

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Zemanová

Mitochondriální unfolded protein response

Mitochondrial unfolded protein response

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 12.5.2016

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za cenné rady při zpracování mé bakalářské práce, a také celému osazenstvu naší laboratoře za neskonalou trpělivost a pomoc při práci.

Abstrakt

Mitochondrie je organela eukaryotické buňky zodpovědná za klíčové metabolické pochody a buněčnou apoptózu. Pro přežití buňky je proto nutné, aby byla zachována její funkčnost. V mitochondrii se proto uplatňují specifické signální dráhy, reagující na stres a zpětně ustanovující homeostázi. Unfolded protein response je stresová odpověď na přítomnost nesbalených proteinů, zahrnující signalizaci z organely do jádra a zde změnu exprese genů pro chaperony a proteázy.

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o problematice mitochondriální UPR, jak v matrix, tak v mezimembránovém prostoru. Zabývá se druhy mitochondriálních chaperonů a proteáz, příčinami vzniku a dopady mitochondriálního stresu vyvolávajícího UPR a stručně zahrnuje také problematiku UPR v cytosolu a ER.

Klíčová slova: mitochondrie, UPR^{cyt}, UPR^{ER}, UPR^{mt}, mitochondriální stres

Abstract

Mitochondrion is an organelle of the eukaryotic cell responsible for the crucial metabolic processes and the apoptosis. Therefore, it is necessary for the survival of the cell to maintain mitochondrial functionality. Hence, the mitochondria have specific signalling stress-activated pathways for re-establishing its homeostasis. Unfolded protein response is a stress response to the presence of unfolded proteins that includes signalling from the organelle to the nucleus and activating specific genes for chaperones and proteases.

This thesis summarizes current knowledge of the mitochondrial UPR, in the matrix as well as in the intermembrane space. It describes different types of the mitochondrial chaperones and proteases, the reasons and the impacts of the mitochondrial stress causing the UPR and also briefly covers the problematics of the UPR in the cytosol and the ER.

Key words: mitochondria, UPR^{cyt}, UPR^{ER}, UPR^{mt}, mitochondrial stress

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Unfolded protein response v bakteriích a v cytosolu eukaryot	2
3 Unfolded protein response v endoplasmatickém retikulu	3
3.1.1 Ire1.....	3
3.1.2 PERK.....	3
3.1.3 ATF6	4
3.1.4 BiP.....	4
3.2 Apoptóza	5
3.3 UPR ^{ER} u parazitických prvoků	6
4 Mitochondriální unfolded protein response.....	7
4.1 Příčiny aktivace UPR ^{mt}	7
4.1.1 Nesbalené proteiny	8
4.1.2 Oxidativní stres a dysfunkce elektrontransportního řetězce	8
4.1.3 Poškození mitochondriální DNA	8
4.2 Mitochondriální výbava zodpovědná za proteostázi	8
4.2.1 Mitochondriální chaperony	9
4.2.1.1 mtHsp70	9
4.2.1.2 Hsp60.....	10
4.2.1.3 TRAP-1	10
4.2.2 Mitochondriální proteázy	10
4.2.2.1 ClpXP	11
4.2.2.2 Lon.....	11
4.2.2.3 m-AAA a i-AAA	11
4.3 Savčí mitochondriální UPR.....	12
4.3.1 CHOP	12
4.3.2 Jun a JNK2	13
4.3.3 PKR	13
4.4 Mitochondriální UPR u <i>C. elegans</i>	14
4.4.1 Počátek signalizace.....	14
4.4.2 ATFS-1	15
4.4.3 DVE-1 a UBL-5	15
4.4.4 Křížení signálních drah UPR ^{mt} a UPR ^{ER}	16
4.5 UPR v mezimembránovém prostoru mitochondrie	17
4.6 UPR ^{mt} v kontextu organismu	18
5 Závěr.....	20
6 Seznam používaných zkratk	21
7 Seznam použité literatury	22

1 Úvod

Buňka je v průběhu celého života vystavována potenciálním zdrojům stresu, které mohou narušit buněčné děje. Pro vyrovnání se s tímto stresem má buňka speciální odpovědi a mechanismy, které jí pomáhají udržovat homeostázi a brání jejímu poškození či případné smrti. Jeden z dopadů stresu může být poškození proteinů nebo narušení jejich sbalování. Pro přežití buňky je klíčové udržení proteinů v nativním, a tedy funkčním stavu. Vyvinula se proto specifická odpověď, která reaguje na hromadění nesbalených proteinů upregulací jaderných genů pro buněčné efekторы, především chaperony a proteázy, a zpětně ustanovuje proteostázi. Tato odpověď je označována jako unfolded protein response (UPR).

UPR se nachází v kompartmentech, ve kterých probíhá sbalování proteinů, tedy v cytosolu, endoplasmatickém retikulu a mitochondrii. Cytosolická forma je nazývána heat shock response a je ze zmíněných nejjednodušší a nejlépe prozkoumaná. Je založená na interakci chaperonu s transkripčním faktorem, který se při stresu uvolňuje a v jádře aktivuje geny pro cytosolické chaperony. Signální dráha UPR v endoplasmatickém retikulu (UPR^{ER}) překonává membránu a je proto realizována prostřednictvím transmembránových kináz. Kromě upregulace genů pro chaperony a proteázy zahrnuje také utlumení cytosolické translace.

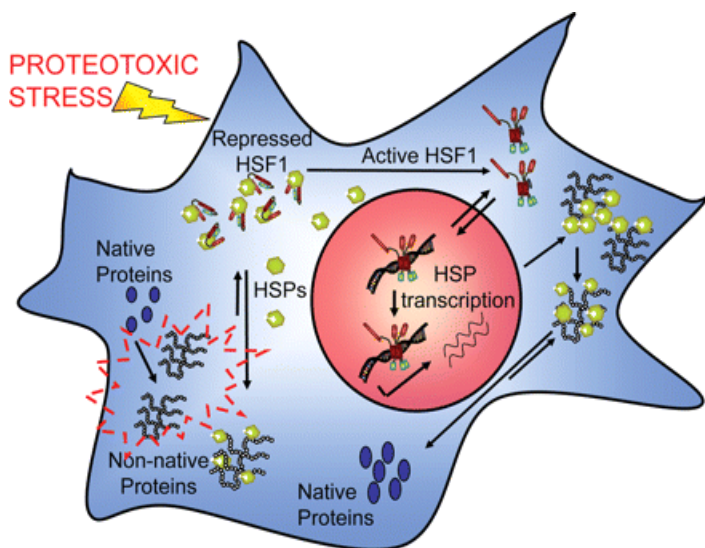
UPR v mitochondrii se liší především kvůli semiautonomnímu charakteru této organely. Na počátku signalizace stojí proteáza, nikoliv chaperony a transkripční faktory, a signální dráha překonává dvě mitochondriální membrány. Stejně jako u UPR^{ER}, i zde dochází kromě zvýšené exprese genů pro chaperony a proteázy také k útlumu cytosolické translace. Poměrně velké rozdíly lze najít mezi UPR u *Caenorhabditis elegans* a v savčích buňkách. Specialitou mitochondrie je oddělená UPR v mezimembránovém prostoru, která je od dráhy v matrix oddělená.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o mitochondriální UPR, vysvětlit příčiny vzniku stresové odpovědi a důsledky její deficience. Stručněji jsou popsány také signální dráhy v cytosolu a endoplasmatickém retikulu.

2 Unfolded protein response v bakteriích a v cytosolu eukaryot

V bakteriích (studováno na příkladu *E. coli*) je odpověď na nesbalené proteiny označovaná jako heat shock response. Klíčovou roli zde hraje transkripční faktor σ_{32} . Ten je degradován kontaktem s chaperonem DnaK. Během stresu chaperon preferenčně váže nesbalené proteiny, σ_{32} tak zůstává ve volné, stabilní formě a působí jako transkripční faktor pro heat shock operon (Guisbert et al., 2004). Indukovaných zvýšením exprese genů pro chaperony dochází k ustanovení rovnováhy ve sbalování proteinů (viz. obr. 1). Nadbytečný DnaK poté opět váže σ_{32} a dochází tak k negativní regulaci exprese (Straus et al., 1990).

