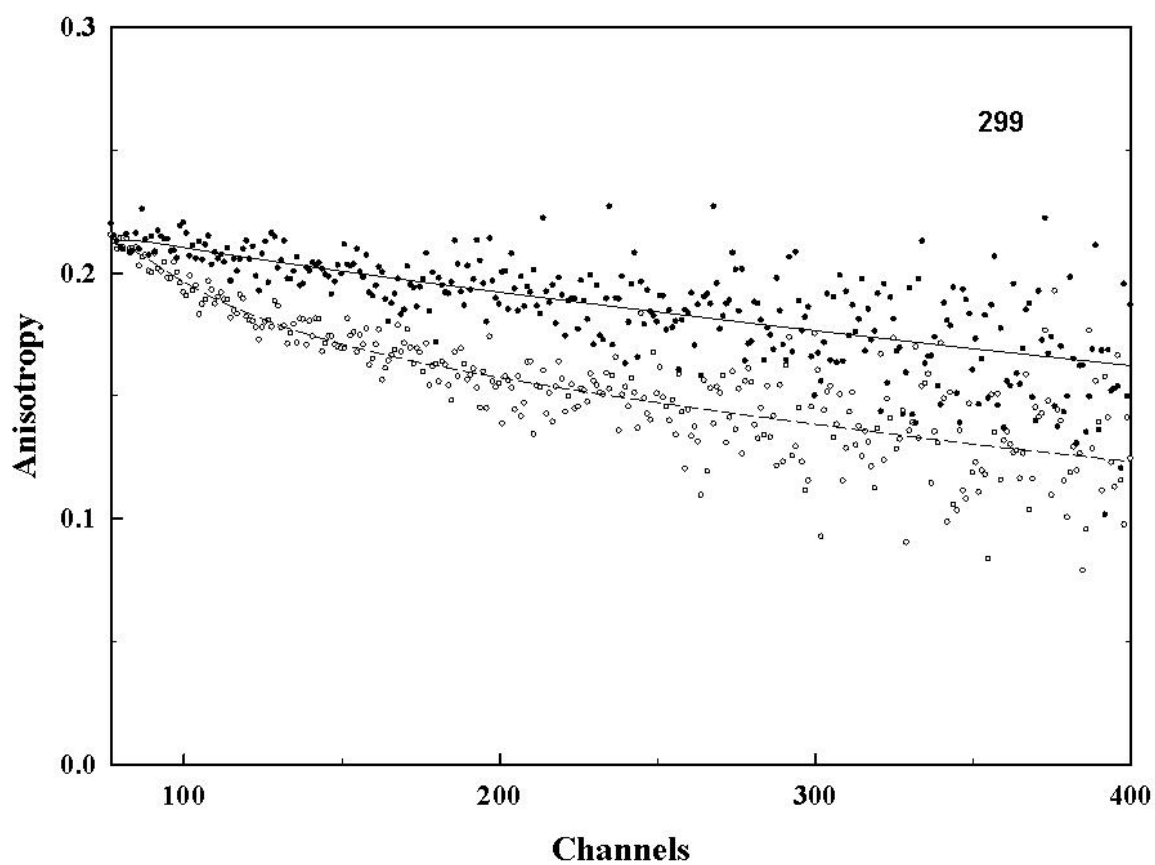
naznačuje, že se substrát navázal do glycinové smyčky, ve které se reportérový tryptofanový zbytek vyskytuje, a dříve velice pohyblivá smyčka se vazbou více zafixovala. Zvýšení hodnoty ϕ_2 označuje dobu, za kterou se celá molekula otočí. Doba rotace je delší, je-li molekula větší, čímž je prokázána vazba substrátu na podjednotku α -MPP.

Z Obr. 4.12, který znázorňuje dohasínání anizotropie fluorescence, je patrné, že po přidání substrátu byla pohyblivost GRL α -MPP snížena.

A:



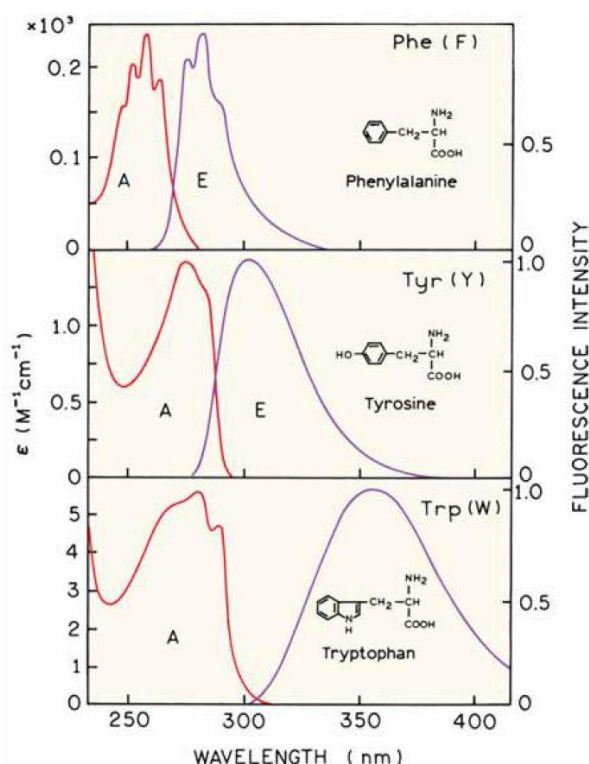
B:



Obr. 4.12: Dohasínání anizotropie fluorescence reportérové α -MPP. Dohasínání anizotropie fluorescence bez přítomnosti substrátu (○) a za přítomnosti substrátu (●).
A: měření α -MPP (PA3W289) s a bez pYMDH.
B: měření α -MPP (PA3W299) s a bez pYMDH.

