

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie a biochemie



Diplomová práce

**Studium mitochondriálních procesovacích
peptidáz u procyklických stádií
*Trypanosoma brucei***

Bc. Pavel Poliak

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Julius Lukeš, CSc.

Parazitologický ústav AV ČR

Laboratoř molekulární parazitologie

České Budějovice, 2010

Poliak P., 2010: Studium mitochondriálních procesovacích peptidáz u procyklických stádií *Trypanosoma brucei*. [Study of mitochondrial processing peptidases in procyclic *Trypanosoma brucei*]. Master Thesis, in Czech. 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Aim of this work was to find out how mitochondrial processing peptidases are working in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. I have shown by RNA interference that mitochondrial processing peptidase (MPP) and mitochondrial intermediate peptidase (MIP) are essential for procyclic stages. Moreover, processing of human frataxin in *T. brucei* has a similar pattern as in human cells.

Tato práce byla podpořena granty: GAČR 204/06/1558, GAAV A500960705 a MŠMT LC07032, 2B06129, 600766580.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedených literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30. dubna 2010

.....
Pavel Poliak

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli, Juliu Lukešovi, za možnost pracovat v Laboratoři molekulární parazitologie, za trpělivost a cenné rady. Dále bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře za příjemné pracovní prostředí; Shaovi, Vladce a Antje za pomoc při přípravě buněčných linií *T. brucei*; Petrovi, Zuzce a Gabče za každodenní dobrou náladu; Piyovi a Somovi za to, že jsou „nočními tvory“ a DHLovi za pomoc při práci s laboratorními zvířaty.

V neposlední řadě děkuji paní Evě, Jendovi, Verče a Jirkovi za příjemnou společnost v těch nejtěžších chvílích.

A především děkuji své rodině za všestrannou podporu, porozumění a lásku.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Kinetoplastida.....	1
1.1.1. <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2. Mitochondrie.....	1
1.2.1. Mitochondriální procesovací peptidázy	3
1.2.1.1. MPP	5
1.2.1.2. MIP	6
1.3. Import proteinů do mitochondrie u trypanosom	7
1.3.1. Frataxin.....	10
2. CÍLE PROJEKTU	11
3. MATERIÁL	12
3.1. Organismy	12
3.2. Vektory	13
3.3. Média	14
3.3.1. Médium pro kultivaci procyklických stádií <i>T. brucei</i>	14
3.3.1.1. Antibiotika	14
3.4. Roztoky a pufrý	15
3.4.1. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza.....	15
3.4.2. Westernová analýza	16
3.5. Ostatní chemikálie.....	18
4. METODY	19
4.1. Kultivace procyklických stádií <i>T. brucei</i>	19
4.2. Stanovení počtu buněk <i>T. brucei</i> v kultuře	19
4.3. Sledování růstového fenotypu	19
4.4. Příprava králíčích a potkaních polyklonálních protilátek.....	19
4.4.1. Příprava proteinu a imunizace	20
4.4.2. Odběr séra	20
4.5. Příprava lyzátů <i>T. brucei</i>	20
4.6. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE)	21

4.7. Westernová analýza.....	21
4.7.1. Western blot.....	21
4.7.2. Hybridizace s protilátkami, vizualizace signálu	22
5. VÝSLEDKY	23
5.1. Sekvence genů s vyznačenými RNAi primerovými místy.....	23
5.2. Sledování růstového fenotypu.....	25
5.3. Příprava polyklonálních protilátek	26
5.3.1. Testování polyklonálních protilátek.....	26
5.4. Procesování lidského frataxinu v <i>T. brucei</i>	27
6. DISKUSE.....	30
7. ZÁVĚR	32
8. SEZNAM LITERATURY.....	33

1. ÚVOD

Pro eukaryotické buňky je charakteristická kompartmentalizace, neboli rozdělení jejich obsahu do oblastí obklopených membránami. Velká většina proteinů je kódována v jádře a syntetizována v cytosolu. Přibližně polovina z nich musí být transportována alespoň přes jednu buněčnou membránu do místa, kde následně plní svou funkci (Schnell a Hebert, 2003; Wickner a Schekman, 2005; Neupert a Herrmann, 2007).

Cílem této práce je přispět k našemu porozumění mechanismů umožňujících import proteinů do mitochondrie parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*.

1.1. Kinetoplastida

Řád Kinetoplastida patřící do kmene Euglenozoa obsahuje volně žijící prvky i důležité parazity lidí, živočichů a rostlin (Vickerman, 1989). Mezi medicínsky nejvýznamnější patří rod *Trypanosoma*.

1.1.1. *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je nejlépe studovaný trypanosomatid a původce spavé nemoci lidí (poddruhy *T. brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense*) a nagany, smrtelného onemocnění dobytka (*T. brucei brucei*). Přibližně 500 000 lidí, přinejmenším v rozvinutých zemích střední Afriky, je ročně postiženo touto nemocí. Parazit je přenášen mezi savčími hostiteli mouchou tse-tse. Procyklická forma *T. brucei* se rozmnožuje ve střevě hmyzího vektoru a diferencuje do krevní formy, která je nalézána v krvi a tkáňovém moku savčích hostitelů. *T. brucei* netvoří vnitrobuněčné formy (Matthews, 2005).

1.2. Mitochondrie

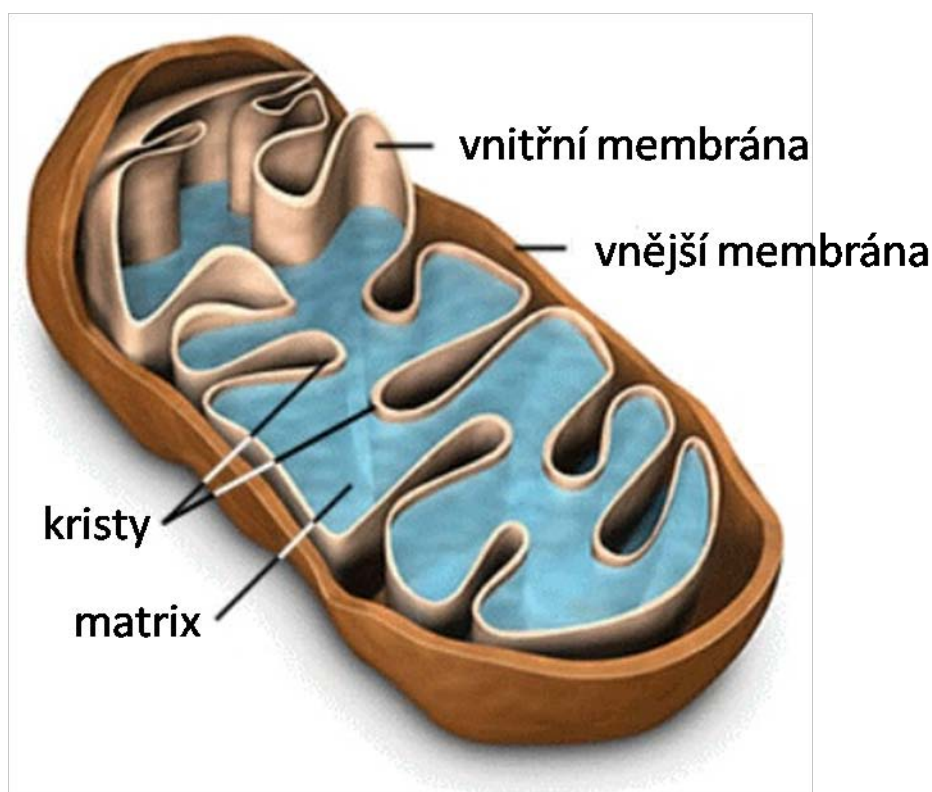
Mitochondrie *T. brucei* je stejně jako u všech eukaryot životně důležitou organelou, která kromě dalších funkcí hraje klíčovou úlohu v metabolismu, programované

buněčné smrti a syntéze Fe-S proteinů (Kakkar a Singh; 2007). Na rozdíl od ostatních organismů *T. brucei* velmi výrazně reguluje během životního cyklu stavbu i funkce své mitochondrie (Matthews, 2005).

Mitochondrie jsou obklopeny vnější membránou a vnitřní membránou vytvářející krysty, které zakládají mezimembránový prostor a matrix. Mitochondrie obsahují okolo 1000 (u kvasinky) až 1500 (u člověka) různých proteinů (Sickmann a kol., 2003; Perocchi a kol., 2006; Pagliarini a kol., 2008). Z těchto proteinů je přibližně 1% vytvářeno na ribosomech v matrix mitochondrie, zbytek je syntetizován na ribosomech v cytosolu. Proteiny kódované v mitochondriální DNA jsou pozůstatkem po prokaryotickém předchůdci mitochondrie a většina z nich představuje klíčové složky aparátu oxidativní fosforylace. Mitochondrie také obsahuje stovky proteinů prokaryotického původu, které jsou však vytvářeny v cytosolu, protože příslušné geny byly v průběhu evoluce eukaryotické buňky přeneseny do jádra. Další kategorii představují mitochondriální proteiny, které jsou čistě eukaryotického původu a které jsou rovněž do organely importovány z cytosolu.

U většiny eukaryot hraje mitochondrie klíčovou úlohu v bioenergetice buňky. U organismů schopných fermentace však nejsou proteiny dýchacího řetězce a mitochondriální ATP syntáza pro život esenciální. Import a zrání mitochondriálních proteinů a procesy biosyntézy Fe-S proteinů v matrix mitochondrie jsou naopak nezbytné pro všechna dosud studovaná eukaryota (Neupert a Herrmann, 2007; Lill a Mühlhoff, 2008).

Původně se myslelo, že všechny mitochondriální prekurzorové proteiny jsou importovány prostřednictvím jediného mechanismu, tzv. presekvenční cestou. Tato cesta zahrnuje vnější a vnitřní membránové translokázy s N-koncovými presekvencemi, které mají u prekurzorových proteinů funkci klasických targetovacích signálů řídících proteiny do mitochondrie. Postupem času se ukázalo, že existují další mechanismy mitochondriálního importu proteinů jako např. prostřednictvím proteinových přenašečů. Mezi nejnovější mechanické principy importu proteinů patří redoxně stabilizovaný import, tvorba superkomplexů s dýchacím řetězcem a dvoumembránové propojení translokáz (Chacinska a kol., 2009).