Na podobném principu funguje odpověď na nesbalené proteiny v cytosolu eukaryot. Transkripční faktory patřící do rodiny heat shock faktorů (HSF) interagují s heat shock elementy (HSE). Chaperony Hsp70 a Hsp90 se váží na aktivační doménu transkripčního faktoru HSF1, čímž brání jeho funkci. Během stresu se faktor z komplexu uvolňuje, dochází k jeho trimerizaci a transportu do jádra. Interakcí s promotory dochází k aktivaci transkripce genů pro chaperony Hsp70 a Hsp90 a složky ubiquitin-proteazomového systému (Hahn et al., 2004).



Obrázek 1 – Heat shock response. Cytosolické chaperony inhibují faktor HSF1. Vlivem proteotoxického stresu dochází k výskytu nesbalených proteinů a chaperony uvolní HSF1. Ten trimerizuje, putuje do jádra a váže se na HSE v genech pro chaperony, čímž zvyšuje jejich transkripci. Chaperony se váží na nesbalené proteiny, zabraňují jejich agregaci a ustanovují proteostázi (převzato z Morimoto, 2011).

3 Unfolded protein response v endoplasmatickém retikulu

V endoplasmatickém retikulu (ER) dochází ke skládání a zrání membránových a sekretovaných proteinů. Mutantní proteiny, virová infekce nebo například extrémní životní podmínky narušují sbalování proteinů v ER. Odpověď na nesbalené proteiny v ER je asociována s jeho membránou. Popsány byly tři transmembránové proteiny, které monitorují stav proteinů v lumen ER. Signalizací do cytosolu a následně do jádra dochází k expresi genů pro kompartmentově-specifické chaperony a komponenty sekretorické dráhy (viz. obr. 2).

3.1.1 Ire1

Prvním z transmembránových proteinů je Inositol-requiring enzyme 1 (Ire1). Jde o serin/treonin kinázu, mající tři funkční domény. N-koncová doména se nachází v lumen ER a rozeznává nesbalené proteiny (Gardner and Walter, 2011). Po jejich rozpoznání dojde k oligomerizaci proteinu a aktivaci kinázové domény, která trans-autofosforylací aktivuje cytosolickou endonukleázovou doménu (Shamu and Walter, 1996). Ta vyštěpí intron transkriptu pro X-box binding protein 1 (XBP1) v případě savců, nebo HAC1 v případě kvasinek. Zbylé exony jsou pak spojeny tRNA ligázou (Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002; Shen et al., 2001; Yoshida et al., 2001). Po translaci je XBP1/HAC1 transportován do jádra, kde aktivuje transkripci složek UPR, například chaperonu BiP (Cox and Walter, 1996; Mori et al., 1996). Ire1 je také součástí dráhy regulated Ire1-dependent decay (RIDD). Vlivem stresu v ER dochází ke zvýšenému rozkladu mRNA kódující membránové a sekretované proteiny nukleázovou doménou Ire1. To vede ke snížení množství proteinů, které je třeba sbalit v ER (Hollien and Weissman, 2006; Hollien et al., 2009).

3.1.2 PERK

Druhým proteinem je protein-kinase-like endoplasmatic reticulum kinase (PERK), kináza popsaná pouze u metazoi (narozdíl od Ire1, jejíž homology se vyskytují napříč celou eukaryotickou doménou). PERK má dvě funkční domény. Doména nacházející se v lumen je blízce příbuzná Ire1 (Bertolotti et al., 2000). Cytosolická doména je eIF2 α kináza, endonukleázová doména chybí. Aktivace kinázy vede k obecnému utlumení translace po dobu stresu díky fosforylaci eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2 α), což sníží vytížení ER (Harding, Zhang, & Ron, 1999). Fosforylace eIF2 α zároveň vede k aktivaci transkripce aktivačního transkripčního faktoru 4 (ATF4), který interaguje s promotorem *chop* genu a také upreguluje geny pro ER chaperony (Harding et al., 2000). Expresi proteinu CHOP, který funguje jako transkripční faktor (viz níže) aktivuje kromě zmíněného ATF4 i ATF-6 a NF-Y, které nasedají na tzv. ERSE element (Ma et al., 2002).

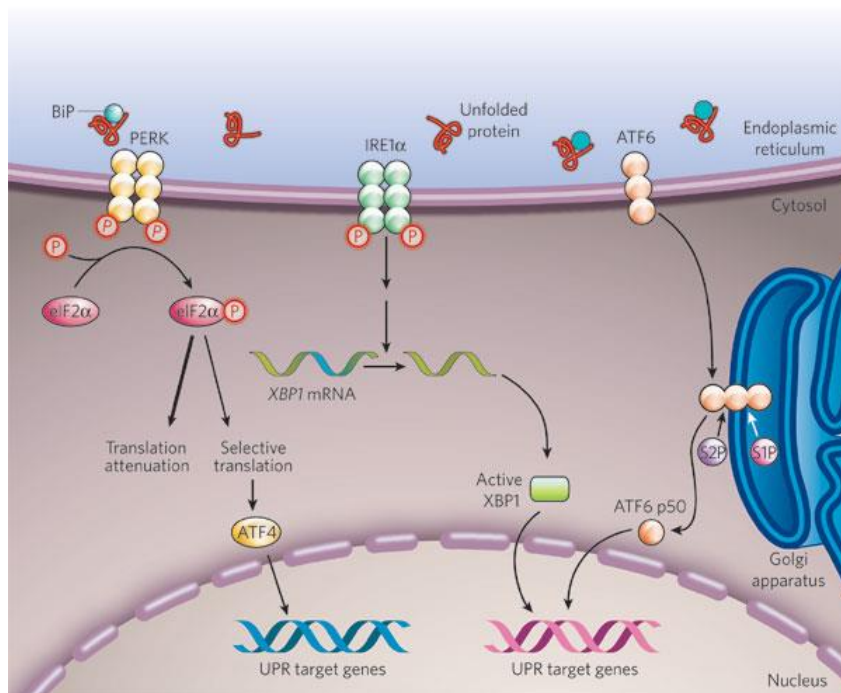
3.1.3 ATF6

Posledním z transmembránových proteinů podílejících se na UPR^{ER} je activating transcription factor 6 (ATF6), který byl taktéž popsán pouze u metazoi. Na rozdíl od předchozích dvou se v lumen ER nachází C-koncová část proteinu, která monitoruje stres. Pod vlivem stresu je ATF6 transportován do Golgiho aparátu a štěpen site 1 a site 2 proteázami (S1P a S2P) za vzniku ATF6 fragmentu (ATF6f). Ten vstupuje do jádra, váže se na DNA a aktivuje genovou transkripci (Haze et al., 1999; Shen et al., 2002; Ye et al., 2000)

3.1.4 BiP

Všechny tři výše zmíněné proteiny mají společný mechanismus monitorování výskytu nesbalených proteinů v ER. Mají na svou doménu v lumen navázán ER chaperone-binding immunoglobulin protein (BiP), homolog Hsp70. Při stresu BiP oddisociuje a spustí se mechanismus typický pro daný protein, popsán výše. BiP tedy působí jako negativní regulátor UPR^{ER}. Upregulace exprese genů kódujících BiP je zároveň cílem signální dráhy UPR^{ER} (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2001; Shen et al., 2002). Kromě BiP pravděpodobně hraje roli i schopnost Ire1 vázat nesbalené proteiny přímo, jeho doména v lumen má totiž podobnou strukturu jako MHC glykoproteiny (Credle et al., 2005).

Cílem UPR^{ER} je tedy zpětné ustavení proteinové homeostáze v ER. To je zajištěno signalizací do jádra vedoucí k upregulaci genů pro ER chaperony a enzymy podílející se na sbalování proteinů (např. protein disulfid izomeráza, calretikulin, calnexin). Zároveň dochází ke snížení translace sekretovaných proteinů. Součástí odpovědi na stres je také spuštění ER-associated degradation (ERAD) dráhy, která rozeznává nevratně špatně sbalené proteiny a translokuje je do cytosolu pro jejich degradaci ubiquitin-proteasomovou dráhou (Meusser et al., 2005).