4.6. Zabudování analogu tryptofanového zbytku do reportérové pozice v α -MPP

Dalším cílem diplomové práce bylo zabudovat analog tryptofanového zbytku do reportérové pozice v GRL α -MPP, aby bylo možné následně měřit MPP v dimeru. Předpokladem bylo, že je možné odlišit fluorescenci analogu zabudovaného do α -MPP od signálu pěti přirozeně se vyskytujících tryptofanových zbytků v β -MPP. Mezi analogy patří např. 5-hydroxy-tryptofan, 5-fluoro-tryptofan nebo 4-fluoro-tryptofan (MOHAMMADI *et al.* 2001). Některé ze zmíněných analogů mají ve srovnání s tryptofanem posunuté jak absorpční tak emisní spektrum. Pro naše účely byl vybrán vybrán 5-hydroxy-tryptofan (5-OH-W). Je potřeba vybírat takový analog tryptofanu, který má posunuté spektrum k vyšším vlnovým délkám, protože pokud by jeho spektrum bylo oproti tryptofanu posunuto k nižším vlnovým délkám, docházelo by k překryvu spektra se spektrem tyrosinu (Obr. 4.13), který se v proteinech hojně vyskytuje.



fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	kvantový výtěžek	doba života (ns)
tryptofan	295	353	0,13	3,1
tyrozin	275	304	0,14	3,6
fenylalanin	260	282	0,02	6,8

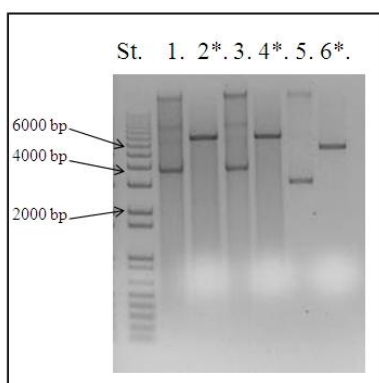
Obr. 4.13: Absorpční (A) a emisní (E) spektra fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. (Převzato z http://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/Bi7230/um/6053971/6056654/09_Protein.pdf).

4.6.1. Kultivace auxotrofního kmene *E. coli* s 5-hydroxy-tryptofanem

Kmen *E. coli* KC8 je auxotrofní na tryptofan, leucin a histidin, proto je potřeba tyto aminokyseliny do média přidat. Kmen *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL byl připraven v naší laboratoři Ing. Annou Matuškovou, která do chromosomální DNA *E. coli* KC8 kmene integrovala gen pro T7 RNA polymerasu (λ DE3 profág) a zároveň byl do buněk zaveden plasmid nesoucí geny pro chaperony GroES a GroEL. Protože buňky *E. coli* KC8 nesou stejnou rezistenci na kanamycin jako pET28b vektor, do kterého je vložen gen pro α -MPP, bylo nutné zaměnit rezistenční kanamycinovou kazetu na pET28b vektoru za ampicilinovou, aby bylo možné zjistit, zda došlo k úspěšné transformaci plasmidu do buněk.

4.6.1.1. Záměna rezistenční kazety ve vektoru pPA3W289 a pPA3W299

K dispozici byl vektor pET28bAmp obsahující kazetu s genem pro ampicilin. Kazeta o velikosti 2224 bp byla vyštěpena použitím enzymů BlnI a PciI. Stejnými enzymy byly opracovány i vektory pPA3W289 a pPA3W299 a rezistenční ampicilinová kazeta byla do těchto vektorů zaligována. Ligace probíhala za pokojové teploty po dobu 1 h. Vzniklé vektory označené pPA3W289Amp a pPA3W299Amp byly poté transformovány do kmene *E. coli* GM2929 a buňky byly vysety na ampicilinové misky. Z vyrostlých kolonií byly plasmidy vyizolovány a následně kontrolně naštěpeny enzymem BlnI (Obr. 4.14).

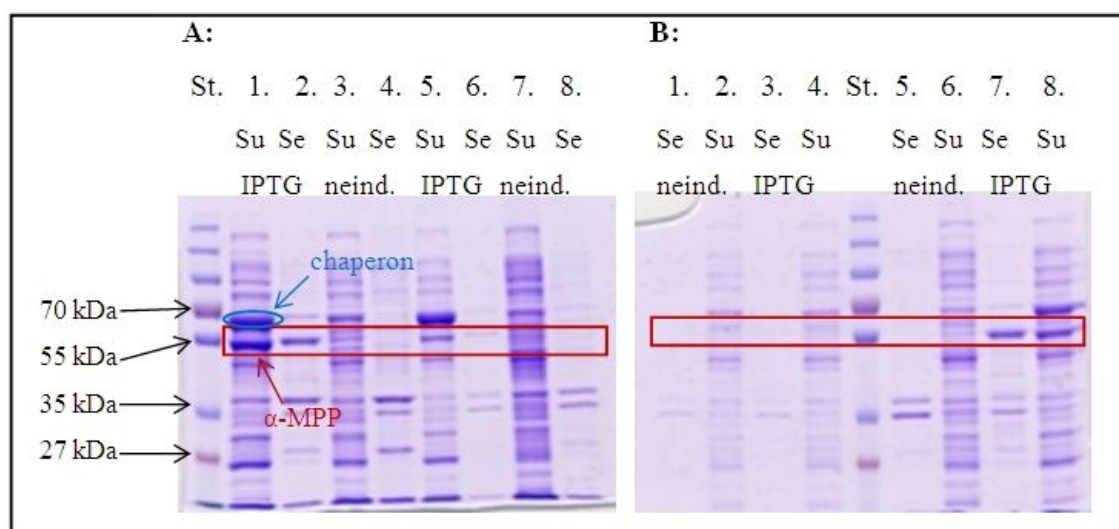


Obr. 4.14: Restrikční kontrola vektorů pPA3W289Amp a pPA3W299Amp. 0,8% agarosový gel. St = standard, 1. – 2. = pPA3W289Amp, 3. – 4. = pPA3W299Amp, 5. – 6. = pET28bAmp. Čísla vzorků označená hvězdičkou jsou po naštěpení enzymem BlnI.

4.6.1.2. Nadprodukce α -MPP s 5-hydroxy-tryptofanovým zbytkem

Vektor pPA3W299Amp byl transformován do buněk *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL a pro kontrolu také do buněk *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL. Buňky byly vysety na ampicilinové/chloramfenikolové misky.

Následná kultivace za účelem nadprodukce α -MPP (PA3 5-OH-W299) probíhala nejprve v LB médiu a poté v M9 doplněném médiu. Jak je patrné z Obr. 4.15, buňky kultivované v M9 médiu produkovaly protein α -MPP pouze tehdy, když byl do média přidán tryptofan. Avšak v případě přidání 5-hydroxy-tryptofanu do média nedocházelo k tvorbě α -MPP ani v nerozpustné formě.