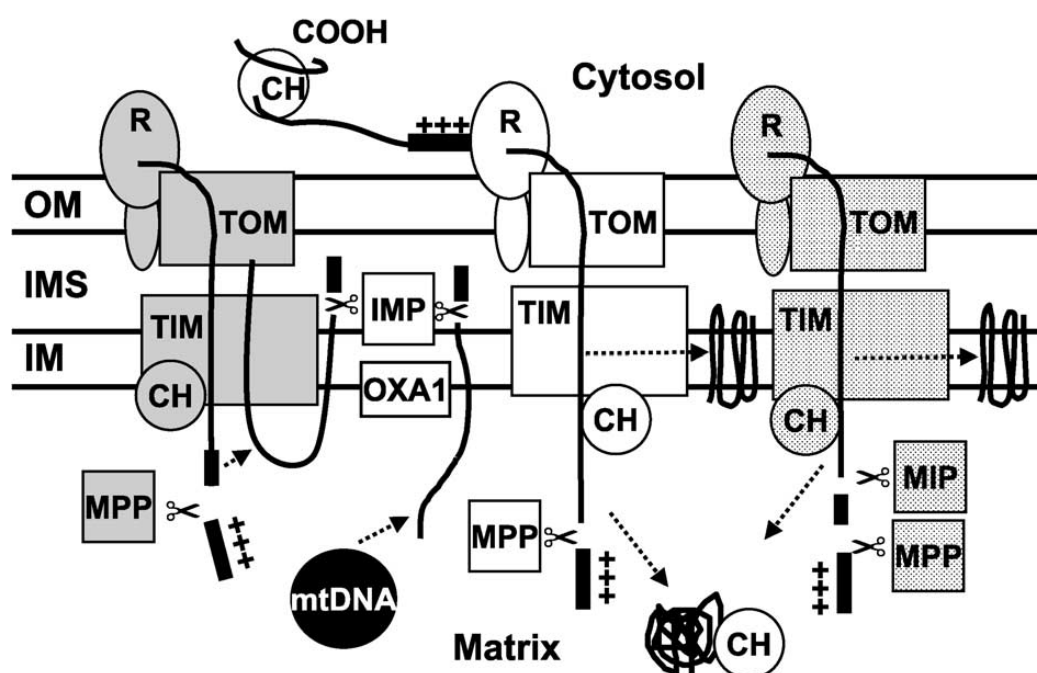


obr. 1.1 Struktura mitochondrie (<http://cellular-biology.blogspot.com/>; upraveno)

1.2.1. Mitochondriální procesovací peptidázy

Mitochondriální procesovací peptidázy jsou enzymy, které hrají důležitou roli v biogenezi mitochondrie rozpoznáváním a odštěpováním N-koncových signálních sekvencí jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů (Yaffe a kol., 1985). Většina proteinů importovaných do matrix a mnoho proteinů směřujících do mezimembránového prostoru a vnitřní mitochondriální membrány jsou syntetizovány jako velké prekurzorové polypeptidy obsahující N-koncovou signální sekvenci, která musí být pro správné sbalení a funkční stabilitu proteinu odštěpena (Mukhopadhyay a kol., 2007). Když proteiny dosáhnou svého cílového umístění je signální sekvence odštěpena specifickou procesovací peptidázou. Štěpitelné presekvence se obvykle skládají z 20-60 zbytků pozitivně nabitých matrixově-cílených aminokyselin, často následovaných dalším intramitochondriálním „třídícím“ signálem (von Heijne a kol., 1989). Většina proteinů vnější membrány a přenašečové proteiny vnitřní membrány jsou syntetizovány bez štěpitelných presekvencí a spíše nesou N-koncové, C-koncové a/nebo vnitřní signální sekvence.

Jsou známy tři typy mitochondriálních procesovacích peptidáz, které jsou zodpovědné za proteolytické štěpení jaderně a mitochondriálně kódovaných prekurzorových polypeptidů cílených do různých subkompartmentů mitochondrie. Mitochondriální procesovací peptidáza (MPP) štěpí většinu mitochondriálních proteinů, zatímco vnitřní membránová peptidáza (IMP) a mitochondriální střední peptidáza (MIP) procesují specifické podskupiny prekurzorových polypeptidů. Všechny tři enzymy jsou strukturně a funkčně konzervované napříč eukaryoty a poslední výzkumy ukazují, že jejich poruchy mohou působit některá mitochondriální onemocnění u člověka (Gakh a kol., 2002).



obr. 1.2 Proteolytické procesování prekurzorů mitochondriálních proteinů (Gakh a kol., 2002)

CH, cytoplasmatické a mitochondriální chaperony; R, vnější membránové receptory spojené s TOM, translokázou vnější membrány; TIM, translokáza vnitřní membrány; OM, vnější membrána; IMS, mezimembránový prostor; IM, vnitřní membrána; MPP, mitochondriální procesovací peptidáza; MIP, mitochondriální střední peptidáza; IMP, vnitřní membránová peptidáza; mtDNA, mitochondriální DNA; OXA1, OXA1 komplex

1.2.1.1. MPP

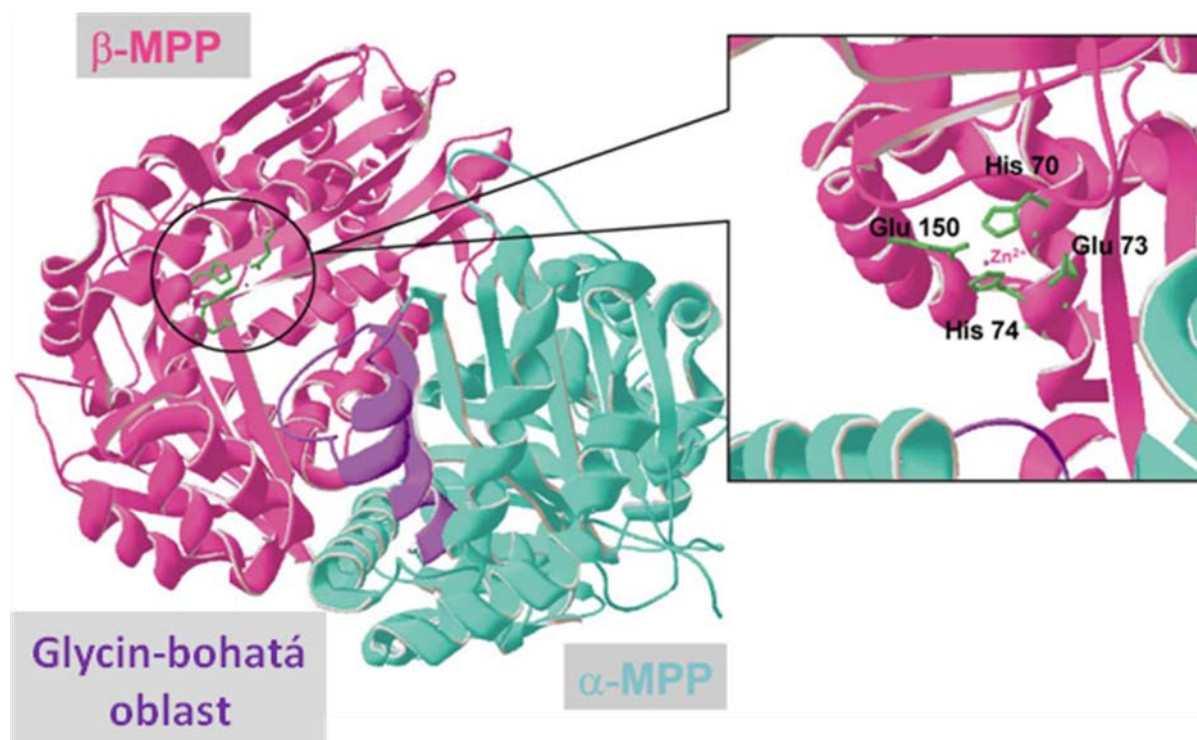
Mitochondriální procesovací peptidáza se skládá ze dvou podjednotek; větší podjednotky α -MPP a menší podjednotky β -MPP (Kalousek a kol., 1993). MPP u rostlin je jednou z výjimek z tohoto obecného pravidla, protože zde je enzym začleněn do komplexu cytochromu *bc1*. U různých rostlin obsahuje tento komplex 2-4 „core“ proteiny, které jsou totožné s α -MPP a β -MPP (Glaser a kol., 1999). α -MPP je zahrnuta v rozpoznávání substrátu, β -MPP má katalytickou funkci.

MPP ze *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* a živočišných buněk jsou heterodimery o velikosti 100-110 kDa. Zatímco kvasinkový a potkaní heterodimer MPP je stabilní (Yang a kol., 1988; Kleiber a kol., 1990), obě podjednotky MPP z *N. crassa* mohou být snadno během purifikace odděleny jedna od druhé (Hawlitschek a kol., 1988). Podjednotky jsou samy neaktivní, ačkoliv MPP z *N. crassa* funguje jako heterodimer (Arretz a kol., 1994), podobně jako kvasinkové a živočišné ortology (Geli, 1993; Saavedra-Alanis a kol., 1994; Adamec a kol., 1999).

MPP z různých zdrojů vykazují optimální aktivitu při pH 7-8 a jsou inaktivované při nižším pH. Enzym je inhibován v přítomnosti EDTA nebo o-fenantrolinu a stimulován dvojmocnými kovy, převážně Co^{2+} a Mn^{2+} (McAda a kol., 1982; Miura a kol., 1982; Conboy a kol., 1982; Schmidt a kol., 1984). Ačkoliv počáteční studie neodhalily žádné kovové ionty přidružené k vyčištěnému enzymu (Yang a kol., 1991), mírnější purifikační podmínky později odhalily Zn/MPP a Zn/ β -MPP v molárním poměru 1,05 a 0,86. Pokud jsou k apoenzymu přidány nízké koncentrace kovů, je aktivita obnovena v pořadí $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ (Luciano a kol., 1998). Podobně jako u jiných zinkových metalopeptidáz (Auld a kol., 1995), blokuje nadbytek Zn^{2+} činnost MPP, zatímco přebytečné Mn^{2+} nebo Co^{2+} nikoliv (Adamec a kol., 1999; Luciano a kol., 1998).

Sekvenční analýzou mitochondriálních prekurzorových proteinů byly odhaleny tři hlavní znaky společné pro většinu presekvencí, které jsou procesovány MPP: 1. celkový kladný náboj, 2. schopnost formovat amfifilický α -helix (von Heijne a kol., 1989; Allison a Schatz, 1986; Roise a Schatz, 1988) a 3. přítomnost argininového zbytku v pozici -2 a -3 od štěpícího místa (R-2 a R-3 motiv) (von Heijne a kol., 1989; Hendrick a kol., 1989).

Podobně jako všechny ostatní importované proteiny vyžaduje i import MPP procesování stejnými proteiny. Doposud charakterizované podjednotky MPP jsou syntetizované jako větší prekurzorové proteiny s matrixově-cílenými presekvcemi, které vyžadují přítomnost aktivní MPP v mitochondrii k tomu, aby byly zpracovány do zralé formy (Gakh a kol., 2002).



obr. 1.3 Struktura kvasinkové MPP (Gakh a kol., 2002; upraveno)

MPP zahrnují katalytickou β -MPP podjednotku, která váže zinečnatý kationt s využitím aminokyselinových zbytků konzervovaného motivu HxxEHx₇₆E a regulační α -MPP podjednotku s ohebnou glycin-bohatou oblastí, která je důležitá pro rozpoznávání substrátu. Obě podjednotky spolu tvoří záporně nabitou dutinu, která odstraňuje presekvenční během procesování.