Obrázek 2 – Unfolded protein response v ER. Nesbalené proteiny způsobí oddisociování BiP od membránových proteinů PERK, Ire1 a ATF6. Aktivovaná PERK kináza fosforyluje faktor eIF2 α , což vede k utlumení cytosolické translace a aktivaci selektivní translace ATF4, který funguje jako transkripční faktor pro gen chop. Autofosforylovaná Ire1 vyštěpí intron XBP1 mRNA, který po translaci cestuje do jádra a jako transkripční faktor aktivuje expresi cílových genů UPR. ATF6 je vlivem stresu transportován do Golgiho aparátu, kde je štěpen proteázami SIP a S2P, načež cestuje do jádra a funguje jako transkripční faktor např. pro BiP nebo XBP1 (převzato ze Zhang and Kaufman, 2008).

3.2 Apoptóza

Apoptická dráha, tedy dráha programované buněčné smrti, je s UPR^{ER} úzce spjatá. K její aktivaci totiž dochází ve chvíli, kdy ani zvýšené množství chaperonů, aktivace ERAD dráhy a utlumení translace nevede k úspěšnému znovunastolení proteostáze. Pro ochranu organismu je proto nutné poškozené buňky odstranit.

Jedním z faktorů, podílejících se na apoptóze je již zmíněný CHOP, aktivovaný dráhou zahrnující kinázu PERK. CHOP funguje jako transkripční faktor pro geny kódující proapoptické faktory, například death receptor 5 (DR5) (Yamaguchi, 2004) nebo tribbles-related protein 3 (TRB3) (Ohoka et al., 2005). Při jeho absenci, stejně jako při deficitu jeho dimerizačního partnera C/EBP β , nedochází k apoptóze ani během ER stresu. Kromě CHOP se na aktivaci proapoptických faktorů podílí i samotný ATF6, který specificky indukuje expresi proteinů z rodiny Bcl-2 (Fribley et al., 2006).

Indukce apoptózy je regulována mnoha faktory, které vytváří složitou regulační síť. Kromě PERK kinázy se na aktivaci podílí i dráha zahrnující Ire1. Stres vede také k uvolnění Ca^{2+} z ER, jehož absorpce mitochondrií poté vede k vylití cytochromu c a tvorbě apoptozomu (Fribley et al., 2009).

3.3 UPR^{ER} u parazitických prvoků

Jak se zdá, u parazitických prvoků je UPR^{ER} odlišná od drah ostatních eukaryot. O skutečném fungování UPR v parazitických prvocích však zatím nebylo zjištěno mnoho. Poznání těchto drah by mohlo být přínosné v oblasti léčby parazitických onemocnění, neboť narušení drah UPR často vede k poškození buňky a jak bylo zmíněno výše, také k buněčné smrti.

Většina výzkumů na toto téma se zabývá dráhou zahrnující kinázu PERK. Gosline et al., 2011 pomocí počítačové analýzy proteinových domén přítomných a konzervovaných v jednotlivých složkách UPR zjistili, že některé důležité domény u vybraných parazitických prvoků chybí a je tedy možné, že u nich chybí celé dráhy UPR. Výzkum na parazitovi *Leishmania donovani* ukázal, že eIF2 α se liší ve velikosti – zatímco u většiny eukaryot má přibližně 340 aminokyselin, u *L. donovani* má přes 400 aminokyselin. K jeho fosforylaci dochází na jiném místě. Obvykle je eIF2 α fosforylován na serinu 51, u *L. donovani* je však fosforylován na treoninu 166, u *Trypanosomy brucei* na treoninu 169. Liší se také samotná PERK kináza, které proti obvyklým eukaryotickým PERK chybí některé části, i přesto je však schopná eIF2 α fosforylovat. To stejně jako u ostatních eukaryot vede k utlumení cytosolické translace. Dalším zjištěním bylo, že při ER stresu se nezvyšuje množství chaperonu BiP. Také efektivita UPR je nižší než u ostatních metazoí. *L. donovani* byla v porovnání s hostitelskou buňkou vůči stresu citlivější (Gosline et al., 2011; Lahav et al., 2011; Moraes et al., 2007).

U parazita *T. brucei* byl homolog PERK kinázy nalezen v bičíkové kapse (flagellar pocket), nikoli však v ER. To znamená, že přestože je schopná fosforylovat eIF2 α , nemůže reagovat na stres v lumen ER a nejde tedy o ortolog savčí PERK (Moraes et al., 2007).

Dalším příkladem je výzkum parazita *Toxoplasma gondii*, který ukázal, že zde lze nalézt signální dráhu spojenou s PERK. V důsledku stresu i zde dochází k fosforylaci eIF2 α , která vede k atenuaci cytosolické translace. Homolog PERK je navíc v kontaktu s chaperonem BiP a při stresu dochází k jeho uvolnění, stejně jako v savčí signální dráze. Zároveň byla zjištěna upregulace některých jaderných genů. U *T. gondii* nebyly nalezeny homology Ire1 a ATF6 (Joyce et al., 2013).

Výsledky těchto několika studií ukazují, že UPR^{ER} parazitických organismů se od savčích výrazně liší, a je možné, že parazité mají navíc jiné, dosud nepopsané dráhy.

4 Mitochondriální unfolded protein response

Mitochondriální unfolded protein response (UPR^{mt}) byla popsána relativně nedávno a je ze zmíněných také nejméně prozkoumaná. Mitochondrie je organela endosymbiotického původu, což jí dává unikátní vlastnosti, díky nimž je její signální dráha od předchozích dvou výrazně odlišná. První z těchto vlastností je členění mitochondrie. Organela je rozdělená na čtyři hlavní oddíly – vnější membránu, zvrásněnou vnitřní membránu, mezimembránový prostor a matrix. Kvůli přítomnosti dvou membrán není možné, aby její signalizace fungovala obdobně jako u ER, kde lumen a cytosol komunikují pomocí transmembránových kináz. Existují zde proto zcela odlišné dráhy signalizace. Přes vnější membránu je možné signalizační molekuly translokovat poměrně snadno, je totiž semipermeabilní. Přítomnost proteinů z rodiny eukaryotických porinů, Tom40 a voltage-dependent anion channel (VDAC), umožňuje nespecifický průchod molekul do velikosti zhruba 5 kDa (Vander Heiden et al., 2000). Vnitřní membrána je propustná selektivně, obsahuje specifické transportéry pro různé druhy molekul, tedy i pro molekuly signalizační.

Protože mitochondrie pochází z bakterie, dalo by se očekávat, že prvky její UPR budou bakteriálním podobné. Avšak z důvodu masivního přenosu původních bakteriálních genů do jádra a vzniku zcela nových eukaryotických funkcí došlo k vytvoření specifických mitochondriálních mechanismů, které v bakteriích nejsou přítomny. V mitochondrii se tedy schází produkty dvou různých genomů, které je třeba synchronizovat. Nejvýznamnějšími jsou v tomto ohledu geny pro složky dýchacího řetězce, z nichž většina je kódována v jádře buňky, část genů ale zůstala v mitochondrii. U savců jde o 13 převážně hydrofobních proteinů. Komplexy dýchacího řetězce jsou tedy sestavovány částečně z proteinů transportovaných z cytosolu a částečně z proteinů translatovaných přímo v mitochondriální matrix. S elektrontransportním řetězcem zároveň souvisí produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) jako vedlejšího produktu oxidativní fosforylace, jejichž existence v mitochondrii patří mezi příčiny hromadění nesbalených proteinů.

4.1 Příčiny aktivace UPR^{mt}

Mitochondriální UPR je pojmenována podle jí podobné signální dráhy v ER, v mitochondrii však může být vznik odpovědi vyvolán nejen nesbalenými proteiny. Přístup autorů k důvodům vzniku UPR^{mt} se v literatuře liší. Někteří autoři uvažují jako příčinu vyvolání UPR^{mt} pouze nesbalené a špatně sbalené proteiny, další zahrnují také zvýšený oxidativní stres, poškození mitochondriální DNA nebo dysfunkci elektrontransportního řetězce. V této práci se přikláním k druhému pohledu, neboť zmíněné příčiny nakonec nevyhnutelně vedou ke zvýšenému výskytu poškozených proteinů.