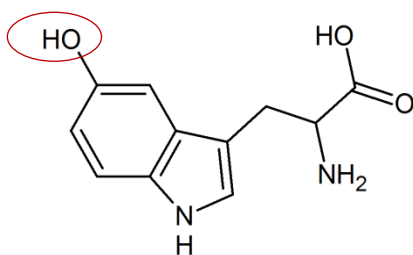


Obr. 4.15: Kultivace auxotrofního kmene *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL v médiu obsahující 5-hydroxy-tryptofan. 8% SDS-PAGE

A: 1. – 4. = kultivace *E. coli* BL21(DE3)+pGroESL po celou dobu v LB médiu. Médium nebylo vyměněno za M9 doplněné médium. 5. – 8. = kultivace *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL po celou dobu v LB médiu. Médium nebylo vyměněno za M9 doplněné médium.

B: 1. – 4. = kultivace *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL v LB médiu, které bylo po dosažení $OD_{600} \sim 0,6$ vyměněno za M9 doplněné médium obsahující 5-hydroxy-tryptofan. 5. – 8. = kultivace *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL v LB médiu, které bylo po dosažení $OD_{600} \sim 0,6$ vyměněno za M9 doplněné médium obsahující tryptofan. St. = standard, Su = supernatant, Se = sediment, IPTG = indukce tvorby proteinu, neind. = kultivace bez indukce.

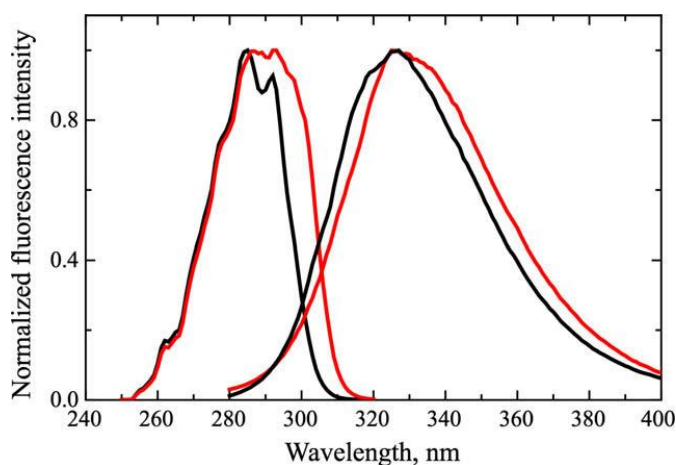
5-hydroxy-tryptofanový zbytek se nepodařilo zabudovat ani různými obměnami postupu. Negativních výsledků bylo dosaženo i při pokusu zabudovat 5-hydroxy-tryptofanové zbytky do β -MPP. Proto lze usoudit, že hydroxy skupina (Obr. 4.16) stéricky brání zabudování tohoto analogu do proteinu.



Obr. 4.16: Struktura 5-hydroxy-tryptofanu. (převzato z <http://withfriendship.com/user/cyborg/5-hydroxytryptophan.php>).

4.6.2. Kultivace auxotrofního kmene *E. coli* s 5-fluoro-tryptofanem

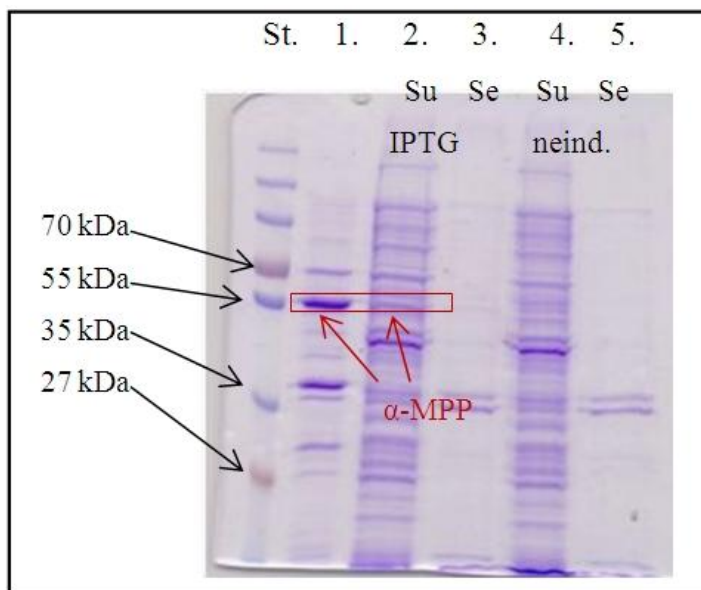
Po neúspěšné snaze zabudovat 5-hydroxy-tryptofanový zbytek do α -MPP byl vybrán jako analog 5-fluoro-tryptofan. Tento analog má také posunuté absorpční a emisní spektrum oproti tryptofanu směrem k vyšším vlnovým délkám, proto je možné ho použít (VISSER *et al.* 2009).



Obr. 4.17: Ustálená fluorescenční excitační a emisní spektra nativního apoflavodoxinu z divokého kmene obsahující Trp (černá) a nativního apoflavodoxinu obsahující 5-F-Trp (červená). Pro emisní spektra je excitační vlnová délka 280 nm a pro excitační spektra je emisní vlnová délka 330 nm. (Převzato z Visser *et al.* 2009).

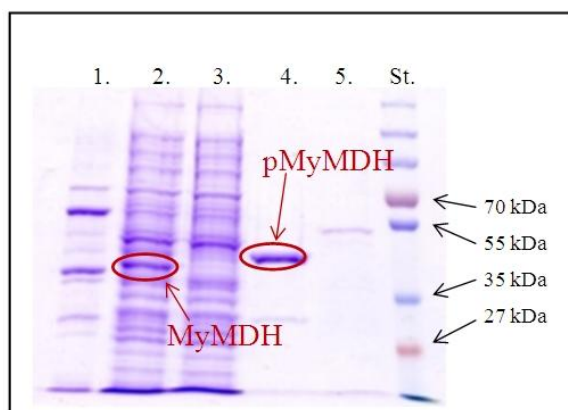
Vektor pPA3W289Amp byl transformován do kmene *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL. Nadprodukce proteinu α -MPP se zabudovaným 5-fluoro-tryptofanovým zbytkem probíhala za stejných podmínek jako v případě nadprodukce α -MPP s 5-hydroxy-tryptofanovým zbytkem v pozici 299 (kapitola 4.6.1.2.). Z Obr. 4.18

je patrné, že přesto, že se více proteinu tvořilo v nerozpustné formě, část ho byla i v nativní rozpustné formě.