1.2.1.2. MIP

Mitochondriální střední peptidázy jsou monomery o velikosti 70-75 kDa (Isaya a kol., 1994; Isaya a kol., 1995; Chew a kol., 1997; Kalousek a kol., 1992). Enzym není hojný (tvoří okolo 0,04% celkových mitochondriálních proteinů v případě potkaní MIP) a je nestabilní (Kalousek a kol., 1992). Purifikovaná potkaní MIP vykazuje pH optimum mezi 6,6-8,9 a je silně inhibována v přítomnosti 0,01 mM EDTA a plně reaktivována přidáním 0,1-1 mM Mn^{2+} . Jiné kovové ionty buď stimulují (Mg^{2+} nebo Ca^{2+}) nebo úplně potlačují (Co^{2+} , Fe^{2+} , nebo Zn^{2+}) enzym při koncentraci kovů 1 mM.

MIP jsou obohaceny o cysteinové zbytky, které ovlivňují funkci MIP dvěma způsoby: formováním jedné nebo více S-S vazeb, které mohou být důležité pro stabilitu MIP, nebo tvorbou jednoho nebo více Mn^{2+} vazebných míst, které patrně hrají úlohu v aktivitě MIP (Gakh a kol., 2002).

Poprvé byla MIP izolována z potkana jako protein tvořený 710 aminokyselinami s presekvencí dlouhou 33 aminokyselin (Isaya a kol., 1992). Na N-konci byl nalezen typický R-2 motiv a in vitro procesování ukázalo, že MIP prekurzor je štěpen do zralé formy proteinu pomocí MPP.

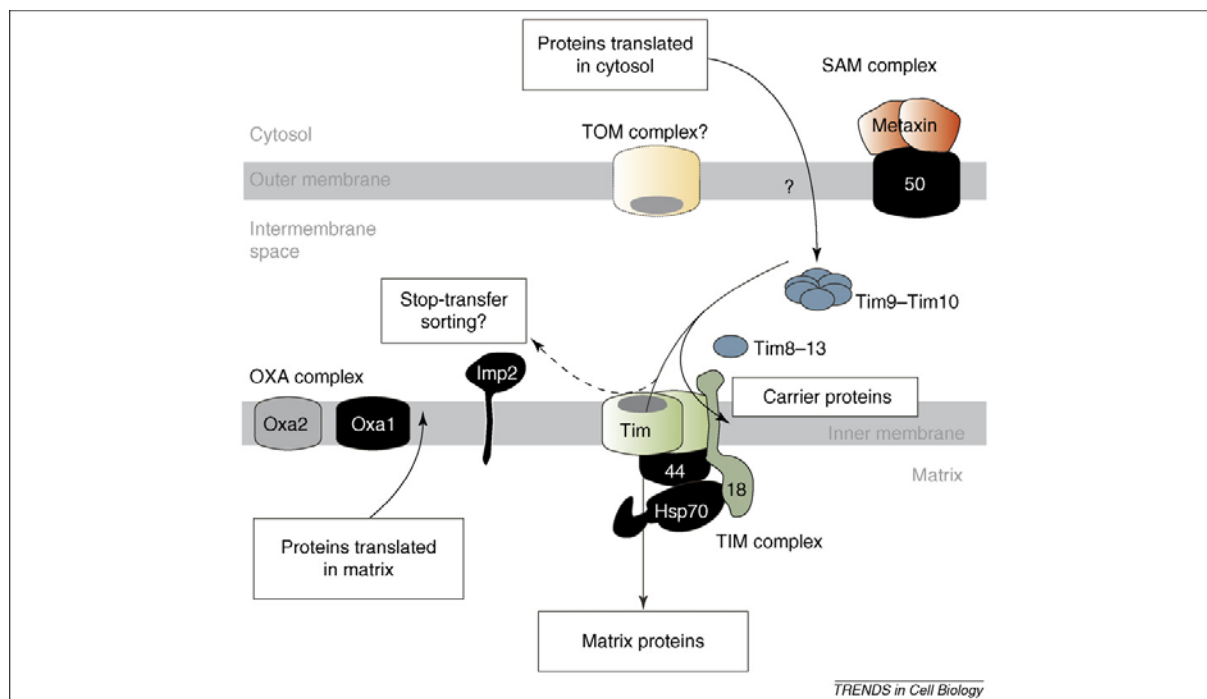
Mnoho mitochondriálních prekurzorových proteinů cílených do mitochondriální matrix nebo vnitřní membrány je procesováno ve dvou krocích MPP a MIP. Tyto prekurzory jsou charakterizovány R-10 motivem na C-konci signální sekvence (Hendrick a kol., 1989; Gavel and von Heijne, 1990). MPP nejprve odštěpí R-2 motiv a zbylý tzv. N-koncový oktapeptid je odštěpen MIP za vzniku zralé formy proteinu.

Všechny známé oktapeptidy obsahují velké hydrofobní zbytky (fenylalanin, leucin nebo isoleucin) v pozici -8 a malý hydroxylovaný zbytek (serin nebo threonin) nebo glycin v pozici -5, příbuzné MIP štěpicímu místu (Hendrick a kol., 1989; Gavel and von Heijne, 1990).

1.3. Import proteinů do mitochondrie u trypanosom

Mnoho trypanosomových mitochondriálně cílených proteinů obsahuje signální sekvence, které jsou mnohem kratší, než u mitochondriálních proteinů živočichů, rostlin a hub (Priest a kol., 1993; Häusler a kol., 1997; Priest a Hajduk, 1996; Priest a Hajduk, 2003; Tasker a kol., 2001; Uboldi a kol., 2006; Berriman a kol., 2005). Tyto krátké sekvence mohou být použity k řízení proteinů do mitochondrie u kvasinky (Häusler a kol., 1997), což dokazuje, že krátké signální sekvence obsahují „hlavní“ informaci uvnitř delších sekvencí, které se přirozeně vyskytují u kvasinkových a lidských proteinů.

V genomu *T. brucei* bylo anotováno několik vysoce konzervovaných složek mitochondriálního importního aparátu (Berriman a kol., 2005).



obr. 1.4 Model importu proteinů do mitochondrie u trypanosom (Schneider a kol., 2008; původní obrázek) Outer membrane = vnější membrána; Intermembrane space = mezimembránový prostor; Inner membrane = vnitřní membrána

SLOŽKY MITOCHONDRIÁLNÍHO IMPORTNÍHO APARÁTU	kvasinka	člověk	<i>Trypanosoma brucei</i>
Cytosolické chaperony	Hsp70	Hsc70	--
	Ydj1p	DjA1	--
	--	AIP	--
	--	Hsp90	--
TOM	Tom40	Tom40	?
	Tom22	Tom22	?
	Tom70	Tom70	?
	Tom20	Tom20	?
	Tom7	Tom7	?
	Tom6	--	?
	Tom5	--	?
SAM	Sam50	Sam50	Tb927.3.4380 (GeneDB = Sam50/Tob55)
	Sam35	--	Metaxin (Schneider a kol.)
	Sam37	--	Metaxin (Schneider a kol.)
	Mdm10	--	--
Rozpuštěné mezimembránové TIM	Tim9	Tim9	Tb927.7.2200 (Schneider a kol. = Tim9)
	Tim10	Tim10	Tb927.3.1600 (Schneider a kol. = Tim10)
	Tim8	Tim8	Tb11.02.3065 (Schneider a kol. = Tim8/Tim13, duplikace genu)
	Tim13	Tim13	Tb11.02.3065 (Schneider a kol. = Tim13/Tim8, duplikace genu)
TIM22	Tim22	Tim22	Tb11.01.4870 (Schneider a kol. = Tim17-Tim22-Tim23)
	Tim12	Tim10b	--
	Tim54	--	--
	Tim18	--	--
TIM23	Tim23	Tim23	Tb11.01.4870 (Schneider a kol. = Tim17-Tim22-Tim23)
	Tim17	Tim17a	Tb11.01.4870 (GeneDB = Tim17)
	--	Tim17b	--
	Tim50	Tim50	--
PAM	Tim21	--	--
	Tim44	Tim44	Tim44 (Schneider a kol.)
	mtHsp70	mtHsp70	mtHsp70 (Schneider a kol.)
	Mge1	mtGrpE	GeneDB
OXA	Pam18	--	Pam18 (Schneider a kol.)
	Pam16	--	--
	Oxa1	Oxa1	Tb11.02.4020 (Schneider a kol. = Oxa1)
IMP	--	--	Tb09.211.1580 (Schneider a kol. = Oxa2)
	Imp1	Imp1	--
	Imp2	Imp2	Tb10.70.2630 (Schneider a kol. = Imp2)
Matrix	Som1	--	--
	Mas1	β-MPP	Tb09.160.3110 (GeneDB = β-MPP)
	Mas2	α-MPP	Tb927.2.4110 (GeneDB = α-MPP)
	MIP	MIP	Tb927.10.9820 (GeneDB = MIP)
	Hsp60	Hsp60	GeneDB
	Hsp10	Hsp10	GeneDB
	mtHsp70	mtHsp70	mtHsp70 (Schneider a kol.)
	Mdj1	Tid	--
Mge1	mtGrpE	GeneDB	

tab. 1.1 Složky mitochondriálního importního aparátu (odvozeno od MacKenzie a Payne, 2007; Schneider a kol., 2008)

Vysvětlivky k tab. 1.1:

složky mitochondriálního importního aparátu pravděpodobně se nevyskytující u <i>T. brucei</i>
složky TOM komplexu doposud neidentifikované u <i>T. brucei</i> ; možná úplná absence TOM komplexu u trypanosom
složky mitochondriálního importního aparátu nalezené v genomu <i>T. brucei</i> a citované v článku Schneider a kol., 2008
Tb11.02.3065 – gen kódující ~10 kDa protein, který má sekvenční znaky Tim8 a Tim13
Tb11.01.4870 – gen kódující protein z rodiny Tim17-Tim22-Tim23, z důvodu vysoké sekvenční konzervovanosti Tim17, Tim22 a Tim23 není určeno o jaký Tim se funkčně jedná
složky mitochondriálního importního aparátu, které nebyly citovány v článku Schneider a kol., 2008, ale byly nalezeny v genové bance GeneDB

1.3.1. Frataxin

Frataxin je jaderně kódovaný mitochondriální protein, který je velmi konzervovaný u všech eukaryot (Puccio a Koenig, 2000). Import frataxinu a jeho správné procesování jsou důležité pro vnitrobuněčné děje. Frataxin hraje úlohu v metabolismu železa, jako je biogeneze hemu (Yoon a Cowan, 2004), tvorba Fe-S klastrů (Stehling a kol., 2004), vazebnost/uchovávání železa (Cavadini a kol., 2002) a aktivita „železného“ chaperonu (Bulteau a kol., 2004).

