



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-19-0298

Vzájomná inerakcia proteáz, šaperónov a kináz v mitochondriách pri strese spôsobenom patologickými stavmi.

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Eva Kutejová, DrSc.**

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i.**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

N/A

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

N/A

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Kunová N., Ondrovičová G., Bauer J.A., Krajčovičová V., Pinkas M., Stojkovičová B., Havalová H., Lukáčová V., Kohútová L., Košťan J., Martináková L., Barath P., Nováček J., Kerešiče S., Kutejová E., Pevala V. (2024). Polyphosphate and tyrosine phosphorylation in the N-terminal domain of the human mitochondrial Lon protease disrupts its functions. Scientific Reports 14(1), 9923, 10.1038/s41598-024-60030-9

Kunova, N., Havalova, H., Ondrovicova, G., Stojkovicova, B., Bauer, J., Bauerova-Hlinkova, V., Pevala, V., Kutejova, E. (2022). Mitochondrial processing peptidases - structure, function and the role in human diseases. Int J Mol Sci 23(3): 1297, 10.3390/ijms23031297

Frankovsky, J., Keresztesova, B., Bellova, J., Kunova, N., Canigova, N., Hanakova, K., Bauer, J., Ondrovicova, G., Lukacova, V., Sivakova, B., Zdrahal, Z., Pevala, V., Prochazkova, K., Nosek, J., Kutejova, E. et al. (2021). The yeast mitochondrial succinylome: Implications for regulation of mitochondrial nucleoids. J. Biol. Chem. 297 (4): 101155, 10.1016/j.jbc.2021.101155

Havalova, H., Ondrovicova, G., Keresztesova, B., Bauer, J., Pevala, V., Kutejova, E., Kunova, N. (2021). Mitochondrial HSP70 Chaperone System - The Influence of Post-Translational Modifications and Involvement in Human Diseases. Int J Mol Sci 22(15): 8077, 10.3390/ijms22158077

Kotrasova, V., Keresztesova, B., Ondrovicova, G., Bauer, J., Havalova, H., Pevala, V., Kutejova, E., Kunova, N. (2021). Mitochondrial Kinases and the Role of Mitochondrial Protein Phosphorylation in Health and Disease. LIFE-BASEL 11(2), 82, 10.3390/life11020082

Vozarikova, V., Kunova, N., Bauer, J., Frankovsky, J., Kotrasova, V., Prochazkova, K., Dzugasova, V., Kutejova, E., Pevala, V., Nosek, J., Tomaska, L. (2020). Mitochondrial HMG-Box Containing Proteins: From Biochemical Properties to the Roles in Human Diseases. *Biomolecules* 10: 1193, 10.3390/biom10081193

Uplatnenie výsledkov projektu

N/A

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Ukončený projekt študoval ako spolupracujú mitochondriálne šaperóny, ATP-závislá proteáza Lon a mitochondriálne proteín kinázy a aké účinky môže mať fosforylácia týchto proteínov na ich štruktúru, funkciu a vzájomné interakcie. Stanovené ciele projektu boli v plnej miere splnené.

Pripravili a charakterizovali sme ľudské mitochondriálne proteíny: šaperón TRAP1, šaperónový systém HSP70 zložený z mortalínu a jeho ko-šaperónov, GRPE1, GRPE2 a TiD-1S, ATP-závislú Lon proteázu, proteín TFAM a ich viaceré fosforylované verzie. Na prípravu fosforylovaných proteínov sme použili ortogonálny amber supresorový translačný systém v *E. coli*, pomocou ktorého sme priamo do aminokyselinovej sekvencie cieľových proteínov zabudovali fosfoserín alebo para-karboxymetyl-L-fenylalanín (pCMF), neštandardnú aminokyselinu slúžiacu ako analóg fosfotyrozínu. Zabudovanie modifikovaných aminokyselín na konkrétne miesta purifikovaných proteínov sme overili MS analýzou a kontrolovali ich správne usporiadanie pomocou NanoDSF. V prípade Lon proteázy a jej mutantov, ako aj komplexu mortalínu s GrpE1, sme štruktúru ďalej analyzovali pomocou cryo-elektrónovej mikroskopie (CEITEC, Brno). Ukázali sme, že fosforylácia významnou mierou ovplyvňuje aktivity študovaných proteínov a tiež rozpoznávanie a štiepenie Lon proteázou. Výsledky poukazujú na významnú úlohu fosforylácie pri udržiavaní mitochondriálnej homeostázy a jej možné ovplyvnenie v patologických procesoch. Sledovali sme tiež vplyv zvýšenej expresie alebo delécie Lon proteázy, resp. jej inaktívácie, na celkový mitochondriálny proteóm. Ako modelový organizmus sme zvolili kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, nakoľko delécia Lon proteázy je v ľudských bunkách letálna. Pozorovali sme, že pri zmene hladiny Lon proteázy dochádza k dysregulácii veľkého množstva mitochondriálnych proteínov, pričom takmer štvrtinu tvorili proteíny OXPHOS systému s dôležitým vplyvom na mitochondriálnu respiráciu. Významným zistením je aj skutočnosť, že v kmeňoch s deléciou Lon proteázy nebola identifikovaná takmer žiadna mitochondriálna DNA.