Obr. 4.18: Kultivace auxotrofního kmene *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL v médiu obsahující 5-fluoro-tryptofan. 8% SDS-PAGE. 1. = α -MPP použitá jako standard, 2. – 5. = kultivace *E. coli* KC8(DE3)+pGroESL v LB médiu, které bylo po dosažení $OD_{600} \sim 0,4$ vyměněno za M9 doplněné médium obsahující 5-fluoro-tryptofan. St. = standard, Su = supernatant, Se = sediment, IPTG = indukce tvorby proteinu, neind. = kultivace bez indukce.

Vzhledem k tomu, že pro aktivitu MPP není potřeba velké množství tohoto enzymu, byl dimer MPP vzniklý použitím supernatantu obsahující α -MPP (PA3 5-F-W289) a β -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* podroben ověření aktivity. Jako substrát byl použit prekurzor kvasinkové MDH obsahující presekvenci z myši (pMyMDH). Reakce probíhala po dobu 30 min při 30 °C a byla ukončena přidáním vzorkového pufru a následně analyzována na SDS-PAGE. Z Obr. 4.19 je patrné, že téměř celý substrát byl přeměněn na produkt. Takto připravený enzym je tedy aktivní.



Obr. 4.19: Ověření aktivity dimeru MPP obsahující α -MPP se zabudovaným 5-fluoro-tryptofanovým zbytkem. 8% SDS-PAGE 1. = α -MPP použitá jako standard, 2. = α -MPP+ β -MPP+pMyMDH, 3. = α -MPP+ β -MPP, 4. = pMyMDH, 5. = β -MPP, St. = standard.

5. Diskuze

Tato diplomová práce je součástí projektu zabývající se studiem primárního kontaktu mitochondriální procesující peptidasy (MPP) ze *S. cerevisiae* s presekvencí substrátu pMDH a navazuje na práci kolegů z naší laboratoře (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). DVORAKOVA-HOLA a kol. (2010) použili metodu časově rozlišené fluorescenční spektroskopie, pomocí které sledovali změnu pohyblivosti flexibilní smyčky bohaté na glycinové zbytky (GRL), která je s největší pravděpodobností zodpovědná za primární kontakt MPP se substrátem. Konzervovaná oblast α -MPP bohatá na glycinové zbytky zahrnuje u kvasinky *S. cerevisiae* zhruba aminokyselinové zbytky v pozicích 279 – 308. Jádro GRL obsahující osm glycinových zbytků se vyskytuje mezi pozicemi 284 – 298. Při fluorescenčních měřeních bylo využito přirozené fluorescence tryptofanového zbytku zavedeného do reportérového místa v GRL. Systém však nebyl optimální z několika důvodů. Především byla měření zatížena pozadím způsobeným přítomností jednoho přirozeně se vyskytujícího tryptofanového zbytku v pozici 223, který se nepodařilo úspěšně zaměnit za jiný aminokyselinový zbytek. Důvodem byl neoptimální expresní systém, kdy docházelo ke špatnému sbalení mutovaných forem proteinů. Zvláště náchylné byly proteiny obsahující vícenásobné mutace nebo mutace zavedené do kritického místa. Ani snaha zavést reportérový tryptofanový zbytek do pozice 289 nebyla úspěšná (DVORAKOVA-HOLA *et al.*, osobní sdělení). Tato pozice je velmi zajímavá, protože se vyskytuje v centru GRL a zdá se, že je nejbližší navázanému substrátu a dostává se do aktivního centra (NAGAO *et al.* 2000). Vzhledem k tomu, že se nepodařila zavést substituce do pozice 289, předpokládalo se, že zásah do takto důležitého místa není možný.

Ke specifikaci ohraničení GRL napomohlo i zavedení reportérového tryptofanového zbytku do pozice 303. Po vazbě substrátu nebyla lokální dynamika tohoto zbytku ovlivněna. Tato pozice se tedy sice vyskytuje v oblasti bohaté na glycinové zbytky, avšak není součástí flexibilní smyčky, do které se substrát váže.

Cílem diplomové práce bylo sledovat konformační změny GRL α -MPP *S. cerevisiae* po vazbě substrátu na systému, který obsahuje pouze reportérový tryptofanový zbytek ve vhodné pozici GRL a kde jsou odstraněny všechny přirozeně se vyskytující tryptofanové zbytky v α -MPP.

Pomocí cílené mutagenese byla pozměněna sekvence genu kódující α -MPP *S. cerevisiae* tak, aby ve výsledném proteinu došlo k záměně tryptofanového zbytku v pozici 223 za čtyři vybrané aminokyseliny vyhovující svými vlastnostmi (hydrofobicita, aromatický charakter). Jednalo se o valin, leucin, tyrosin a fenylalanin. Přestože byl fenylalanin vzhledem ke své největší podobnosti tryptofanu záměnou první volby, byly vybrány ještě další vhodné aminokyseliny. K tolika variantám bylo přistoupeno z důvodu, že záměna aminokyselinového zbytku v pozici 223 činila kolegům naší laboratoře v předešlém období velké obtíže. Všechny varianty proteinu α -MPP obsahující zaměněný aminokyselinový zbytek v pozici 223 však byly plně funkční a rozpustné. Nejvyšší aktivitu vykazovala varianta proteinu obsahující v pozici 223 fenylalanin, proto bylo dále pracováno s touto mutací jako s výchozím materiálem, do kterého byly později zavedeny reportérové tryptofanové zbytky do pozic 289 nebo 299.

Předpokládá se, že pozice 289 a 299 zhruba ohraničují samotnou flexibilní smyčku. Pozice 289 byla vybrána z důvodu ideálního umístění vzhledem k předpokládané primární interakci GRL s presekvencí a pozice 299 byla vybrána proto, že již byla pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie změřena a bylo žádoucí porovnat tato dvě místa v GRL.

Při produkci proteinů α -MPP obsahující jediný tryptofanový zbytek v pozicích 289 nebo 299 bylo pro správné složení proteinu nutné snížit teplotu na 20 °C a koexprimovat α -MPP s chaperony GroES a GroEL. Snížením teploty, při které byl protein produkován, došlo ke zpomalení procesu produkce α -MPP, která poté mohla být správně složena.

Jedním z cílů diplomové práce bylo zjistit, zda MPP obsahující reportérovou α -MPP vykazuje aktivitu po přidání substrátů a porovnat tyto aktivity s MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*.