Prekurzorový protein lidského frataxinu je tvořen 210 aminokyselinami (Bencze a kol., 2006), které na N-konci vytvářejí signální sekvenci pro transport proteinu do mitochondrie. Nedostatek frataxinu způsobuje Friedreichovu ataxii což je autozomálně recesivní neurodegenerativní onemocnění, které je charakterizováno například ataxií končetin, ztrátou propriorecepce, dysartrií, kosterními abnormalitami, hypertrofickou kardiomyopatií a zvýšeným výskytem cukrovky (Pandolfo, 2003).

2. CÍLE PROJEKTU

1. Příprava polyklonálních protilátek proti mitochondriální procesovací peptidáze (α -MPP, β -MPP)
2. Testování protilátek proti α -MPP na buněčné linii MPP, testování protilátek proti β -MPP na buněčné linii hFTX+MPP (viz Materiál, Organismy)
3. Sledování růstového fenotypu a charakterizace buněčných linií MPP, MIP a hFTX+MPP (viz Materiál, Organismy)
4. Sledování procesování lidského frataxinu v buněčné linii hFTX+MPP (viz Materiál, Organismy)

3. MATERIÁL

3.1. Organismy

Trypanosoma brucei brucei, **kmen 29-13**, procyklické stádium

- divoký typ (WT)
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu a neomycinu (G418)

Trypanosoma brucei brucei, **MPP** (klon 2), procyklické stádium

- transgenní kmen odvozený od kmene 29-13, obsahuje RNAi vektor p2T7-177/ β -MPP s rezistencí proti phleomycinu
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu, neomycinu (G418) a phleomycinu

Trypanosoma brucei brucei, **MIP** (klon 2), procyklické stádium

- transgenní kmen odvozený od kmene 29-13, obsahuje RNAi vektor p2T7-177/MIP s rezistencí proti phleomycinu
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu, neomycinu (G418) a phleomycinu

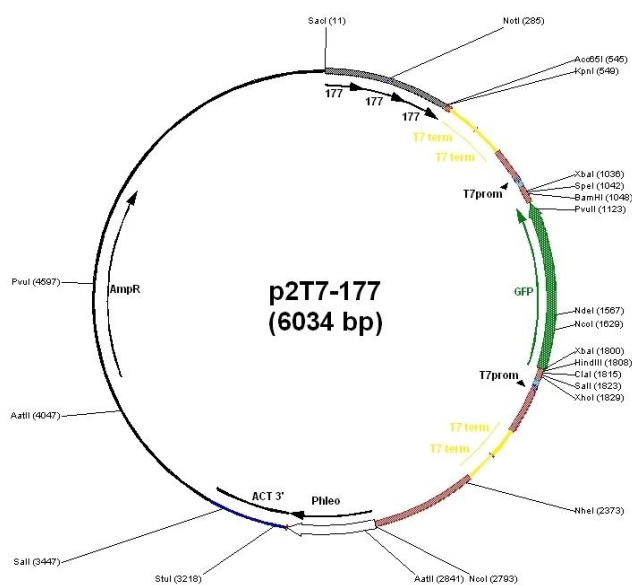
Trypanosoma brucei brucei, **hFTX+MPP**, procyklické stádium

- transgenní kmen odvozený od kmene 29-13, obsahuje RNAi vektor p2T7-177/ β -MPP s rezistencí proti phleomycinu a zároveň expresní vektor pABPURO/hFTX s rezistencí proti puromycinu (hFTX, gen pro lidský frataxin)
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu, neomycinu (G418), phleomycinu a puromycinu

3.2. Vektory

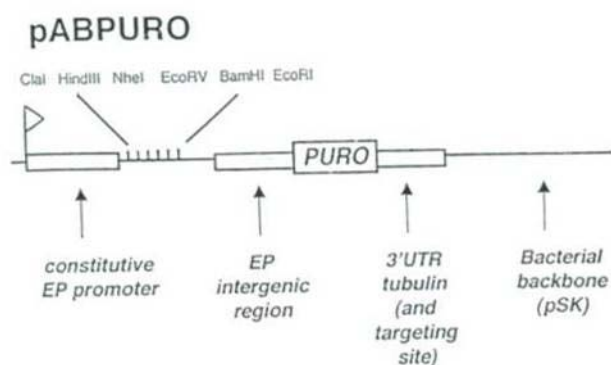
p2T7-177

- plasmid navržený pro expresi dsRNA a používaný pro snížení exprese genů mechanismem RNA interference (RNAi)
- obsahuje dva protisměrné tetracyklinem indukovatelné T7 promotory
- nese rezistenci proti phleomycinu



pABPURO

- plasmid navržený pro konstitutivní expresi proteinů
- nese rezistenci proti puromycinu



3.3. Média

3.3.1. Médium pro kultivaci procyklických stádií *T. brucei brucei*

Procyklická stádia *T. brucei brucei* se kultivují v médiu SDM-79 (Brun a Schönenberger, 1979) s přidavkem hygromycinu a neomycinu (G418) (divoký typ) a hygromycinu, neomycinu (G418), phleomycinu, případně puromycinu (transgenní kmeny).

3.3.1.1. Antibiotika

buňky	antibiotikum	zásobní roztok	ředění	finální koncentrace
kmen 29-13	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	--	--	--
	tetracyklin	--	--	--
neindukované kmeny MIP, MPP	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	2,5 mg/ml	1000x	2,5 µg/ml
	tetracyklin	--	--	--
indukované kmeny MIP, MPP	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	2,5 mg/ml	1000x	2,5 µg/ml
	tetracyklin	1 mg/ml	1000x	1 µg/ml
neindukovaný kmen hFTX+MPP	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	2,5 mg/ml	1000x	2,5 µg/ml
	puromycin	1 mg/ml	1000x	1 µg/ml
	tetracyklin	--	--	--
indukovaný kmen hFTX+MPP	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	2,5 mg/ml	1000x	2,5 µg/ml
	puromycin	1 mg/ml	1000x	1 µg/ml
	tetracyklin	1 mg/ml	1000x	1 µg/ml

3.4. Roztoky a pufry

Pokud není uvedeno jinak, jsou uvedené roztoky uchovávány při pokojové teplotě.

3.4.1. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

12% SDS polyakrylamidový gel (separační gel) (hodnoty pro 2 gely)

Milli-Q voda	3,3 ml
30% akrylamid (AA) (AppliChem)	4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 μ l

před naléváním přidat:

10% peroxosíran amonný (APS)	100 μ l
TEMED (Amresco)	4 μ l

5% SDS polyakrylamidový gel (zaostřovací gel) (hodnoty pro 2 gely)

Milli-Q voda	2,7 ml
30% akrylamid (AA) (AppliChem)	670 μ l
1 M Tris (pH 6,8)	500 μ l
10% SDS	40 μ l

před naléváním přidat:

10% peroxosíran amoný (APS)	40 μ l
TEMED (Amresco)	4 μ l

5x elektrodový pufř

Tris (Amresco)	15 g
glycin (Serva)	72 g
SDS (Serva)	5 g

- doplnit do 1 litru destilovanou vodou

2x vzorkový pufr

1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,24 ml
50% glycerol	2 ml
10% SDS	0,8 ml
2-mercaptoethanol	0,2 ml
1% bromphenol blue	0,4 ml
Milli-Q voda	6,36 ml

- uchovávat krátkodobě při teplotě 4°C nebo dlouhodobě při -20°C

3.4.2. Westernová analýza**Semi-Dry přenosový pufr**

Tris-HCl (Amresco)	11,64 g
glycin (Serva)	5,86 g
SDS (Serva)	7,5 g
methanol (LAB-SCAN)	400 ml

- doplnit do 2 litrů destilovanou vodou

Ponceau S

Ponceau S	0,5%
kyselina octová	1%
Milli-Q voda	

10x PBS

NaCl (Lach-Ner)	80 g
KCl (Lachema)	2 g
Na ₂ HPO ₄ (Lach-Ner)	14,4 g
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	2,4 g

- doplnit do 800 ml destilovanou vodou

- upravit pH na 7,4

- doplnit do 1 litru destilovanou vodou

PBS Tween (PBS-T)

10x PBS	100 ml
Milli-Q voda	900 ml
Tween 20 (LOBA Feinchemie)	500 µl

PBS Tween s 5% mlékem (PBS-TM)

odtučněné mléko (Promil)	10 g
--------------------------	------

- doplnit do 200 ml PBS-T
- uchovávat při teplotě 4°C

3.5. Ostatní chemikálie

antibiotika: Hygromycin (Sigma), Neomycin (Sigma), Phleomycin (Sigma), Puromycin (Sigma), Tetracyklin (Spofa); APS (peroxosíran amonný – Lachema), Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), IsoflowTM (Beckman), proteinové standardy: Precision Plus ProteinTM Standards - All Blue (Bio-Rad); PageRulerTM Prestained Protein Ladder (Fermentas); TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin) p.a. (Amresco), Freundovo adjuvans nekompletní (Sigma), Freundovo adjuvans kompletní (Sigma)

4. METODY (Poliak, 2008; upraveno/doplněno)

4.1. Kultivace procyklických stádií *T. brucei*

Kmen 29-13 kultivujeme v médiu SDM-79 (Brun a Schönenberger, 1979) s přídavkem 50 µl/ml hygromycinu a 15 µl/ml neomycinu (G418). V případě transgenních kmenů používáme k selekci buněk s integrovaným plasmidem různá selekční činidla. Nejčastěji přidáváme do média 2,5 µl/ml phleomycinu. Proces RNAi nebo expresi studovaných genů (pokud nejde o expresi konstitutivní) spouštíme u příslušných buněčných linií přidáním 1 µl/ml tetracyklinu. Při dosažení koncentrace 2×10^7 buněk/ml přeočkujeme kulturu do čerstvého média.

4.2. Stanovení počtu buněk *T. brucei* v kultuře

Stanovení koncentrace buněk procyklických stádií *T. brucei* v kultuře provádíme pomocí přístroje Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter) (dilution factor = 200, Tl = 3,5 µm, Tu = 7,7 µm, count = between). Přístroj určuje koncentraci na základě měření vodivosti suspenze buněk.

4.3. Sledování růstového fenotypu

Po indukci RNAi sledujeme u příslušného transgenního kmene *T. brucei* změny růstové rychlosti a růstový fenotyp. Buňky nejprve naředíme na koncentraci 5×10^6 buněk/ml do 5 ml média SDM-79 s přídavkem odpovídajících antibiotik a přidáme 1 µg/ml tetracyklinu, čímž dojde ke spuštění RNAi. V pravidelných 24 hodinových intervalech stanovujeme po dobu 14 dnů koncentraci buněk v kultuře. Pro všechna měření používáme kultury neindukovaných a indukovaných buněk a kulturu buněk kmene 29-13.

4.4. Příprava králíčích a potkaních polyklonálních protilátek

Pro přípravu polyklonálních protilátek používáme králíky a potkany. Imunizační schéma, příprava proteinu a odebírání séra vypadá následovně.