4.1.1 Nesbalené proteiny

K udržení homeostáze v mitochondrii je klíčový vyvážený poměr mezi množstvím nově nasyntetizovaných nesbalených proteinů, proteinů špatně sbalených a chaperonů, zajišťujících jejich sbalení. Pokud dojde například vlivem mutace k situaci, kdy je překročena kapacita mitochondriálních chaperonů, nesbalené proteiny se hromadí a vzniká mitochondriální stres (Zhao et al., 2002). Nesbalené proteiny představují pro buňku problém, neboť dochází ke vzniku agregátů, které jsou cytotoxické. Mohou vyvolat řadu nemocí, mezi něž patří například Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Nyström, 2005).

4.1.2 Oxidativní stres a dysfunkce elektrontransportního řetězce

Oxidativní stres v mitochondrii je zapříčiněn zvýšenými koncentracemi ROS (reactive oxygen species), mezi něž patří například superoxidové radikály, hydroxylové radikály nebo peroxid vodíku. ROS jsou přirozeným produktem metabolismu kyslíku, největším producentem je právě mitochondrie a její elektrontransportní řetězec (Balaban et al., 2005). Problémem je jejich hromadění, ke kterému dochází například v důsledku poškození proteinů elektrontransportního řetězce. Pokud k takovému poškození dojde, je narušen přenos elektronu na kyslík a jsou generovány ROS. Ty jsou extrémně reaktivní, z proteinů odebírají elektrony a tak naruší proteostázi tvorbou ireverzibilních modifikací, například karboxylací lysinu, prolinu, argininu a threoninu. Takto modifikované proteiny pak nejsou schopny zaujmout nativní konformaci a stávají se substrátem pro Lon proteázu (Nyström, 2005; Yoneda et al., 2004).

4.1.3 Poškození mitochondriální DNA

Při experimentech zahrnujících delecí mitochondriální DNA byla také zjištěna indukce UPR^m (Martinus et al., 1996). V přirozených podmínkách může k poškození dojít například kvůli ROS nebo mutacím. Problémem může být hromadění nesbalených proteinů kvůli stechiometrické nerovnováze mezi podjednotkami elektrontransportního řetězce kódovanými v jádře a v mitochondrii. V případě poškození DNA v mitochondrii se mohou začít hromadit importované proteiny a vyvolávat mitochondriální stres.

4.2 Mitochondriální výbava zodpovědná za proteostázi

Mitochondrie má pro udržení proteinové homeostáze sadu nástrojů zahrnující chaperony, proteázy a specifické „assembly“ faktory. Ačkoliv jsou svou činností chaperony a proteázy antagonisty (chaperony proteiny „opravují“ zatímco proteázy je degradují), jejich cíl v mitochondrii je stejný – odstranit nesbalené, špatně sbalené nebo poškozené proteiny. Obecně je pro buňku energeticky výhodnější nedokonalý protein opravit pomocí chaperonu, než ho degradovat a znovu

syntetizovat. Z tohoto důvodu je v mitochondriích více chaperonů než proteáz a v cílových proteinech je pak více míst rozeznávaných chaperony než proteázami (Gur and Sauer, 2008).

4.2.1 Mitochondriální chaperony

Při UPR hrají klíčovou roli chaperony, speciální proteiny, jejichž funkcí je asistence při skládání molekulárních struktur, především proteinů. V mitochondriální matrix se nachází dva hlavní druhy chaperonů – mtHsp70 a komplex Hsp60 a Hsp10 – zajišťující mitochondriální proteostázi. Všechny mitochondriální chaperony jsou kódovány jadernými geny. Je nutné zmínit, že ačkoli se chaperony podílejí na UPR, nejsou to molekuly specifické pouze pro tuto signální dráhu, ale jsou součástí také jiných procesů v buňce a mohou fungovat na UPR nezávisle.

4.2.1.1 mtHsp70

Chaperon mtHsp70, homolog DnaK, patří do rodiny Hsp70, což jsou heat shock proteiny o velikosti přibližně 70 kDa, mající ATPázovou aktivitu. Kochaperon mtHsp40, resp. DnaJ, reguluje jeho funkci, urychluje hydrolýzu ATP a může rekrutovat mtHsp70 k nesbaleným proteinům. Funkčnost mtHsp70 je závislá na vyváženém poměru jeho koncentrace ku koncentraci mtHsp40, pokud je kochaperonu příliš, inhibuje funkci mtHsp70 (Lee et al., 2015). Dalším klíčovým partnerem mtHsp70 je Hsp70 escort protein (Hep1), chaperon, jehož homology se zřejmě vyskytují u všech eukaryot (označované jsou také jako Zim17 nebo Tim15) (Burri et al., 2004; Yamamoto et al., 2005; Zhai et al., 2008). mtHsp70 tvoří při deficitu ATP agregáty. Hep1 svou vazbou na ATP doménu zabráňuje samoagregaci, udržuje mtHsp70 v nativní formě a tím chrání jeho funkčnost. Podílí se také na mitochondriálním transportu, při jeho deficienci je míra transportu nižší (Sichting et al., 2005; Zhai et al., 2008). V neposlední řadě je Hep1 nutný ke správnému sbalení ATP domény v nově syntetizovaném mtHsp70 (Blamowska et al., 2012).

Chaperony z rodiny Hsp70 rozeznávají cílové proteiny pomocí specifických vazebných míst, která se v proteinech vyskytují přibližně každých 36 residuí. Vazebné místo je tvořeno hydrofobním jádrem, často obsahujícím leucin, a postranními sekvencemi. Většinou je součástí struktury β -skládaného listu a v nativním stavu je ukryto uvnitř proteinu, v nesbaleném je odkryté a může dojít k navázání na chaperony (Rüdiger et al., 1997) V mitochondrii je mtHsp70 součástí komplexu pre-sequence translocase-associated motor (PAM), kde interaguje s translokázou vnitřní membrány 44 (Tim44). PAM je asociován s translokázou TIM23, které pomáhá při translokaci polypeptidů do matrix. Hsp70 zde funguje jako molekulární motor, který pomocí hydrolýzy ATP polypeptid translokázou protáhne (Schatz and Dobberstein, 1996). Samostatně se vyskytující mtHsp70 se podílí na sbalení importovaných a v mitochondrii syntetizovaných proteinů. Další z důležitých funkcí je navázání nesbalených proteinů a jejich prezentování mitochondriálním proteázám, čímž je bráněno jejich agregaci (Wagner et al., 1994).

4.2.1.2 Hsp60

Chaperony Hsp60 a Hsp10 jsou homology bakteriálních GroEL a GroES a patří mezi chaperoniny, tvoří tedy komplex ve tvaru barelu. Ten je rozdělen na dvě funkčně oddělené dutiny, označované jako Anfinsenovy klece, které znemožňují svému klientovi interakci s jinými proteiny. Hsp10/GroES jsou kochaperony, 10 kDa velké proteiny, které nasedají na místo vstupu do dutiny a tím vytváří uzavřený prostor pro skládání proteinu. Ten je rozeznáván stejně jako u Hsp70 prostřednictvím odhalených hydrofobních míst. Také tento chaperonin má ATPázovou aktivitu. Funkcí chaperonu Hsp60 je skládání proteinů importovaných, nově syntetizovaných a stresem denaturovaných. Na chaperony se váže sedm molekul ATP a energie z jejich hydrolýzy je použita na sbalení proteinů v dutině (Chen and Sigler, 1999; Schatz and Dobberstein, 1996).

4.2.1.3 TRAP-1

V mitochondriální matrix byl nalezen také homolog cytosolického Hsp90, nazvaný tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP-1) nebo také Hsp75. Chaperony z rodiny Hsp90 jsou zodpovědné za skládání a maturaci proteinů, fungují ale také jako regulátory proteinové homeostáze (Taipale et al., 2010). V mitochondrii má TRAP-1 kromě obvyklé funkce chaperonu zřejmě důležitou roli také v ochraně proti apoptóze a oxidativnímu stresu (Hua et al., 2007; Masuda et al., 2004). Ztráta nebo příliš vysoká exprese TRAP-1 vede k aktivaci UPR^{mt} (Baqri et al., 2014; Siegelin et al., 2011).