Použitým substrátem byl prekurzor kvasinkové malátdehydrogenasy s fúzovanou presekvencí (pMDH) ze tří organismů (kvasinky, myši, a melounu) lišící se svou délkou. Myší pMDH má presekvenci dlouhou 17 aminokyselinových zbytků, kvasinkový pMDH má presekvenci dlouhou 9 aminokyselinových zbytků a melouní pMDH má presekvenci dlouhou 27 aminokyselinových zbytků.

Aktivita dimeru obsahujícího α -MPP (PA3W289) se ve srovnání s aktivitou MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* pohybovala se substrátem pMDH obsahující

presekvenci z melounu mezi 60 – 70 %, se substrátem pMDH obsahující presekvenci z myši mezi 70 – 80 % a se substrátem pMDH obsahující presekvenci z kvasinky okolo 60 %.

Aktivita dimeru obsahujícího α -MPP (PA3W299) se ve srovnání s aktivitou MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* pohybovala se substrátem pMDH obsahující presekvenci z melounu okolo 90 %, se substrátem pMDH obsahující presekvenci z myši okolo 120 % a se substrátem pMDH obsahující presekvenci z kvasinky mezi 70 – 80 %.

Analýza aktivity pomocí SDS-PAGE představuje pouze semikvantitativní metodu, kde je častá chyba i 20 %. Z toho důvodu lze varianty MPP vykazující aktivitu mezi 80 – 120 % považovat za plně funkční a MPP, jejichž aktivita se pohybuje mezi 60 – 80 %, považovat za varianty vykazující sníženou aktivitu ve srovnání s aktivitou MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*.

Problémy nastaly při fluorescenčních měřeních. Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie byla měřena na samotné α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) s prekurzorem kvasinkové MDH obsahující presekvenci z myši, kvasinky nebo melounu. Z důvodu vysoké teploty během měření (16 °C) a silného impulsu z laseru se nepodařilo vzorky změřit, protože proteiny tvořily agregáty. Bylo tedy nutné zjistit stabilitu α -MPP za podmínek měření a optimalizovat složení pufru, ve kterém byly vzorky měřeny.

Pomocí nativní elektroforézy byla zjišťována míra agregace proteinu α -MPP po purifikaci. Pro porovnání byl použit i protein α -MPP (PA2W299), který byl již časově rozlišenou fluorescenční spektroskopií změřen (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). Z výsledků vyplývá, že za důsledně chlazených podmínek se většina proteinu nacházela v monomerní formě. Nepatrná část proteinu byla sice ve formě dimeru, avšak tento stav se nachází i u α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*, která tvoří cca z 20 % dimery. Protein byl stabilní i po několika dnech při 4 °C.

Výsledky simulace podmínek během měření ukázaly, že přídavek dodecylmaltosid mírně napomáhal stabilitě proteinu. Přesto značná část proteinu agregovala, což bylo nejspíše způsobeno vysokou teplotou reakce. Je ovšem zajímavé, že po vazbě substrátu došlo k větší stabilitě proteinu. Místo dodecylmaltosidu byl jako stabilizační činidlo použit také ethylenglykol, který při měření nezpůsobuje vysoké pozadí jako glycerol, jež je obsažen v pufrech pro α -MPP. Ukázalo se však, že ethylenglykol stabilitě proteinu nijak nenapomáhá.

Na základě výsledků zjištění míry agregace α -MPP za různých podmínek vyplývá, že přesto, že je α -MPP s jediným tryptofanovým zbytkem v reportérové oblasti se zachovalou aktivitou, její stabilita je oproti α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* značně snížena. Obecně je sice α -MPP oproti β -MPP, která je stabilizována velkým množstvím vodíkových můstků, méně stabilnější, avšak α -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* je stabilní při pokojové teplotě i po dobu několika dní. Nízká stabilita reportérové α -MPP za vyšších teplot se negativně projevila při fluorescenčních měřeních.

Následná fluorescenční měření byla prováděna na α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) se substrátem pMDH z kvasinky. Pufr, ve kterém byly vzorky změřeny, obsahoval 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 M močovinu, 0,2 mM DDM, 10% glycerol, pH 8,6. Z výsledků měření vyplývá, že po přidání substrátu došlo ke snížení pohyblivosti GRL, do které byl zaveden reportérový tryptofanový zbytek. Byla potvrzena vazba substrátu na GRL α -MPP, která je s největší pravděpodobností zodpovědná za primární kontakt presekvence s enzymem.

Výsledky odpovídají závěrům kolegů z naší laboratoře, kteří měřili na systému α -MPP (PA2W299) spolu s pMDH ze *S. cerevisiae* (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). Potvrdilo se, že i měření na neoptimálním systému vypovídalo o lokální dynamice reportérového tryptofanového zbytku a že interference tryptofanového zbytku v pozici 223 nebyla tak velká, aby významně zkreslila výsledky.

Výsledky měření však nepotvrdily, zda je některé ze dvou vybraných reportérových míst v pozicích 289 nebo 299 v místě větší konformační změny na GRL po vazbě substrátu. Odlišné změřené hodnoty obou variant α -MPP byly v rámci chyby měření. Lze tedy shrnout, že u obou testovaných forem reportérové α -MPP byla prokázána změna konformace a míra změny pohybu je u obou variant srovnatelná.

Náplní práce Ing. Anny Matuškové je ověřit hypotézu, zda chování GRL je odlišné u rozpoznání různě dlouhých presekvenčí.

Zajímavým výsledkem by tedy jistě bylo porovnání změny pohyblivosti α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) po přidání substrátů s různě dlouhými presekvenčemi (prekurzor kvasinkové MDH s presekvenčí z myši, kvasinky a melounu). Z Obr. 4.12 je patrné, že po přidání pMDH ze *S. cerevisiae* byla pohyblivost GRL

snížena. Avšak z důvodu, že pufr obsahoval 10% glycerol, který se navázal na protein (VAGENENDE *et al.* 2009) a způsobil snížení pohyblivosti i samotné GRL bez substrátu, není rozdíl změny pohyblivosti takový, aby bylo možné porovnat vliv různě dlouhých presekvenčí na změnu pohyblivosti smyčky α -MPP. Nejprve je nutné optimalizovat reportérový systém pro novou sadu měření s různě dlouhými presekvenčemi kvasinkového pMDH. Určitým východiskem by bylo měřit vzorky v pufru bez glycerolu.