Před první imunizací odebereme králíkovi/potkanovi krev z ucha/ocasů a získáme tzv. preimunní sérum. Poté použijeme protein smíchaný s Freundovo adjuvans (Sigma) a v intervalech 14 dnů imunizujeme. Imunizační schéma obsahuje celkem čtyři imunizační dávky, poté jsou zvířata vykrvena. Získaná séra uchováváme při teplotě -20°C .

4.4.1. Příprava proteinu a imunizace

Proužek polyakrylamidového gelu obsahující protein (0,5 mg v případě imunizace králíka; 0,1 mg v případě imunizace potkana) – v případě, že protein není možné purifikovat jako nativní – rozmělníme pomocí homogenizátoru, přidáme 1x PBS a Freundovo adjuvans v poměru 1:1. Pro první imunizaci používáme kompletní Freundovo adjuvans, pro všechny další imunizace potom nekompletní Freundovo adjuvans. Maximální imunizační dávka je 1 ml. U králíků provádíme imunizaci podkožně, obvykle do tří různých míst. V případě potkanů se první dávka aplikuje mezi prsty, další do svalu. Každou imunizační dávku je nutné před aplikací řádně protřepat.

4.4.2. Odběr séra

Dva týdny po poslední imunizaci zvířata vykrvíme. Získanou krev necháme několik hodin stát při pokojové teplotě a poté stočíme (3000 rpm, 20 minut). Sérum uchováváme při -20°C .

4.5. Příprava lyzátů *T. brucei*

Objem kultury obsahující 5×10^7 procyklických stádií *T. brucei* stočíme při 3000 rpm po dobu 5 minut. Pelet opláchneme 1 ml 1x PBS a přeneseme do mikroskopické kádinky. Stočíme ve stolní centrifuzě při 6000 rpm po dobu 5 minut. Odebereme 1x PBS, resuspendujeme v 50 μl 2x PBS a přidáme 50 μl 2x vzorkového pufru pro SDS polyakrylamidové gely. Takto připravené lyzáty uchováváme při teplotě -20°C .

4.6. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE)

Proteiny rozdělujeme pomocí vertikální SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy. Polyakrylamidový gel obsahuje dvě fáze (zaostřovací a separační). Nejprve připravíme 12% separační gel, který nalijeme mezi dvě dobře odmaštěná skla umístěná ve stojánku tak, aby hladina dosahovala přibližně 1 cm pod hroty zasunutého hřebenu. Poté nalitý gel převrstvíme n-butanolem (100 µl). Během 20-30 minut separační gel zpolymeruje a mezi ním a vrstvou n-butanolu se vytvoří ostré rozhraní. Po dokončení polymerace n-butanol odsajeme filtračním papírem a nalijeme 5% zaostřovací gel. Mezi skla vsuneme hřeben a necháme ztuhnout. Během 15 minut gel zpolymeruje. Mezitím připravíme 250 ml elektrodového pufru naředěním 5x koncentrovaného zásobního roztoku. Po dokončení polymerace odstraníme hřeben a skla s připraveným dvoufázovým gelem vložíme do elektroforetické aparatury Mighty Small (Hofer/Amersham Biosciences). Vytvořené jamky a vnitřní (katodový) prostor naplníme elektrodovým pufrem. Spodní (anodový) prostor rovněž naplníme elektrodovým pufrem.

Vzorky proteinů před nanesením na gel zdenaturujeme (10 minut, 95-100°C) a krátce stočíme. Do jamek nanášíme 10 µl lyzátu. Spolu se vzorky nanášíme také „barvený“ proteinový standard (Precision Plus ProteinTM Standards - All Blue (Bio-Rad)). Vlastní elektroforéza probíhá při napětí 90V v zaostřovacím gelu, po přechodu do separačního gelu pak při 140 V.

4.7. Westernová analýza

4.7.1. Western blot

Vzorky rozdělené SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézou přeneseme z gelu pomocí Semi-Dry blotu (Trans-Blot[®] Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) na nitrocelulózovou membránu (BioTrace[®] NT Pure Nitrocellulose Membrane, Pall Corporation Life Sciences). Blotovací sendvič je vytvořen následovně: blotovací papír Whatman, membrána, gel, blotovací papír Whatman.

Nejprve si připravíme membránu tak, aby její velikost odpovídala velikosti gelu a necháme ji společně s gelem několik minut inkubovat v Semi-Dry přenosovém pufru. V případě blotovacího papíru stačí pouze několikavteřinová inkubace. Po sestavení blotovacího sendviče odsajeme ubrouskem přebytečný pufr a necháme blotovat 1 hodinu při napětí 20 V. Po přenosu proteinů opláchneme membránu v PBS Tweenu, popřípadě ještě obarvíme v roztoku Ponceau S a tím přenos ověříme. Po obarvení, které trvá přibližně 3 minuty, membránu promyjeme v Milli-Q vodě a v PBS Tweenu až do odbarvení pozadí. Membránu blokujeme přes noc v PBS Tweenu s 5% mlékem.

4.7.2. Hybridizace s protilátkami, vizualizace signálu

Před inkubací opláchneme membránu v PBS-T. Vlastní hybridizace probíhá v roztoku PBS-TM, s primární protilátkou 2 hodiny a sekundární protilátkou 1 hodinu; v obou případech pak při pokojové teplotě a za stálého třepání. Po každé inkubaci promyjeme membránu v PBS-T (5x 5 minut). Pro westernovou analýzu používáme různé druhy primárních protilátek, jejichž ředění se pohybuje v rozmezí 1:200 – 1:2000. Sekundární protilátkou je prasečí protilátka proti králičím protilátkám značená peroxidázou SwaR/Px (Sevac) popřípadě protilátka proti myším nebo potkaním protilátkám. U sekundárních protilátek používáme ředění 1:1000 – 1:2000. Specifickou vazbu zviditelňujeme pomocí vyvolávacího kitu PIERCE ECL Western Blotting Substrate (PIERCE) a signál detekujeme pomocí přístroje FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (FUJIFILM Life Science).

5. VÝSLEDKY

5.1. Sekvence genů s vyznačenými RNAi primerovými místy

Sekvence genů β -MPP a MIP byly získány z genové banky GeneDB (obr. 5.2 a 5.3). Pro oba geny byly navrženy primery, podle nichž byly pomocí PCR zmnoženy fragmenty, které byly posléze zaklonovány do RNAi vektoru p2T7-177 a elektroporovány do procyklických stádií *T. brucei*. Po vyselektování transformantů byly kultury transgenních kmenů *T. brucei* rozklonovány a zamraženy v tekutém dusíku.

```

ATGCTTCGTCCATCCTTTTTGCAGATGTCTTCCCGTGCTGAACTGCACGCT 50
GAGCGCTCCTCAATGTGCTGCTGCGATTGACCGTTGCACACCGGTTGTTT 100
ACTCTTCACTTCCCAACGGATGTCGTGTGGCCACCGAATATTTGCCAAAT 150
TGTCAGTTTGCCACCGTTGGGGTGTGGATTGACGCAGGCAGTCGCTTCGA 200
GGATATTAACAACAACGGCGTTGCGCACTTTCTTGAACACATGAACTTCA 250
AAGGCACTGCAAAGTACTCCAAGCGTGCCGTGGAAGATCTCTTCGAGCAT 300
AGGGGGGCCCACTTCAATGCATACACTTCGCGTGACCGAACAGCATATTA 350
CGTGAAGGCGTTCAAATATGATGTGGAGAAAATGATTGATGTTGTCTCGG 400
ATTTACTGCAAAACGGCAGATACGACCCAAGCGATGTTCGAGTTGGAGAGG 450
CCGACAATCCTAGCCGAGATGCGGGAGGTGGAGGAGCTGGTGGATGAAGT 500
GCTCATGGATAACCTCCATCAGGCAGCTTATGACCCGGCACACTGCGGGC 550
TTCCGCTCACTATTCTAGGCCCTGTGGAAAACATTTCTCCCGCATAAAC 600
CGTGACATGATACAGGAGTTTGTTCGGGTGCACTACACCGGCCCGCGCAT 650
GTCTTTCATTAGTTCCGGTGGCATCCATCCAGAAGAAGCACATAGGCTTG 700
CCGAGAAGTTCTTTGGAAACCTCCCTGCAGCGAACAACCTCCCACTGCTG 750
CAGTCACAATACCGGGGTGGTTACACCGTGATGTGGAACGAACAAATGGC 800
CACGGCAAATACCGCTTTTCGCGTATCCTATATGCGGGGCCATACACGACG 850
ACAGCTACGCACTACAGTTAGTTTATAACGTTATTGGGCAAGTGCGTGAA 900
GGACAACATGACCAATTTGCTCATCAGCGACTGAACCCGCGGCTCCCGTG 950
GGAAAAGTTGTCAAACCTGGTCCAGCTGCGGACCTTTCTATACTCCATACA 1000
AAGAGACTAGTCTCCTTGGGTATCAGTTAGTTACTATGCGCACGGCAGTC 1050
GCTGACGCCAACGGCGGTGTTTCAGCGAGATGAGAGCCAGACTGTGTTGCT 1100
GGATCACATGCTAAAGTTGTTTAATGAGCTGTCTACCAAAGCTGTTGACG 1150
CTGCACTCCTCGAGGAGGCAAAAAGTGAGTATAAGTCATCGGTTATGATG 1200
ATGCGAGACAGCACAACAATAGCGCGGAGGACTTGGGTTCGGCAGATGAT 1250
TCACCTTGGCCGACGCGTGCCTCTGCGGGAGGTGTTTCGAGCGAGTGGATG 1300
CCGTCACTCCAGCAGTGTTCGTGACACATTAGCGAAGTACGTACAAGCG 1350
GTTCAACCTACAGTTTTCGTACATTGGTTTCGGCCTCCGCTGTCCCTCGATT 1400
TGACGCCCTCACACAAGTAAAGCACATACTTTGA 1434