4.2.2 Mitochondriální proteázy

Proteázy jsou pro ustanovení homeostáze stejně důležité jako chaperony. Nejenže zmenšují množství proteinů, které musí obstarat chaperony, ale zároveň degradují proteiny nevratně špatně sbalené a zabráňují jejich toxické agregaci. Mitochondrie a bakterie nemají proteazomy, ale proteázy plní jejich funkci. Jejich činnost je nutná pro správnou funkci enzymů. Například důležitý enzym Krebsova cyklu akonitáza má výrazně zhoršenou funkčnost při deficienci Lon proteázy již po čtyřech dnech. Zprvu sice stoupne její množství, po určité době se však začnou hromadit enzymy nefunkční, poškozené karboxylací, které obvykle Lon odstraňuje (Bota and Davies, 2002). Proteázy navíc významnou signalizační funkci, bez které by vůbec nevznikla UPR. Těmto proteázám se říká PQC – protein quality control proteázy.

Proteázy v mitochondriální matrix zodpovědné za kontrolu kvality proteinů se řadí mezi AAA (ATPase Associated with diverse cellular Activities) proteázy. Jsou to proteiny prstencového tvaru s hydrolytickou a proteolytickou doménou, ukrytou v dutině prstence a tedy nepřístupnou pro proteiny v nativním stavu. Hydrolytická doména pomocí vazby a hydrolýzy ATP rozbalí protein a umožní jeho přístup k proteolytické doméně, která protein degraduje.

4.2.2.1 ClpXP

První a zřejmě nejdůležitější z těchto proteáz je ClpXP (caseinolytic protease), u *C. elegans* označovaná jako CLPP-1. Je to heterooligomerní proteáza složená z hexamerní ATPázové domény ClpX a dvojité heptamerní proteolytické domény ClpP. Její role spočívá v upstream signalizaci UPR^{mt}, stojí tedy na počátku signální dráhy. Při její inhibici odpověď nevzniká, protože nedochází k redistribuci klíčových transkripčních faktorů (viz níže) (Haynes et al., 2007).

ClpX má chaperonovou aktivitu a rozeznává u cílových proteinů vysoce konzervované specifické motivy (Flynn et al., 2003). Po rozeznání proteáza protein váže, částečně ho rozbaluje a předává do ClpP degradační dutiny, kde dochází k proteolýze na malé peptidy. Pomocí ClpX zároveň probíhá regulace proteázy, při stresu je upregulována, zatímco hladina ClpP zůstává nezměněna (Al-Furoukh et al., 2015).

4.2.2.2 Lon

Druhou z proteáz vyskytujících se volně v matrix je bakteriální a savčí Lon (označované také jako La) (Wang et al., 1993), homolog kvasinkové PIM1 proteázy (Van Dyck et al., 1994). Lon je ATP-stimulovaná (nikoliv přímo ATP-dependentní, vykazuje bazální aktivitu i při deficitu ATP) serinová proteáza, která v mitochondrii preferenčně degraduje proteiny oxidativně poškozené. Oxidativní modifikace způsobí odhalení hydrofobních míst a tím větší náchylnost k naštěpení proteázou (Bota and Davies, 2002). Stejně jako ClpXP, i Lon proteáza štěpí proteiny špatně sbalené, které rozeznává díky úsekům s aminokyselinami s aromatickými postranními řetězci. Tyto úseky jsou v nativních proteinech nepřístupné, ale denurací dojde k jejich odhalení (Gur and Sauer, 2008). Kromě toho Lon prostřednictvím specifických faktorů ovlivňuje transkripci a replikaci mtDNA (Matsushima et al., 2010).

4.2.2.3 m-AAA a i-AAA

Na rozdíl od předchozích proteáz vyskytujících se volně v matrix, m-AAA a i-AAA jsou proteázy pevně ukotvené ve vnitřní mitochondriální membráně. Proteáza m-AAA má aktivní doménu orientovanou do matrix a v savčích buňkách je složena z podjednotek Afg3L2 a parapleginu (Atorino et al., 2003), v kvasinkách Yta10 a Yta12 (Arlt et al., 1996). Naopak katalytická doména i-AAA proteáz, označovaných také jako YME1, směřuje do mezimembránového prostoru mitochondrie (Leonhard et al., 1996). Jejich hlavní funkcí je udržování proteostáze ve vnitřní mitochondriální membráně. Degradují nesbalené polypeptidy asociované s membránou a jsou nutné pro správné složení a funkčnost dýchacího řetězce (Arlt et al., 1998). Jejich deficit vede k hromadění nesbalených proteinů a vyvolání mitochondriálního stresu (Qi et al., 2016).

4.3 Savčí mitochondriální UPR

První studie naznačující existenci organelově specifické mitochondriální UPR byly prováděny na savčích buňkách a přinesly zjištění, že při ztrátě mitochondriální DNA dochází ke zvýšení množství mitochondriálních chaperonů Hsp60 a Hsp10 (Martinus et al., 1996). Pozdější výzkumy ukázaly, že při hromadění nesbalených proteinů v matrix dochází také ke zvýšené expresi genů pro chaperon DnaJ a proteázu ClpP. Naopak exprese chaperonů ostatních buněčných kompartmentů zvýšená nebyla. Tyto informace posloužily jako důkaz, že při agregaci nesbalených proteinů v mitochondrii dochází k vyvolání specifické mitochondriální UPR a expresi mitochondriálních chaperonů a proteáz (Zhao et al., 2002).

4.3.1 CHOP

Prvním identifikovaným článkem signální dráhy UPR^{mt} je transkripční faktor CHOP (C/EBP homologous protein). Počátečním zjištěním naznačujícím jeho souvislost s UPR v mitochondriích byl výskyt chop elementů (úseků rozeznávaných CHOP) v promotorech genů aktivovaných při mitochondriálním stresu. CHOP je v buňkách exprimován konstitutivně, při buněčném stresu ale jeho hladina stoupá. Pro vznik odpovědi je potřebná jeho dimerizace s transkripčním faktorem C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein) (Zhao et al., 2002).

Jak bylo zjištěno již dříve, faktor CHOP hraje roli také při UPR^{ER} (Wang et al., 1996). Tuto dvojitou roli umožňuje promotor *chop* genu, který má v sobě různá vazebná místa. Vazebné místo pro transkripční faktory UPR^{ER} je označováno jako ER stress responsive element (ERSE) (Yoshida et al., 1998), vážou se na něj faktory ATF-6 a NF-Y (Yoshida et al., 2000) a jeho delece nemá vliv na UPR^{mt}. Směrem k 5'-konci od ERSE se nachází AP-1 element, který byl nalezen také v promotoru pro *c/ebpβ*. Ten se uplatňuje při UPR^{mt}. Významnou se zdá být i konzervovaná sekvence předcházející AP-1, jejíž delece vede k nižší odezvě na mitochondriální stres (Horibe and Hoogenraad, 2007). Kromě ERSE má na expresi CHOP při ER stresu vliv také další element označovaný jako C/EBP-ATF. Při jeho deleci dramaticky klesá jak indukovaná, tak bazální exprese CHOP. Na C/EBP-ATF při ER stresu nasedá faktor ATF4, aktivovaný signální dráhou, zahrnující PERK (Harding et al., 2000; Ma et al., 2002).

CHOP se tedy podílí na dvou různých stresových signalizačních drahách. Odpověď na stres je ale organelově specifická, což naznačuje, že CHOP není jediným faktorem, který v procesu hraje roli (Zhao et al., 2002). Přestože se CHOP element nachází v promotorech velkého množství proteinů, jen velmi malý podíl je aktivován při UPR^{mt}. Kromě CHOP elementu byly v promotorech genů aktivovaných UPR^{mt} nalezeny další konzervované sekvence. První z nich, označovaná jako mitochondrial UPR element 1 (MURE1), se nachází 14 bp před CHOP elementem a má délku 12 bp. Druhá, MURE2, se vyskytuje 21 bp za CHOP elementem a je dlouhá 9 bp. Tyto byly nalezeny u všech

zkoumaných genů aktivovaných UPR^{mt} kromě promotoru pro Hsp60/10. Jejich delece měla negativní dopad na aktivaci stresové odpovědi. Zatím však nebyly identifikovány žádné transkripční faktory, které s MURE interagují (Aldridge et al., 2007).