Na základě vytvořené struktury MPP je známá vazba substrátu do aktivního centra enzymu. Ko-krytalizace mutantní kvasinkové MPP s různými mitochondriálními presekvenčemi odhalila, že se presekvence váže do aktivní dutiny enzymu v rozvinuté konformaci a před samotnou proteolýzou tvoří krátký β -list interagující s β -listy MPP (TAYLOR *et al.* 2001).

Na druhou stranu nestabilní a částečně rozvolněná helikální struktura (THORNTON *et al.* 1993) je potřeba nejenom pro transport presekvence, ale také pro primární kontakt presekvence (Obr. 2.14) prekursoru proteinu s MPP (DVORAKOVA-HOLA *et al.* 2010). Pomocí metody simulace molekulární dynamiky bylo potvrzeno, že přítomnost hydrofobních částí v GRL a ve žlábků Tom20 receptoru napovídá o stejném mechanismu specifického rozpoznání substrátu. 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. Pomocí fluorescenčních měření samotné α -MPP se nám podařilo získat další cenné informace ohledně primární interakce enzymu s presekvenčí.

Avšak mechanismus vtahování presekvenčí do aktivní dutiny zůstává stále neznámý. Není jisté, nakolik se rozdíl v mechanismu vtahování různě dlouhých presekvenčí projeví na samotné α -MPP, proto se připravuje systém měření časově rozlišené fluorescenční spektroskopie MPP v jeho přirozeném stavu, tedy v dimeru. Aby bylo možné odlišit fluorescenci reportérové α -MPP od signálu pěti přirozeně se vyskytujících tryptofanových zbytků v β -MPP, bylo nutné zabudovat analog tryptofanového zbytku do reportérové pozice (289 nebo 299) v α -MPP. Nejprve byl jako analog vybrán 5-OH-W, který se však nepodařilo do proteinu zabudovat.

Pravděpodobným důvodem bylo to, že hydroxy skupina stéricky brání zabudování tohoto analogu do proteinu.

Byl proto vybrán 5-F-W, který byl úspěšně zabudován do α -MPP (PA3W299). Přestože se většina proteinu vyskytovala v nerozpustné frakci, částečně byla α -MPP přítomna i v rozpustné formě. MPP vzniklá použitím supernatantu obsahující α -MPP (PA3 5-F-W289) a β -MPP z divokého kmene *S. cerevisiae* byla podrobena ověření aktivity. Jako substrát byl použit kvasinkový pMDH s presekvencí z myši. Takto připravený dimer byl aktivní.

Aby bylo možné zachytit vazbu substrátu před konečným odštěpením presekvence, je nutné odstranit katalytickou funkci β -MPP, a to jednoduchou záměnou glutamové kyseliny v pozici 73 za glutamin (TAYLOR *et al.* 2001). Touto záměnou dojde k tvorbě vodíkové vazby mezi amidovou skupinou na vedlejším řetězci aminokyselinového zbytku a volným karboxylovým kyslíkem substrátu, čímž dojde ke stabilizaci substrátu v aktivním místě, a tudíž ke snížení aktivity enzymu. Následným krokem by tedy byla mutageneze β -MPP za účelem zablokování katalytické funkce této podjednotky. Takto připravený dimer by byl změřen časově rozlišenou fluorescenční spektroskopií. Opět by se sledovala změna pohyblivosti glycinové smyčky α -MPP bez/za přítomnosti substrátu.

Tato diplomová práce je součástí projektu zabývající se jednak primární interakcí presekvence s MPP a jednak snahou objasnit mechanismus vtahování presekvence do aktivní dutiny enzymu. Zjištění tohoto mechanismu však mnohonásobně přesahuje rámec této práce, jejímž cílem byla optimalizace systému pro fluorescenční měření reportérového tryptofanového zbytku. Veškeré cíle této diplomové práce byly tedy splněny.

Závěrem lze shrnout, že GRL α -MPP hraje zásadní roli v rozpoznání presekvence mitochondriální procesující peptidasou a představuje funkční paralelu s Tom20 receptorem. Simulace molekulární dynamiky interakce enzymu se substrátem ukazuje na aktivní roli GRL v rozpoznání substrátu a při předání presekvence hlouběji do hydrofobního centra enzymu, kde dojde k roztátí nestabilní helikální struktury.

6. Souhrn

1. Pomocí metody cílené mutagenese byly připraveny konstrukty kódující α -MPP se zaměněným tryptofanovým zbytkem v pozici 223. Tryptofanový zbytek v této pozici byl substituován za tyrosin, valin, leucin a fenylalanin. Všechny připravené α -MPP s nahrazeným tryptofanovým zbytkem v pozici 223 vykazovaly aktivitu. Pro další experimenty byla vybrána varianta α -MPP s fenylalaninem v pozici 223, jejíž aktivita byla největší, srovnatelná s aktivitou MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*.
2. Byly zavedeny reportérové tryptofanové zbytky do pozic 289 nebo 299 v GRL α -MPP, jež má nahrazeny všechny tři přirozené tryptofanové zbytky.
3. Zavedené mutace v genu pro α -MPP vedly k tvorbě nerozpustného proteinu při 37 °C. Snížením postindukční kultivační teploty při heterologní expresi na 20 °C byl protein produkován převážně v rozpustné formě.
4. Aktivita forem MPP obsahující α -MPP s reportérovým tryptofanovým zbytkem v pozici 289 nebo 299 byla porovnána s aktivitou MPP z divokého kmene *S. cerevisiae*. Byly použity prekurzory kvasinkové MDH s presekvencemi z melounu, myši a kvasinky lišící se svou délkou. Obě modifikované varianty MPP obsahující buď α -MPP (PA3W289) nebo α -MPP (PA3W299) vykazovaly dostatečnou aktivitu nad 60 %.
5. U purifikované α -MPP (PA3W289) a α -MPP (PA3W299) byla pozorována tendence agregovat. Míra agregace, která silně závisí na teplotě a čase manipulace se vzorkem, byla zjišťována pomocí nativní elektroforézy. Za důsledně chlazených podmínek a krátkého času manipulace se obě varianty α -MPP vyskytovaly ve formě monomeru, avšak za podmínek fluorescenčních měření (16 °C, 1 h) byla většina proteinu agregována. Mírné stabilizaci proteinu napomáhal přídavek dodecylmaltosid (konečná koncentrace 0,2 mM) a přidání substrátu.
6. Sledování dynamiky reportérového tryptofanového zbytku v GRL v pozici 289 nebo 299 bylo provedeno použitím časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Kvasinkový pMDH se vázal na α -MPP, čímž došlo ke snížení pohyblivosti GRL. Výsledky prokázaly podobnou míru konformační změny v okolí obou reportérových pozic.