```

obr. 5.1 Sekvence genu β -MPP s vyznačenými RNAi primerovými místy

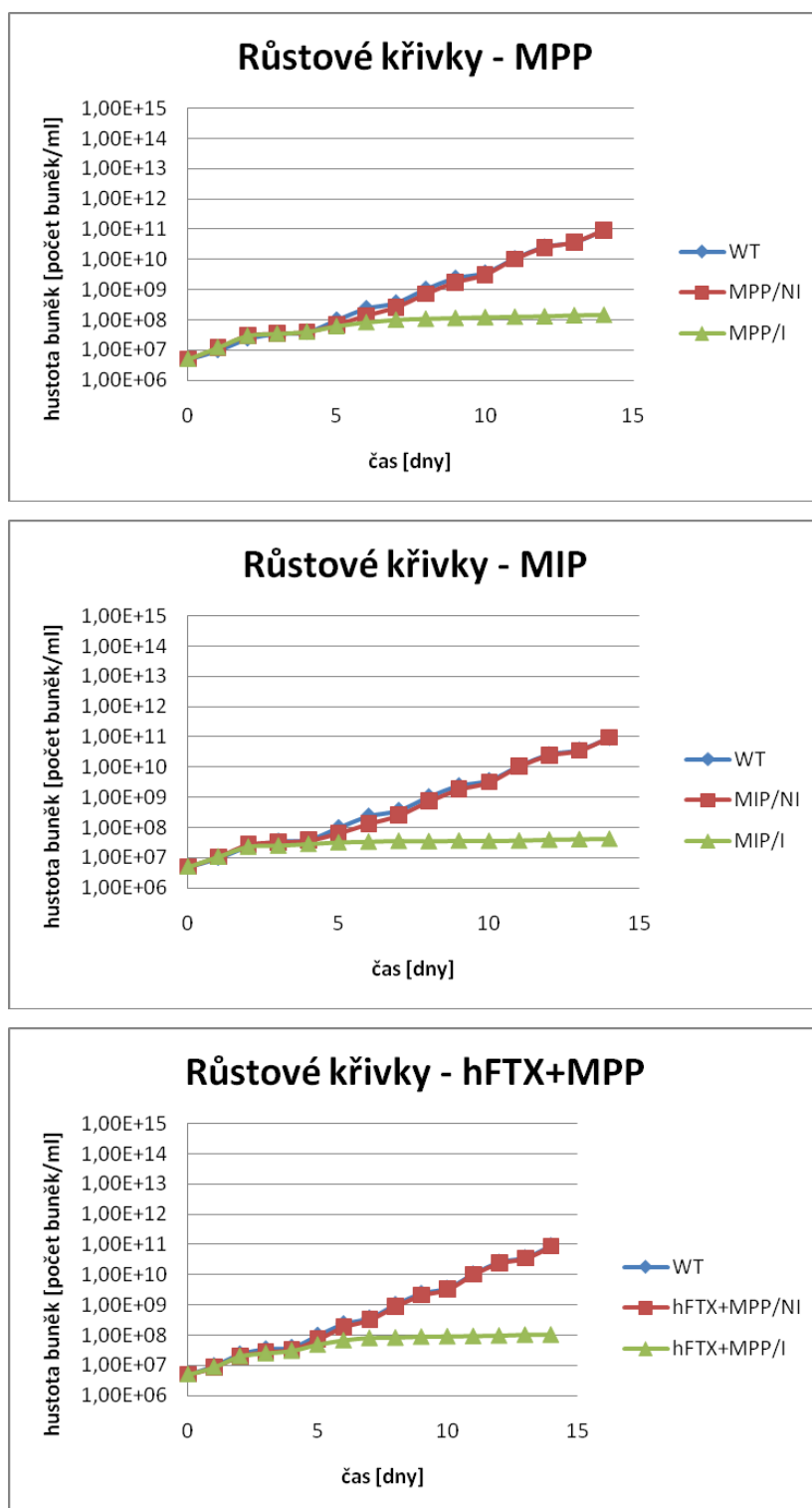
Sekvence získaná z genové banky: Tb09.160.3110, velikost genu: 1434 bp

ATGTTGCGGCGTGTACCCCCCTTCACACTGTGTGCTTCAGGCTTCACTGC 50
 CTGCCGTTGGGCCGACGAGTGCATGGTGCACGATTTGTTTCAGCTG 100
 TCAGTGATGCAACCGCTGGGAAGCAAAAAGCGCTTGTGTACCGACGTG 150
 GAGGAAATACCCACACTTTCTTTCTTTCCTTTCGTCAAAGTCCATATTGTCGGA 200
 GACAGTTGATCGAACCATTGAGGTGTGTGACGCACTTCTAAACGAAATTC 250
 CAAAGGCCAAGAGCATAAAAGAAAAACACGACCTTATTGACTCAACTAGT 300
 AACGTTCTATGTCTTCTTCTTGACCCCTGTGAGTTTGTGCGCCAGGTTCA 350
 CCCTGATGCGGAGTACAAGCAGCATGCCTCGTACGCATTTCAAAGGGAT 400
 ATGAGTACATGAGTAAAGTCAACTCCCGAAGGGATTTGTACGATTTGTC 450
 CTTTCAGCTTGACAGCACTGAGGGACACAAGGAACTCAGTAGTGAAGAAAT 500
 TAAAAACGTGGCCCAACTTAGGCGGGACATGGAAAGTAACGGCATCCATC 550
 TCCCCGACAAACTACGTGAGAAGGTAAGTGAATGAACATTGAAAAGGAG 600
 GAACTCGCCATGCGCTTCTGACGGAGCAGGGTTCGAAGAATCCCTTTGC 650
 AACACTCCGTTATCTTCTTCAGTGCCGTTACGAACTCTCGCAACTGCTGG 700
 GGTTCGAGAGCTTCGAGCAACAACAACCTTCGAGGGACAATGCTGGAAAAT 750
 CAGCAGCGTGTTCGCGATTTCTTGTGTGGAATTGCCATAAGTACCGGAG 800
 AGAGGCCGAGAAGGAGATGGATATCATAACGAGCAACGTTGGAGAAGTAC 850
 GTAATCGACAAAACATTACAGACGATGTCGAGCTCGAGTGGCTCATTCA 900
 CTAAGACGTGATGCGGAGCCGAAAACAGCGGCTGAGTATTTCTCCGTTGC 950
 AAAGTGCATACGCGGTATTCAGTGCCTCTGTTTGGAGGTTTTTGGCGTGC 1000
 GGTTCGAGGAAAGTGCAGTTCGACAAAAGATGAGATCTTCAACAACGACGCC 1050
 AAAAAGTATCACGTGTATGACGAGAATAAGGCGTTTCTTGGAGTTATCGT 1100
 ACTCGATTTGTACGCGAGTGAAATGAAATATTGCCAAGCTGGCCACCTTA 1150
 CGTTGCAGCTTGGTTGTATACCCACCAAGAGGCCTTGGCAAAGGTGGGG 1200
 CTAAGTTACCGAAACGCCAGTATCCCGTTGTTGTTTAAACGTGCAATGT 1250
 TGGAGCCTGCTCGCCCGTGCAGCGACTCCCTAATGGTAGGTTTGACGATG 1300
 AGTCTACGCTTATGCACCCCAATGAAGTGACAACAGTTTTTTCACGAGTTT 1350
 GGTTCATGCGATGCACACCATTTTTGGCCAGACGAAGGTACAGAACCTCGC 1400
 TGGAACACGTGCTAGTATCGATTTTGTAGAGACATTCTCGCAGCTCTTTG 1450
 AGCAATTCCTCACCTCCCATGAGTTTCTGCAGTTGTGGGCACACCGTATC 1500
 AGCACGCGGGAACCCATCTCATTTGACATGGTCATGAAACGGAACGCAGC 1550
 TGCTGACATGTTCAAGCACCTTGACATGATGGATCAAGTAGTTCTTTTCGG 1600
 CGGTAGATCAGACCCTTCATGGTCTCAGCCATACACTGTGTACTTTCCT 1650
 CGTGGAGACCAGGGGAACCTTGGGAAACGTACACTTGGAGATATCGGCCGA 1700
 CTACGGACGCGGTACGTACAACCTTAGCAAAGGTCTTATCGACATATGTA 1750
 CTCCTCTTTCTATTGTGACACCGACGGAACAGGCGTTTTTGGGTACTCTT 1800
 TCGTTTGAACACCTCTCCGTTACCCAGCAGGTTACTACGGTTACCTTTA 1850
 CAGTCTTTCCATTGCTCGTCGCATATGGGCGAAGAAGTTTATGAAGGACC 1900
 CGCTTAACCGTGACGCAGGGAGGGAGCTGGTGCAAAAAGTAATGCGCCAC 1950
 GGGGCTGCATGTAACCCTGTTGATGTCATTGAGAACTATCTGGAGGACAA 2000
 ACTCGATGAAATCGACATATGGGTGTGA 2028

obr. 5.2 Sekvence genu MIP s vyznačenými RNAi primerovými místy

Sekvence získaná z genové banky: Tb927.10.9820, velikost genu: 2028 bp

5.2. Sledování růstového fenotypu



obr. 5.3 Růstové křivky

Analýza růstového fenotypu buněčných linií: MPP, MIP, hFTX+MPP

Nejprve byly připraveny transgenní linie procyklického stádia *T. brucei*, které obsahují RNAi vektor p2T7-177 se zaklonovaným 480 bp dlouhým fragmentem genu β -MPP nebo s 560 bp 5' oblastí genu MIP. Dále byl do buněčné linie, která obsahuje p2T7-177 s výše uvedeným fragmentem β -MPP vnesen pABPURO vektor nesoucí gen kódující 210 aminokyselin dlouhý prekurzor lidského frataxinu (linie hFTX+MPP). Z každé linie byl vybrán jeden klon (v případě β -MPP klon 2, v případě MIP klon 2, u hFTX+MPP se jedná o nerozklonovanou kulturu), u něhož byl po indukci RNA interference (RNAi) sledován růstový fenotyp. Růstové křivky byly zkonstruovány na základě 14 denního měření hustoty buněk u neindukovaných a indukovaných kultur. Měření bylo prováděno v pravidelných 24 hodinových intervalech. Pokud přesáhla koncentrace buněk v kultuře hustotu 2×10^7 buněk na 1 ml média, byly buňky přeočkovány do čerstvého média 10x naředěny. V buňkách byla RNAi spuštěna přidáním tetracyklinu o výsledné koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$. Jako kontrola byly použity buňky rodičovského kmene 29-13. Z grafů je patrné, že přibližně 5. den po indukci RNAi dochází u všech buněčných linií k významné změně rychlosti dělení buněk, což znamená, že příslušné geny jsou pro buňku esenciální (**obr. 5.3A a B**). U buněk nesoucích lidský frataxin a zároveň fragment *T. brucei* β -MPP genu je růstová křivka totožná s linií obsahující pouze uvedený MPP konstrukt (**obr. 5.3C**).