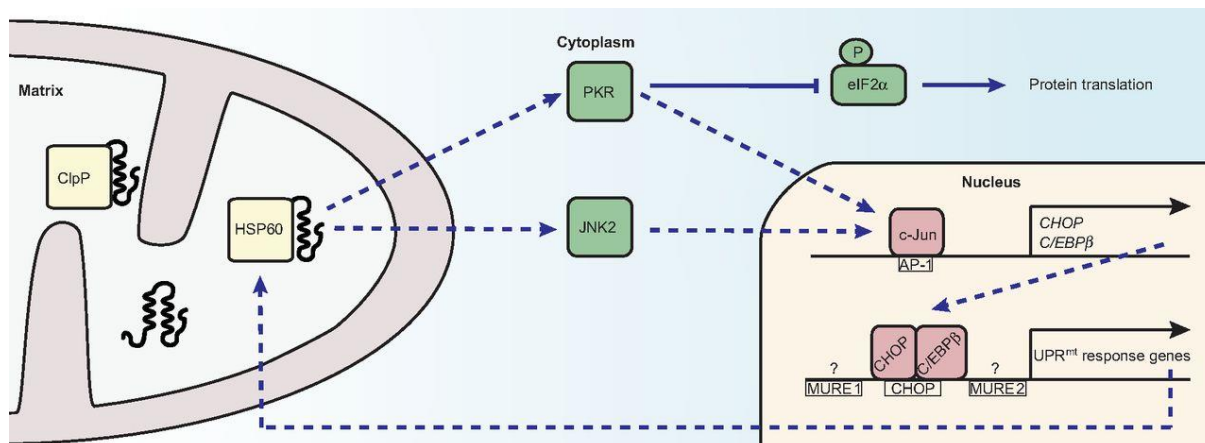
4.3.2 Jun a JNK2

Savčí UPR^{mt} je dvoufázový proces. Nejprve dochází vlivem stresu v mitochondrii k aktivaci exprese genu pro CHOP, který dimerizuje, nasedá na promotory a aktivuje geny mitochondriálních efektorů (viz. obr. 3). Jak bylo zmíněno výše, v promotoru *chop* se nachází AP-1 element. Transkripční faktor nasedající na AP-1 a aktivující expresi se nazývá Jun (také c-Jun). Jun je inhibován represorovým komplexem obsahujícím histon deacetylázu 3 (HDAC3). Jedním ze způsobů, jakým je Jun aktivován je fosforylace. Tu zajišťuje mitogen-activated protein kinase (MAP) označovaná jako c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2), která je při stresu stimulována fosforylací nadřazenou kinázou (např. JNKK). JNK2 následně fosforylací Jun způsobí oddisociování inhibičního komplexu a Jun tak není dále inhibován (Jaeschke et al., 2006). Obecně aktivace Jun jeho uvolněním od inhibičního komplexu může probíhat i nezávisle na JNK2 (Weiss et al., 2003). Při mitochondriálním stresu se ale zřejmě uplatňuje právě dráha zahrnující JNK2, neboť její inhibicí dochází také k inhibici UPR^{mt} (Horibe and Hoogenraad, 2007).

4.3.3 PKR

Jak bylo zjištěno později, JNK2 není jediná kináza ovlivňující Jun/AP-1. Další takovou kinázou je PKR (double-stranded-RNA-activated protein kinase). Pokusy ukázaly, že PKR je eseciální pro indukci exprese z promotoru *hsp60* při mitochondriálním stresu, a tedy obecně pro signalizaci UPR^{mt}. Při stresu má ale i další důležitou funkci a tou je fosforylace eIF2 α , která, jak bylo zmíněno v kapitole o UPR^{ER}, má na svědomí utlumení translace v cytosolu (Rath et al., 2012).

Výzkum PKR v souvislosti s UPR^{mt} přinesl ještě jedno zajímavé zjištění. Jak je popsáno v kapitole Mitochondriální UPR u *C. elegans*, na počátku signalizace z mitochondriální matrix stojí proteáza ClpP. Ta štěpí nesbalené proteiny na krátké peptidy, které jsou transportovány do mezimembránového prostoru a následně uvolněny do cytosolu. Ukázalo se, že podobný mechanismus se zřejmě uplatňuje i v savčích buňkách, neboť inhibice ClpP vedla k oslabení signalizace při mitochondriálním stresu (Rath et al., 2012).



Obrázek 3 – Savčí mitochondriální UPR. Signalizace z mitochondrie závislá na proteáze ClpP vede zatím nepopsaným způsobem k aktivaci kináz PKR a JNK2. Obě kinázy se poté fosforylací podílí na aktivaci faktoru c-Jun, který nasedá na AP-1 místo v promotoru chop a c/ebpβ. Dochází k jejich expresi, dimerizaci a nasednutí na element CHOP, který se vyskytuje v genech pro efekторы UPR^{mt}. Zdá se, že CHOP není jediný faktor aktivujícími transkripci, neboť v promotoru těchto genů se nachází také dva nepostradatelné elementy MURE1 a MURE2, způsob jejich působení ale prozatím nebyl popsán. Aktivace genů vede k produkci mitochondriálních chaperonů a proteáz, které zpětně ustanovují proteostázi. Součástí signální dráhy je také celkové utlumení cytosolické translace fosforylací eIF2α pomocí kinázy PKR (převzato z Jovaisaite et al., 2014).

4.4 Mitochondriální UPR u *C. elegans*

Přestože UPR byla jako první popsána v savčích buňkách, nejvíce výzkumů bylo prováděno u *C. elegans*. Díky tomu je dráha popsána podrobněji a je lépe pochopena. Stále však zůstává z části nerozluštěná (viz. obr. 4).

4.4.1 Počátek signalizace

Za iniciaci signalizace rozpoznáním špatně sbalených proteinů je zřejmě zodpovědná mitochondriální proteáza CLPP-1. Tato proteáza je homologní s bakteriální ClpP, má ale navíc N-terminální sekvenci, která jí směřuje do mitochondrie (Haynes et al., 2007). Štěpí proteiny na peptidy dlouhé 6-30 AK, které jsou poté transportovány ven z mitochondrie. Za jejich eflux přes vnitřní mitochondriální membránu je zodpovědný ABC transportér HAF-1, homolog kvasinkového Mdl1 a savčího TAP, což jsou peptidové transportéry. Přes vnější membránu pak prochází pravděpodobně difúzí (Haynes et al., 2010). Tento proces vede k celkovému snížení importu do mitochondrie. Teorie, které se snažily vysvětlit, jak vypadá následná signalizace od exportu peptidů zahrnovaly myšlenky o přímém vlivu peptidů na transkripční faktory, míře transportu přes HAF-1 nebo existenci nepeptidového substrátu HAF-1 ligandu (Haynes and Ron, 2010). Nakonec však

samotní autoři těchto myšlenek přišli s odpovědí mnohem jednodušší. Snížení importu do mitochondrie totiž umožní ATFS-1 vstoupit do jádra a plnit funkci transkripčního faktoru (Nargund et al., 2012).

4.4.2 ATFS-1

Klíčovou součástí signalizace závislé na CLPP-1 a HAF-1 je transkripční faktor ATFS-1 (activating transcription factor associated with stress), protein nesoucí leucinový zip dříve označovaný jako ZC376.7 (Haynes et al., 2010). ATFS-1 má dvě targetovací sekvence, C-koncovou, která ho směřuje do jádra a N-koncovou, targetující do mitochondrie. Díky tomu v buňce funguje jako komunikační prvek. Mitochondriální targetovací sekvence je důležitá pro potlačení UPR^{mt}. V mitochondrii je ATFS-1 degradován Lon proteázou a nemůže proto fungovat jako transkripční faktor. Pokud při mitochondriálním stresu dojde ke snížení importu proteinů do matrix, ATFS-1 se akumuluje v jádře. Tam aktivuje geny pro mitochondriální chaperony HSP-60 a HSP-6, proteázy a proteiny podílející se na mitochondriálním importu, ROS detoxifikaci a ochraně proti mitochondriální dysfunkci. ATFS-1 také upreguluje několik genů zodpovědných za glykolýzu, což naznačuje, že se buňka snaží podpořit získávání energie jinak než respiračním řetězcem v mitochondrii (Nargund et al., 2012).