V spolupráci s Katedrou genetiky PriF UK a Chemickým ústavom SAV sme pomocou MS analýzy proteínov izolovaných z purifikovaných mitochondrií *S. cerevisiae* detegovali 314 sukcinylovaných mitochondriálnych proteínov a identifikovali 1763 nových sukcinylačných miest. Z výsledkov vyplýva, že väčšina proteínov mitochondriálneho nukleoidu, ktorý pozostáva z mitochondriálnej DNA (mtDNA) a mitochondriálnych proteínov zbalených do nukleoproteínovej štruktúry, je sukcinylovaná in vivo. Sukcinylácia proteínu Abf2 (kvasinkového analógu TFAM), hlavnej zložky mt-nukleoidu *S. cerevisiae*, inhibuje jeho DNA-väzbovú aktivitu a výrazne znižuje jeho degradáciu kvasinkovou Lon proteázou in vitro.

Uskutočnili sme tiež pilotnú štúdiu fosforylácie mitochondriálnych proteínov pomocou in vitro kinázovej eseje celého ľudského mitochondriálneho proteómu. Pomocou MS analýzy sme identifikovali veľké množstvo fosforylovaných mitochondriálnych proteínov (11608 unikátnych fosforylovaných peptidov), medzi ktorými sú aj nami študované proteíny Lon, TFAM, Hsp60, Hsp10, mortalín, TiD-1, GrpE1, Trap1.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The finished project studied how mitochondrial chaperones, the ATP-dependent protease Lon and mitochondrial protein kinases cooperate and what effects the phosphorylation of these proteins might have on their structure, function and mutual interactions. All specified goals of the project were fully met.

We have prepared and characterized human mitochondrial proteins: chaperone TRAP1, the

HSP70 chaperone system composed of mortalin and its co-chaperones, GRPE1, GRPE2 and TID-1S, the ATP-dependent protease Lon, and TFAM protein together with their multiple phosphorylated versions. For the preparation of phosphorylated proteins, we used the orthogonal amber suppressor translation system in *E. coli*, which directly incorporated phosphoserine or para-carboxymethyl-L-phenylalanine (pCMF), a non-standard amino acid serving as an analogue of phosphotyrosine, into the amino-acid sequence of the target proteins. We verified the incorporation of modified amino acids at specific sites of the purified proteins by MS analysis and checked their correct arrangement using NanoDSF. In case of Lon protease and its mutants and the complex of mortalin with GrpE1, we further analyzed the structure using cryo-electron microscopy (CEITEC, Brno). We have shown the phosphorylation substantially affects the activity of the studied proteins and the recognition and cleavage by the Lon protease. The results indicate to the significant role of phosphorylation in maintaining mitochondrial homeostasis and its possible role in pathological processes.

We also studied the effect of the increased expression and deletion (or inactivation) of Lon protease on the overall mitochondrial proteome. As a model organism, we chose the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as the deletion of Lon protease is lethal in human cells. We observed that when the level of Lon protease changes, a dysregulation of a large number of mitochondrial proteins occurs. Interestingly, almost a quarter of all identified dysregulated proteins were proteins of the OXPHOS system with a significant impact on mitochondrial respiration. Another important finding is the fact that almost no mitochondrial DNA was found in Lon protease deletion strains.

In cooperation with the Department of Genetics, FNS UK and the Institute of Chemistry, SAS we used the MS analysis of proteins isolated from purified *S. cerevisiae* mitochondria to detect 314 succinylated mitochondrial proteins and identified 1763 novel succinylation sites. The results show that most proteins of the mitochondrial nucleoid, which consists of mitochondrial DNA (mtDNA) and mitochondrial proteins packed into a nucleoprotein structure, are succinylated in vivo. Succinylation of Abf2 (a yeast analog of TFAM), a major component of *S. cerevisiae* mt-nucleoids, inhibited its DNA-binding activity and significantly reduced its degradation by the yeast Lon protease in vitro.

We also conducted a pilot study of mitochondrial protein phosphorylation using an in vitro kinase assay on the entire human mitochondrial proteome. Using MS analysis, we identified a large number of phosphorylated mitochondrial proteins (11608 unique phosphorylated peptides), among which are also the proteins that we are studying, such as Lon, TFAM, Hsp60, Hsp10, mortalin, TID-1, GrpE1, and Trap1.