5.3. Příprava polyklonálních protilátek

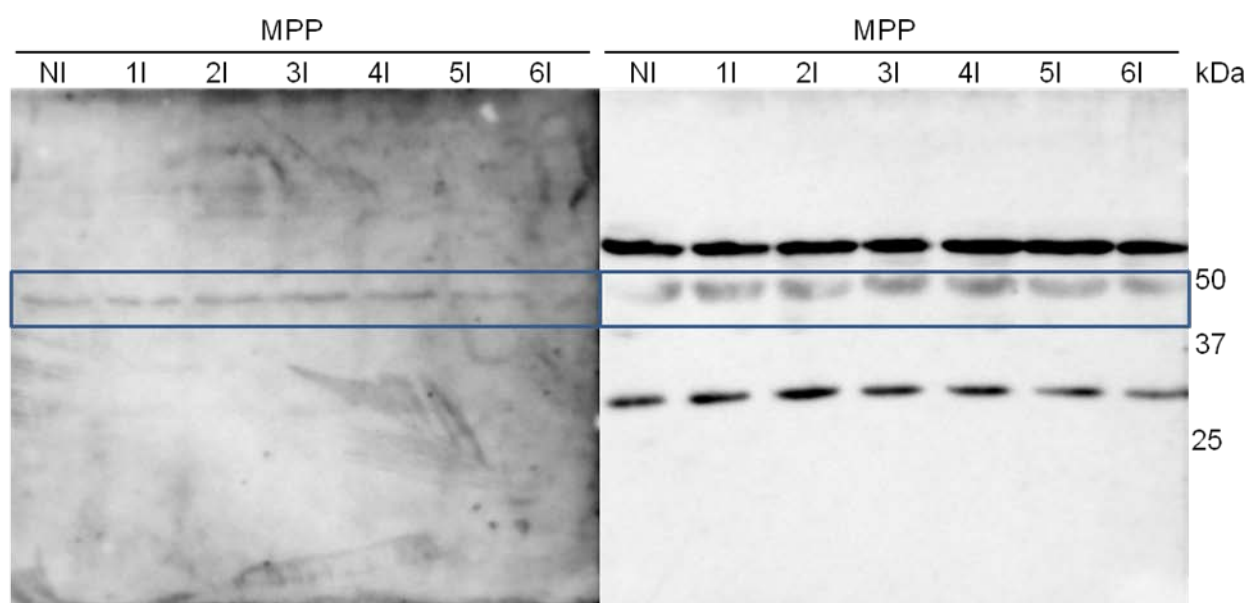
Proteiny obou podjednotek MPP pro přípravu polyklonálních protilátek byly poskytnuty Mgr. Janem Machem (PřF UK). Jelikož nebylo možné získat proteiny v nativní formě, byly pro imunizaci králíků/potkanů použity proteiny v polyakrylamidovém gelu, který byl rozmělněn a smíchán s Freundovo adjuvans. Polyklonální protilátky ve formě séra byly získány po kompletní imunizaci vykrvením zvířat. Krev byla stočena a sérum uchováno při teplotě -20°C .

5.3.1. Testování polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky proti α -MPP byly testovány na buněčné linii MPP (viz Materiál, Organismy) pomocí westernové analýzy. Cílem bylo zjistit, zda u buněk s eliminovaným proteinem β -MPP dochází ke změnám exprese α -MPP proteinu. Proto byly připraveny celkové lyzáty z neindukovaných a indukovaných buněk MPP (1-6 dní po indukci RNAi). Vzorky byly rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu

(obr. 5.4) a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (BioTrace[®] NT Pure Nitrocellulose Membrane, Pall Corporation Life Sciences). Membrána byla hybridizována se specifickou polyklonální protilátkou proti α -MPP proteinu.

Protein α -MPP (Tb927.2.4110) má molekulovou hmotnost 52,07 kDa a jeho exprese není ovlivněna RNA interferencí proti β -MPP (Tb09.160.3110) (obr. 5.4).



obr. 5.4 Westernová analýza – testování protilátek α -MPP

NI – neindukované buňky; 1I-6I – indukované buňky linie MPP

obrázek vlevo, protilátky: anti- α -MPP – 1:500, králík – 1:1000;

obrázek vpravo, protilátky: anti- α -MPP – 1:500, potkan – 1:2000

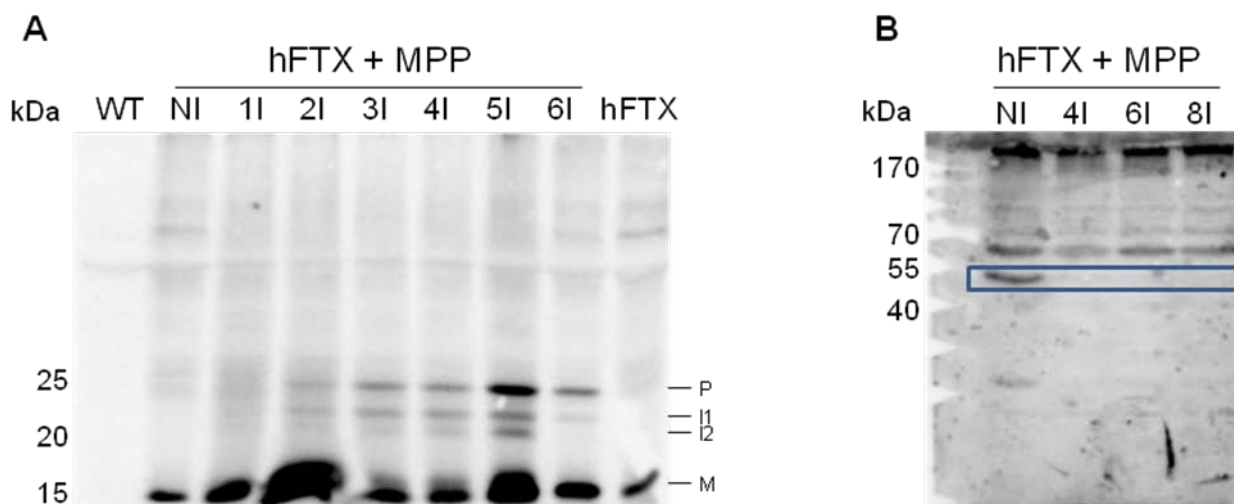
5.4. Procesování lidského frataxinu v *T. brucei*

Buněčná linie hFTX+MPP byla použita pro sledování procesování lidského frataxinu za účelem zjistit, zda je lidský frataxin v buňkách *T. brucei* procesován stejným způsobem jako v buňkách lidských. Byly připraveny celkové lyzáty z neindukovaných a indukovaných buněk hFTX+MPP (1-6 dní po indukci RNAi), dále pak z buněk hFTX (29-13 buňky obsahující expresní vektor pABPURO se zaklonovaným genem pro lidský frataxin) a z rodičovského kmene 29-13. Všechny vzorky byly rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu.

Membrána byla hybridizována s komerčně dostupnou monoklonální protilátkou proti lidskému frataxinu (frataxin monoclonal antibody, MitoSciences[®] - v **obr. 5.5A** značena jako anti-hFTX).

Zralý lidský frataxin (M – maturovaný protein) má molekulovou hmotnost 17 kDa. Westernovou analýzou bylo zjištěno, že v buňkách hFTX+MPP dochází po eliminaci proteinu β -MPP k určitým změnám v procesování lidského frataxinu. Od druhého dne po indukci RNAi se začínají objevovat další formy proteinu (P – prekurzor; I1 – intermediát 1; I2 – intermediát 2) a především dochází k přibývání prekurzoru (neprocesovaného proteinu). U dráhy označené 5I (**obr. 5.5A**) bylo pravděpodobně nanášeno větší množství proteinů, takže se může zdát, že dochází k akumulaci všech forem proteinu. Ve skutečnosti jde pouze o přibývání prekurzoru; s počtem dnů od indukce RNAi se výskyt intermediátních forem snižuje (dobře patrné v dráze 6I).

Účinnost RNAi byla u buněčné linie hFTX+MPP ověřena westernovou analýzou. Membrána obsahující proteiny z neindukovaných a indukovaných buněk (4, 6 a 8 dní po indukci RNAi) byla hybridizována se specifickou polyklonální protilátkou proti β -MPP (**obr. 5.5B**). Touto analýzou byla potvrzena účinnost RNAi, neboť v drahách 4I, 6I a 8I dochází k úplnému vymizení proteinu β -MPP o molekulové hmotnosti 53,69 kDa.



obr. 5.5A Westernová analýza – sledování procesování lidského frataxinu

WT – rodičovský kmen 29-13; NI – neindukované buňky; 1I-6I – indukované buňky linie hFTX+MPP; hFTX – linie *T. brucei* obsahující expresní vektor pABPURO/hFTX (lidský frataxin plně procesovaný); P – prekurzor (frataxin1-210); I1 – intermediát 1 (frataxin 42-210); I2 – intermediát 2 (frataxin 56-210); M – maturovaný protein (frataxin 81-210);
 protilátky: anti-hFTX – 1:200, myš – 1:2000

obr. 5.5B Westernová analýza – kontrola účinnosti RNAi v buňkách hFTX+MPP

NI – neindukované buňky; 4I, 6I, 8I – indukované buňky linie hFTX+MPP
 protilátky: anti-β-MPP – 1:250, potkan – 1:2000

6. DISKUSE

V předkládané práci jsem se zabýval studiem mitochondriálních procesovacích peptidáz u procyklického stádia *Trypanosoma brucei*. Práce byla prováděna na buněčných liniích *T. brucei*, které obsahovaly RNAi vektory se zaklonovanými geny kódujícími mitochondriální procesovací peptidázy MIP a β -MPP. U obou buněčných linií byl po indukci RNA interference sledován růstový fenotyp. Na základě získaných dat byly sestrojeny růstové křivky z nichž je zřejmé, že u obou linií došlo přibližně 5. den po indukci RNAi k zastavení růstu, což svědčí o esenciálním charakteru příslušných genů pro toto vývojové stádium trypanosom. Funkční analýza MIP nebyla zatím s výjimkou růstové křivky realizována, ale příslušné pokusy jsou plánovány pro nejbližší období.

Byly vytvořeny čtyři specifické polyklonální protilátky proti oběma podjednotkám mitochondriální procesovací peptidázy; dvě proti α -MPP a dvě proti β -MPP. Všechny tyto protilátky byly testovány na buněčné linii s vypnutou β -podjednotkou MPP a podařilo se prokázat, že jedna z protilátek proti β -MPP je specifická. Dále jsem se pokusil zjistit, zda je u výše uvedených buněk rovněž ovlivněna exprese či stabilita proteinu α -MPP, neboť obě podjednotky spolu interagují a tvoří komplex (Arretz a kol., 1994; Geli, 1993; Saavedra-Alanis a kol., 1994; Adamec a kol., 1999). Westernová analýza s polyklonální protilátkou proti α -MPP však ukázala poněkud překvapivý výsledek. Exprese α -MPP proteinu totiž není ovlivněna RNAi proti β -MPP, neboť ani po šesti dnech indukce RNAi nedošlo k úbytku α -MPP proteinu. Díky polyklonální protilátce proti β -MPP se mi podařilo prokázat, že v buněčné linii hFTX+MPP je cílový protein rovněž účinně odstraněn několik dní po indukci RNAi.

Dalším cílem předkládané práce bylo prokázat, zda složité úpravy lidského frataxinu v *T. brucei* popsané v naší laboratoři (Long a kol., 2008) jsou prováděny MPP nebo jinou procesovací peptidázou. Po eliminaci proteinu β -MPP v buněčné linii hFTX+MPP opravdu dochází ke změnám v procesování lidského frataxinu, poněvadž je narušena dráha pro odštěpování N-koncových sekvencí prekurzorových proteinů. Naprostá většina proteinů je procesována jednorázovým odštípnutím signální sekvence během jejich importu do mitochondrie (Mukhopadhyay a kol., 2007). V současnosti se tento názor poněkud zkomplikoval objevem nové procesovací

peptidázy ICP55 označované také jako střední štěpící peptidáza (Vögtle a kol., 2009), která odštěpuje jeden destabilizující aminokyselinový zbytek proteinu po procesování MPP.