4.4.3 DVE-1 a UBL-5

Dalšími dvěma důležitými prvky signalizace závislé na CLPP-1, avšak nezávislé na HAF-1, jsou vysoce konzervované transkripční faktory DVE-1 a UBL-5 (ubiquitin-like protein 5). DVE-1 obsahuje DNA vazebnou homeodoménu a je homologní k savčím organizátorům chromatinu SATB1 a SATB2 (Galante et al., 2007). Během stresu dochází k upregulaci genu *ubl-5*, což je nezbytné k plnému rozvinutí odpovědi. Množství UBL-5 v jádře stoupá a dochází k jeho asociaci s DVE-1. Jejich komplex nasedá například na promotory genů kódujících mitochondriální chaperony mtHsp70 a Hsp60 (Benedetti et al., 2006; Haynes et al., 2007).

Podstata vlastní interakce mezi ATFS-1 a DVE-1/UBL-5 komplexem zůstává prozatím neodhalená. Jednou z teorií je, že DVE-1 by mohl působit podobně jako savčí SATB1 a SATB2, tedy upravovat uspořádání chromatinu a umožnit tak nasednutí ATFS-1 (Jovaisaite et al., 2014).

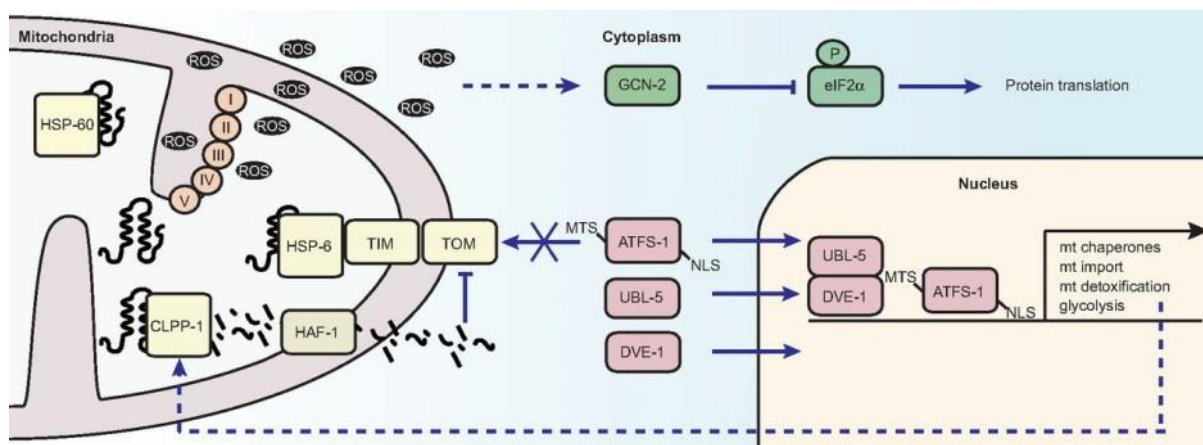
Na rozdíl od UPR v cytosolu a ER, nemůže být během UPR^{mt} negativní zpětná vazba založena na přímé interakci transkripčních faktorů s chaperony. Tomu brání dvojitá mitochondriální membrána. Vzhledem k tomu, že mitochondriální signalizace začíná u proteinů naštěpených proteázou, mohou nepřímo chaperony dráhu inhibovat vázáním a sbalováním cílových proteinů a tím znemožnit jejich štěpení (Haynes and Ron, 2010).

4.4.4 Křížení signálních drah UPR^{mt} a UPR^{ER}

Ačkoliv se zprvu zdálo, že signální dráhy UPR^{mt} a UPR^{ER} fungují naprosto odděleně, s postupem času se ukázalo, že dochází k jejich protínání. Při UPR^{ER} dochází prostřednictvím kinázy PERK k fosforylaci faktoru eIF2 α a tím k utlumení translace v cytosolu. General control non-derepressible-2 (GCN-2) je cytosolická kináza, která plní velmi podobnou funkci při UPR^{mt}. Zvýšená produkce ROS při mitochondriálním stresu aktivuje kinázu a ta fosforyluje eIF2 α , načež dochází ke snížení hladiny cytosolické translace. Přesný mechanismus působení ROS na kinázu ještě není známý, spekuluje se o aktivaci přes tRNA syntetázovou doménu, přes níž je GCN-2 aktivována například při aminokyselinovém nedostatku (Wek et al., 1995). Ukázalo se, že tato dráha je komplementární k signální dráze HAF-1/ATFS-1. To znamená, že pokud dojde k inhibici nebo poškození jedné z drah, druhá dráha je upregulována. Pokud je poškozena funkce obou drah, dochází u *C. elegans* za stresu k vývojovým vadám, neschopnosti přeměny v dospělce a výraznému zkrácení délky života (Baker et al., 2012a).

Snížení translace v cytosolu dopomáhá k ustavení proteinové homeostáze a zachování funkce mitochondrie (Wang et al., 2008). Nabízí se ale otázka, zda je regulována i translace v mitochondrii, neboť jinak by v matrix docházelo k hromadění podjednotek elektrontransportního řetězce, kódovaných mitochondriálními geny. Ukázalo se, že translace v mitochondrii je silně závislá na importu podjednotek elektrontransportního řetězce z cytoplasmy a při absenci importu je atenuována (Mick et al., 2011). Je proto možné, že utlumení translace v cytosolu vede také ke snížení translace v matrix (Baker et al., 2012a).

Nejnovějším objevem v souvislosti s křížením drah UPR^{mt} a UPR^{ER} je cytosolická kináza PIFK-1 (phosphoinositide four kinase). Inhibicí PIFK-1 dojde k atenuaci exprese mitochondriálního HSP-60, ale i HSP-4, který je součástí signální dráhy UPR^{ER}. PIFK-1 je tedy složkou signalizace obou drah (Runkel et al., 2013). Mechanismus působení této kinázy prozatím nebyl popsán.



Obrázek 4 – UPR u *C. elegans*. Nesbalené proteiny jsou naštěpeny CLPP-1 proteázou na krátké peptidy, které jsou prostřednictvím HAF-1 transportovány do cytoplasmy, v důsledku čehož dochází k celkovému útlumu transportu do mitochondrie. Faktor ATFS-1 má sekvence, které ho směřují jak do mitochondrie, tak do jádra. Kvůli utlumení mitochondriálního transportu proto může být targetován do jádra, kde funguje jako transkripční faktor pro mitochondriální chaperony a další molekuly podílející se na UPR. Pro aktivaci stresové odpovědi jsou nezbytné také faktory UBL-5 a DVE-1, jejich přesná funkce ale ještě není známá. ROS produkované mitochondrii během stresu aktivují kinázu GCN-2, která fosforyluje eIF2 α a tím v cytoplasmě tlumí translaci (převzato z Jovaisaite et al., 2014)