7. Podařilo se zabudovat analog tryptofanu 5-F-W do pozice 289 v α -MPP. Protein byl produkován převážně v nerozpustné frakci, část však byla produkována v nativní formě. Dimer MPP obsahující α -MPP (PA3 5-F-W289) vykazoval se substrátem pMyMDH dostatečnou aktivitu.

V současné době pokračují práce na optimalizaci podmínek pro měření časově rozlišené fluorescenční spektroskopie na α -MPP (PA3W289) se třemi substráty (pWyMDH, pMyMDH, pYMDH).

Dále je plánováno zavedení bodové mutace do genu kódující β -MPP, které bude mít za následek zablokování katalytické funkce této podjednotky. Následně bude změřena časově rozlišená fluorescenční spektroskopie dimeru MPP obsahující částečně nefunkční katalytickou β -MPP a α -MPP (PA3 5-F-W289).

7. Seznam literatury

1. 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: 551-560.
2. Adams, K. L. and Palmer, J. D. (2003): Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* 29: 380-395.
3. Alcock, F., Clements, A., Webb, C. and Lithgow, T. (2010): Evolution. Tinkering inside the organelle. *Science* 327: 649-650.
4. 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: 1465-1475.
5. Amata, O., Marino, T., Russo, N. and Toscano, M. (2011): A proposal for mitochondrial processing peptidase catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* 133: 17824-17831.
6. Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., 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: 133-140.
7. Ausubel, F. A., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A and Struhl K. (1998): Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
8. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
9. 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.
10. Bossemeyer, D. (1994): The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends Biochem Sci* 19: 201-205.
11. Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A. H., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A. and Hackstein, J. H. (2005): An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434: 74-79.
12. 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: 3484-3493.

13. Braun, H. P. and Schmitz, U. K. (1995): Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem Sci* 20: 171-175.
14. Braun, H. P., Emmermann, M., Krufft, 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: 3219-3227.
15. Brix, J., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1997): Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem* 272: 20730-20735.
16. 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: 1154-1163.
17. Clark, C. G. and Roger, A. J. (1995): Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6518-6521.
18. Delage, L., Leblanc, C., Nyvall Collen, P., Gschloessl, B., Oudot, M. P., Sterck, L., Poulain, J., Aury, J. M. and Cock, J. M. (2011): In silico survey of the mitochondrial protein uptake and maturation systems in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *PLoS One* 6: e19540.
19. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. and Lithgow, T. (2006): Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313: 314-318.
20. Dolezal, P., Smid, O., Rada, P., Zubacova, Z., Bursac, D., Sutak, R., Nebesarova, J., Lithgow, T. and Tachezy, J. (2005): Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10924-10929.
21. 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: 1197-1210.
22. Dyall, S. D., Brown, M. T. and Johnson, P. J. (2004): Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304: 253-257.
23. Embley, T. M. and Martin, W. (2006): Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 623-630.
24. Endo, T., Shimada, I., Roise, D. and Inagaki, F. (1989): 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* 106: 396-400.

25. Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M. A., Lockhart, P. J., Penny, D. and Martin, W. (2004): A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol* 21: 1643-1660.
26. Gakh, O., Cavadini, P. and Isaya, G. (2002): Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592: 63-77.
27. 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: 392-396.
28. Geli, V. (1993): Functional reconstitution in *Escherichia coli* of the yeast mitochondrial matrix peptidase from its two inactive subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6247-6251.
29. Gray, M. W. (1989): The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* 5: 294-299.
30. Gray, M. W., Lang, B. F. and Burger, G. (2004): Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet* 38: 477-524.
31. Gross, J. and Bhattacharya, D. (2009): Mitochondrial and plastid evolution in eukaryotes: an outsiders' perspective. *Nat Rev Genet* 10: 495-505.
32. Gross, J. and Bhattacharya, D. (2011): Endosymbiont or host: who drove mitochondrial and plastid evolution? *Biol Direct* 6: 12.
33. Gunasekaran, K. and Nussinov, R. (2004): Modulating functional loop movements: the role of highly conserved residues in the correlated loop motions. *ChemBiochem* 5: 224-230.
34. Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R. and Voncken, F. G. (1999): Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol* 7: 441-447.
35. Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Voncken, F., van Hoek, A., van Alen, T., Boxma, B., Moon-van der Staay, S. Y., van der Staay, G., Leunissen, J., Huynen, M., Rosenberg, J. and Veenhuis, M. (2001): Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments. *Zoology (Jena)* 104: 290-302.
36. Hartl, F. U., Pfanner, N., Nicholson, D. W. and Neupert, W. (1989): Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 988: 1-45.
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. Huang, S., Taylor, N. L., Whelan, J. and Millar, A. H. (2009): Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs. *Plant Physiol* 150: 1272-1285.
39. Ito, A. (1999): Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 611-616.
40. Iwahashi, J., Yamazaki, S., Komiya, T., Nomura, N., Nishikawa, S., Endo, T. and Mihara, K. (1997): Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20. *J Biol Chem* 272: 18467-18472.
41. 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: 211-217.
42. 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 Angstroms³ chamber for proteolysis. *EMBO J* 25: 1977-1986.
43. Kitada, S., Yamasaki, E., Kojima, K. and Ito, A. (2003): 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* 278: 1879-1885.
44. 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: 844-850.
45. Kojima, K., Kitada, S., Ogishima, T. and Ito, A. (2001): A proposed common structure of substrates bound to mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* 276: 2115-2121.
46. Kojima, K., Kitada, S., Shimokata, K., Ogishima, T. and Ito, A. (1998): Cooperative formation of a substrate binding pocket by alpha- and beta-subunits of mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* 273: 32542-32546.
47. Kotzbauer, P. T., Truax, A. C., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2005): Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2. *J Neurosci* 25: 689-698.
48. Kunkele, K. P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998): The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93: 1009-1019.