Donedávna se předpokládalo, že konečným produktem procesování frataxinu je protein, který vznikne po štěpení prekursoru mezi aminokyselinami 55-56 a také existoval předpoklad, že procesování frataxinu je pouze dvoustupňové (Cavadini a kol., 2000). Podle nejnovějších studií se u frataxinu vyskytují celkem tři štěpící místa v aminokyselinové sekvenci proteinu; konkrétně mezi aminokyselinami 41-42, 55-56 a 80-81 (Condo a kol., 2007; Long a kol., 2008).

Z výsledků získaných v rámci této práce je zřejmé, že všechny tři kroky procesování frataxinu jsou prováděny právě MPP, což dosud nebylo ukázáno. Lze předpokládat, že vzhledem k totožnému procesování tohoto lidského proteinu v lidských a trypanosomých buňkách (Long a kol., 2008) lze tento závěr extrapolovat i na lidské buňky.

Řada mitochondriálních procesů je vysoce konzervovaných (Häusler a kol., 1997; Kakkar a Singh, 2007). Přesto je překvapivé, že složité procesování frataxinu, dobře dokumentované u lidí a kvasinek (Cavadini a kol., 2000; Condo a kol., 2006; Condo a kol., 2007), zůstalo udrženo u trypanosom, a to navzdory značné evoluční vzdálenosti, více než miliardu let (Brinkmann a Philippe, 2007). Vskutku, geny kódující α -MPP a β -MPP byly nalezeny v genomu *T. brucei* (Berriman a kol., 2005), ačkoliv aminokyselinová sekvenční podobnost s jejich lidskými homology je docela nízká (25% u α -MPP a 33% u β -MPP).

Předkládaná práce je pouze odrazovým můstkem pro podrobnou funkční analýzu mitochondriálních procesovacích peptidáz u trypanosom. Naším cílem je provést detailní analýzu *in vivo* a ve spolupráci s laboratoří prof. Tachezyho také *in vitro*.

7. ZÁVĚR

Byly charakterizovány tři transgenní linie procyklického stádia *T. brucei*. U dvou linií byly s využitím RNAi odstraněny proteiny β -MPP nebo MIP. Analýzou růstového fenotypu bylo zjištěno, že oba proteiny jsou pro procyklické stádium *T. brucei* esenciální. Funkčnost RNAi u buněčné linie MPP byla potvrzena hybridizací proteinových lyzátů s polyklonální protilátkou proti β -MPP. Hybridizací lyzátů MPP linie s polyklonální protilátkou proti α -MPP bylo zjištěno, že exprese α -MPP proteinu není ovlivněna RNAi proti β -MPP. V případě buněčné linie MIP byla úspěšnost RNAi ověřena pouze růstovými křivkami.

U buněčné linie hFTX+MPP bylo sledováno procesování lidského frataxinu, neboť u této linie byl kromě RNAi proti β -MPP exprimován ještě gen pro lidský frataxin. Bylo potvrzeno, že prekursor frataxinu je procesován na třech místech za tvorby dvou intermediálních forem a jedné maturované (zralé) formy.

8. SEZNAM LITERATURY

Adamec J., Gakh O., Spizek J. and Kalousek F. (1999) Complementation between mitochondrial processing peptidase (MPP) subunits from different species. *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 77–85.

Allison D. S. and Schatz G. (1986) Artificial mitochondrial presequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9011–9015.

Auld D. S. (1995) Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248, 228–242.

Arretz M., Schneider H., Guiard B., Brunner M. and Neupert W. (1994) Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 269, 4959–4967.

Bencze K. Z., Kondapalli K. C., Cook J. D., McMahon S., Millan-Pacheco C., Pastor N. and Stemmler T. L. (2006) The structure and function of frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 269–291.

Berriman, M. et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416–422.

Brinkmann H. and Philippe H. (2007) The diversity of eukaryotes and the root of the eukaryotic tree. *Adv. Exp. Med. Biol.* 607, 20–37.

Brun R. and Schönenberger M. (1979) Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop.* 36, 289–292.

Bulteau A. L., O'Neill H. A., Kennedy M. C., Ikeda-Saito M., Isaya G. and Szweda L. I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305, 242–245.

Cavadini P., Adamec J., Taroni F., Gakh O., Isaya G. (2000) Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J. Biol. Chem.* 275, 41469-41475.

Cavadini P., O'Neill H. A., Benada O. and Isaya G. (2002) Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 11, 217–227.

Chacinska A., Koehler C. M., Milenkovic D., Lithgow T. and Pfanner N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.

Chew A., Buck E. A., Peretz S., Sirugo G., Rinaldo P. and Isaya G. (1997) Cloning, expression, and chromosomal assignment of the human mitochondrial intermediate peptidase gene (MIPEP). *Genomics* 40, 493– 496.

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

Condò I., Ventura N., Malisan F., Tomassini B. and Testi R. (2006) A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* 281, 16750-16756.

Condò I., Ventura N., Malisan F., Rufini A., Tomassini B. and Testi R. (2007) *In vivo* maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 1534-1540.

Gakh O., Cavadini P. and Isaya G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 63–77.

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

Geli V. (1993) Functional reconstitution in *Escherichia coli* of the yeast mitochondrial matrix peptidase from its two inactive subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6247–6251.

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

Häusler T., Stierhof Y. D., Blattner J. and Clayton C. (1997) Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 240–251.

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

Hendrick J. P., Hodges P. E. and Rosenberg L. E. (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4056–4060.

Isaya G., Kalousek F. and Rosenberg L. E. (1992) Sequence analysis of rat mitochondrial intermediate peptidase: similarity to zinc metallopeptidases and to a putative yeast homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8317–8321.

Isaya G., Miklos D. and Rollins R. A. (1994) MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5603–5616.

Isaya G., Sakati W. R., Rollins R. A., Shen G. P., Hanson L. C., Ullrich R. C. and Novotny C. P. (1995) Mammalian mitochondrial intermediate peptidase: structure/function analysis of a new homologue from *Schizophyllum commune* and relationship to thimet oligopeptidases. *Genomics* 28, 450–461.

Kakkar P. and Singh B. K. (2007) Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol. Cell Biochem.* 305, 235–253.

Kalousek F., Isaya G. and Rosenberg L. E. (1992) Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J.* 11, 2803–2809.

Kalousek F., Neupert W., Omura T., Schatz G. and Schmitz U. K. (1993) Uniform nomenclature for the mitochondrial peptidases cleaving precursors of mitochondrial proteins [letter]. *Trends Biochem. Sci.* 18, 249.

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

Lill R. and Mühlenhoff U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669–700.

Long S., Jirku M., Ayala F. J. and Lukes J. (2008) Mitochondrial localization of human frataxin is necessary but processing is not for rescuing frataxin deficiency in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13468-13473.

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.

MacKenzie J. A. and Payne R. M. (2007) Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 509-523

Matthews K. R. (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 118, 283–290.

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.

Miura S., Mori M., Amaya Y. and Tatibana M. (1982) A mitochondrial protease that cleaves the precursor of ornithine carbamoyltransferase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 122, 641–647.

Mukhopadhyay A., Yang C. S., Wei B. and Weiner H. (2007) Precursor protein is readily degraded in mitochondrial matrix space if the leader is not processed by mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 282, 37266–37275.

Neupert W. and Herrmann J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723–749.

Pagliarini D. J., Calvo S. E., Chang B., Sheth S. A., Vafai S. B., Ong S. E., Walford G. A., Sugiana C., Boneh A., Chen W. K., et al. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112–123.

Pandolfo M. (2003) Friedreich ataxia. *Semin. Pediatr. Neurol.* 10, 163–172.

Perocchi F., Jensen L. J., Gagneur J., Ahting U., von Mering C., Bork P., Prokisch H. and Steinmetz L. M. (2006) Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle. *PLoS Genet.* 2, e170.

Poliak P. (2008) Funkční analýza NifS1 u procyklických stádií *Trypanosoma brucei*. *Bachelor Thesis*, in Czech. 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Priest J. W. and Hajduk S. L. (2003) *Trypanosoma brucei* cytochrome *c1* is imported into mitochondria along an unusual pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 15084–15094.

Priest J. W. and Hajduk S. L. (1996) In vitro import of the Rieske ironsulfur protein by trypanosome mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 20060–20069.

Priest J. W., Wood Z. A., Hajduk S. L. (1993) Cytochromes c1 of kinetoplastid protozoa lack mitochondrial targeting presequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 229–231.

Puccio H. and Koenig M. (2000) Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 9, 887–892.

Roise D. and Schatz G. (1988) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* 263, 4509–4511.

Saavedra-Alanis V. M., Rysavy P., Rosenberg L. E. and Kalousek F. (1994) Rat liver mitochondrial processing peptidase. Both alpha- and beta-subunits are required for activity. *J. Biol. Chem.* 269, 9284–9288.

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

Schnell D. J. and Hebert D. N. (2003) Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112, 491–505.

Sickmann A., Reinders J., Wagner Y., Joppich C., Zahedi R., Meyer H. E., Shönfisch B., Perschil I., Chacinska A., Guiard B., et al. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13207–13212.

Stehling O., Elsasser H. P., Bruckel B., Muhlenhoff U. and Lill R. (2004) Iron–sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3007–3015.

Tasker M., Timms M., Hendriks E. and Matthews K. (2001) Cytochrome oxidase subunit VI of *Trypanosoma brucei* is imported without a cleaved presequence and is developmentally regulated at both RNA and protein levels. *Mol. Microbiol.* 39, 272–285.

Uboldi A. D., Lueder F. B., Walsh P., Spurck T., McFadden G. I., Curtis J., Likic V. A., Perugini M. A., Barson M., Lithgow T. and Handman E. (2006) A mitochondrial protein affects cell morphology, mitochondrial segregation and virulence in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 36, 1499–1514.

Vickerman K. (1989) Phylum Zoomastigina, class Kinetoplastida, p. 215–238. *In* Margulis M., Corliss J. O., Melkonian M., and Chapman D. J. (ed.), *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett, Boston.

Vögtle F. N., Wortelkamp S., Zahedi R. P., Becker D., Leidhold C., Gevaert K., Kellermann J., Voos W., Sickmann A., Pfanner N. and Meisinger C. (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139, 428-39.

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

Wickner W. and Schekman R. (2005) Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452–1456.

Yaffe M. P., Ohta S. and Schatz G. (1985) A yeast mutant temperature-sensitive for mitochondrial assembly is deficient in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor polypeptides. *EMBO J.* 4, 2069–2074.

Yang M. J., Geli V., Oppliger W., Suda K., James P. and Schatz G. (1991) The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein. *J. Biol. Chem.* 266, 6416– 6423.

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.

Yoon T. and Cowan J. A. (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 25943–25946.