49. Lemire, B. D., Fankhauser, C., Baker, A. and Schatz, G. (1989): The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. *J Biol Chem* 264: 20206-20215.
50. Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2008): Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77: 669-700.
51. Lithgow, T. and Schneider, A. (2010): Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 799-817.
52. 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: 213-225.
53. Luciano, P., Tokatlidis, K., Chambre, I., Germanique, J. C. and Geli, V. (1998): The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase. *J Mol Biol* 280: 193-199.
54. 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: 180-192.
55. 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: 3177-3182.
56. Mihara, K. and Omura, T. (1996): Cytosolic factors in mitochondrial protein import. *Experientia* 52: 1063-1068.
57. Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2002): Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol* 316: 657-666.
58. Mohammadi, F., Prentice, G. A. and Merrill, A. R. (2001): Protein-protein interaction using tryptophan analogues: novel spectroscopic probes for toxin-elongation factor-2 interactions. *Biochemistry* 40: 10273-10283.
59. Moran, N. A., McLaughlin, H. J. and Sorek, R. (2009): The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science* 323: 379-382.
60. Muller, M. (1997): Evolutionary origins of trichomonad hydrogenosomes. *Parasitol Today* 13: 166-167.
61. Naamati, A., Regev-Rudzki, N., Galperin, S., Lill, R. and Pines, O. (2009): Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55. *J Biol Chem* 284: 30200-30208.

62. Nagao, Y., Kitada, S., Kojima, K., Toh, H., Kuhara, S., Ogishima, T. and Ito, A. (2000): Glycine-rich region of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is essential for binding and cleavage of the precursor proteins. *J Biol Chem* 275: 34552-34556.
63. Nagayama, K. and Ohmachi, T. (2010): Mitochondrial processing peptidase activity is controlled by the processing of alpha-MPP during development in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology* 156: 978-989.
64. Neupert, W. and Herrmann, J. M. (2007): Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 723-749.
65. Nishino, T. G., Kitano, K., Kojima, K., Ogishima, T., Ito, A. and Kitada, S. (2007): Spatial orientation of mitochondrial processing peptidase and a preprotein revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biochem* 141: 889-895.
66. Ogishima, T., Niidome, T., Shimokata, K., Kitada, S. and Ito, A. (1995): Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* 270: 30322-30326.
67. 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: 774-780.
68. Oshima, T., Yamasaki, E., Ogishima, T., Kadowaki, K., Ito, A. and Kitada, S. (2005): Recognition and processing of a nuclear-encoded polyprotein precursor by mitochondrial processing peptidase. *Biochem J* 385: 755-761.
69. Paces, V., Rosenberg, L. E., Fenton, W. A. and Kalousek, F. (1993): The beta subunit of the mitochondrial processing peptidase from rat liver: cloning and sequencing of a cDNA and comparison with a proposed family of metallopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5355-5358.
70. Patel, H., Hart, P. E., Warner, T., Allen, I., Phillimore, H. E., Silver, J. R., Wood, N. W., Jeffery, S., Patton, M. A. and Crosby, A. H. (2001): Silver syndrome is not linked to any of the previously established autosomal dominant hereditary spastic paraplegia loci. *Am J Med Genet* 102: 68-72.
71. Pfanner, N. (2000): Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol* 10: R412-415.
72. Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1995): Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* 248: 183-228.
73. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A. J. (2004): MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 32: D160-164.
74. Rimmer, K. A., Foo, J. H., Ng, A., Petrie, E. J., Shilling, P. J., Perry, A. J., Mertens, H. D., Lithgow, T., Mulhern, T. D. and Gooley, P. R. (2011):

- Recognition of mitochondrial targeting sequences by the import receptors Tom20 and Tom22. *J Mol Biol* 405: 804-818.
75. Ritz, P. and Berrut, G. (2005): Mitochondrial function, energy expenditure, aging and insulin resistance. *Diabetes Metab* 31 Spec No 2: 5S67-65S73.
 76. 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: 649-653.
 77. Ross, J. B., Senear, D. F., Waxman, E., Kombo, B. B., Rusinova, E., Huang, Y. T., Laws, W. R. and Hasselbacher, C. A. (1992): Spectral enhancement of proteins: biological incorporation and fluorescence characterization of 5-hydroxytryptophan in bacteriophage lambda cI repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12023-12027.
 78. Schmidt, O., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2010): Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 655-667.
 79. Schneider, H., Arretz, M., Wachter, E. and Neupert, W. (1990): Matrix processing peptidase of mitochondria. Structure-function relationships. *J Biol Chem* 265: 9881-9887.
 80. Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyllal, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y., Loo, J. A. and Johnson, P. J. (2011): The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int J Parasitol* 41: 1421-1434.
 81. Smid, O., Matuskova, A., Harris, S. R., Kucera, T., Novotny, M., Horvathova, L., Hrady, 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.
 82. Song, M. C., Ogishima, T. and Ito, A. (1998): Importance of residues carboxyl terminal relative to the cleavage site in substrates of mitochondrial processing peptidase for their specific recognition and cleavage. *J Biochem* 124: 1045-1049.
 83. 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: 615-625.
 84. Teixeira, P. F. and Glaser, E. (2012): Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*.
 85. Thornton, K., Wang, Y., Weiner, H. and Gorenstein, D. G. (1993): Import, processing, and two-dimensional NMR structure of a linker-deleted signal peptide of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 268: 19906-19914.

86. Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y. and Martin, W. (2004): Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5: 123-135.
87. 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: 172-176.
88. Vagenende, V., Yap, M. G. and Trout, B. L. (2009): Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* 48: 11084-11096.
89. 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. (2002): Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J* 21: 572-579.
90. Visser, N. V., Westphal, A. H., Nabuurs, S. M., van Hoek, A., van Mierlo, C. P., Visser, A. J., Broos, J. and van Amerongen, H. (2009): 5-fluorotryptophan as dual probe for ground-state heterogeneity and excited-state dynamics in apoflavodoxin. *FEBS Lett* 583: 2785-2788.
91. von Heijne, G., Steppuhn, J. and Herrmann, R. G. (1989): Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* 180: 535-545.
92. Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A. E., Jensen, R. E. and Endo, T. (2008): Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J Biol Chem* 283: 3799-3807.
93. Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. and Woese, C. R. (1985): Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4443-4447.
94. 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 two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. *EMBO J* 7: 3857-3862.
95. Young, J. C., Hoogenraad, N. J. and Hartl, F. U. (2003): Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112: 41-50.