4.5 UPR v mezimembránovém prostoru mitochondrie

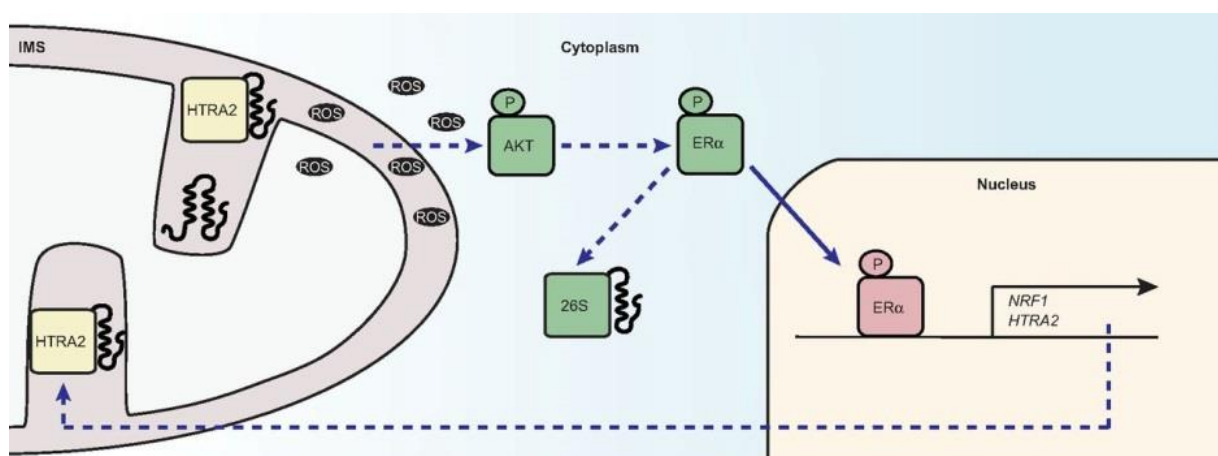
Jak již bylo řečeno, mitochondrie je obalena dvěma membránami, které vymezují mezimembránový prostor (IMS). IMS má vlastní proteiny, které jsou do něj směřovány díky specifickému signálu, označovanému jako MISS (mitochondrial IMS sorting signal). Všechny proteiny IMS jsou kódovány v jádře a jsou transportovány po translaci v cytosolu (Herrmann and Riemer, 2010).

Stejně jako v ostatních kompartmentech, i zde může dojít k výskytu nesbalených proteinů. Na rozdíl od matrix ale v IMS zatím nebyly identifikovány žádné chaperony z rodiny Hsp40, Hsp60 nebo Hsp70, přestože se zde objevují složité proteinové komplexy, které zřejmě vyžadují asistenci při sbalování. Dá se tedy předpokládat, že sbalování je umožněno jinými mechanismy.

Signální dráha mezimembránové UPR je samostatná, nezávislá na dráze v matrix. Stejně jako UPR v ER a v matrix, i tato je specifická a nedochází k aktivaci genů pro ostatní odpovědi. Hromadění nesbalených proteinů v IMS vede ke zvýšené produkci ROS a tím k aktivaci kinázy AKT. Tato kináza poté fosforyluje ER α (estrogen receptor α) a tím ho aktivuje (Campbell et al., 2001). Aktivovaný ER α je zřejmě centrálním bodem stresové odpovědi IMS. Prozatím byly popsány jeho dvě

důležité funkce. První z nich je aktivace genů pro vybrané složky IMS, například proteázu Omi nebo transkripční regulátor proteinů elektrontransportního řetězce NRF1, který chrání mitochondrii před ztrátou membránového potenciálu. Druhou funkcí je aktivace cytosolického proteazomu v reakci na stres v IMS (viz. obr. 5) (Papa and Germain, 2011).

Cytosolický proteazom hraje při udržování proteostáze v IMS důležitou roli. Špatně sbalené proteiny IMS jsou v cytosolu ubiquitinovány a degradovány ještě dříve, než se dostanou do mitochondrie. Pokud však dojde k inhibici proteazomu, poškozené proteiny jsou transportovány do IMS a tvoří se agregáty. Aby k agregaci nedošlo, dojde při inhibici proteazomu k aktivaci IMS proteázy Omi/HtrA2, která špatně sbalené proteiny naštěpí (Radke et al., 2008). Určitý vliv na proteostázi v IMS má také proteáza vnitřní mitochondriální membrány YME1 (Baker et al., 2012b).



Obrázek 5 - UPR^{mt} v mezimembránovém prostoru. Zvýšení produkce ROS v důsledku stresu aktivuje kinázu AKT, která fosforyluje ERα. Ten pak stimuluje aktivitu proteazomu a aktivuje expresi genů pro proteázu IMS HtrA2 a faktoru NRF1 (převzato z Jovaisaite et al., 2014).

4.6 UPR^{mt} v kontextu organismu

Agregované nesbalené proteiny jsou pro buňku toxické a vedou k poškození mitochondrie, případně až k buněčné smrti. V kontextu organismu lze v důsledku této toxicity pozorovat vznik řady chorob. Jedním z příkladů jsou neurodegenerativní onemocnění, jako je Parkinsonova a Huntingtonova choroba. Vlivem akumulace proteinů dochází ke smrti neuronů ve specifických oblastech nervové soustavy, což vede ke vzniku charakteristických příznaků chorob (Arrasate and Finkbeiner, 2012; Gundersen, 2010). Onemocnění mohou být spjata také přímo s dysfunkcí složek UPR^{mt}. Příkladem je další neurodegenerativní onemocnění, hereditární spastická paraparéza, která může vznikat, mimo jiné, z důvodu mutace v genech pro Hsp60 nebo m-AAA proteázu (Casari et al., 1998; Hansen et al., 2002). V neposlední řadě jsou s mitochondriální dysfunkcí také spojována nádorová onemocnění. Mitochondrie rakovinných buněk jsou vystaveny většímu stresu kvůli vyšší

produkci ROS, a také zde častěji dochází k mutacím v mtDNA (Petros et al., 2005). V nádorových buňkách byla pozorována zvýšená hladina mitochondriálních chaperonů, které pravděpodobně umožňují jejich přežití (Ghosh et al., 2008). Inhibice mitochondriálních chaperonů v nádorových buňkách vede ke ztrátě membránového potenciálu a buněčné smrti (Kang et al., 2007). Tyto informace naznačují, že signální dráha UPR^{mt} hraje u nádorových onemocnění důležitou roli.

Jedním z důvodů studia UPR^{mt} a mitochondriálních dysfunkcí obecně je spojitost s délkou života organismu. Stárnutí organismu je komplexní proces, který je mimo jiné spjat také s funkcí mitochondrie. Korelace aktivace UPR^{mt} s délkou života byla opakovaně prokázána mnoha výzkumy. Zdá se, že aktivace UPR^{mt} a její protektivní účinky vedou k prodloužení délky života organismů (Houtkooper et al., 2013; Mouchiroud et al., 2013).

5 Závěr

Tato práce shnuje dosavadní poznatky o UPR^{mt} v mitochondriální matrix a v mezimembránovém prostoru mitochondrie. Jak z práce vyplývá, poměrně velká část signálních drah UPR je již popsána, stále však zůstávají nezodpovězené otázky.

Pro výzkum UPR^{mt} by bylo přínosné odhalit možnou homologii mezi dráhou u savců a *C. elegans* a vyvodit konzevovanost dráhy napříč živočišnou říší. Otázkou je, která molekula u *C. elegans* je homologní faktoru CHOP. Některé vědecké práce uvažují faktor ATFS-1, avšak charakter dráhy CHOP, tedy jeho upregulace, dimerizace a aktivace dalších genů je podobná spíše UBL-5. Některé detaily chybí v konkrétních drahách. U savčí UPR^{mt} je pravděpodobně největší otázkou aktivace elementů MURE1 a MURE2. Ačkoliv se nabízí možnost působení transkripčních faktorů, vyloučit se nedá ani jiná forma aktivace, například fosforylace. Další neznámá je aktivace kináz, které fosforylují faktor Jun. Co se týče UPR^{mt} u *C. elegans*, zde je třeba zjistit, jakým mechanismem způsobí export peptidů snížení importu do mitochondrie, jaká je funkce komplexu DVE-1/UBL-5 a jaká je jeho interakce s ATFS-1. UPR^{mt} v mezimembránovém prostoru přináší novou součást dráhy, a tou je stimulace cytosolického proteazomu. Bylo by zajímavé zjistit, zda je proteazom stimulován i v důsledku stresu v mitochondriální matrix. Na závěr je třeba zmínit dosud nepopsané interakce mezi signálními dráhami UPR^{mt} a UPR^{ER}, například dráhu zahrnující kinázu PIFK-1.

Z parazitologického hlediska výzkum UPR^{mt} prakticky ještě nezačal a tato práce může posloužit jako základ pro studium. Signální dráhy nebyly na parazitických organismech zkoumány, přestože jejich odhalení by mohlo mít velký potenciál. UPR^{mt} se uvažuje jako možný cíl při léčbě rakoviny. Pokud by tuto signální dráhu využívali parazité, bylo by možné použít její poškození k léčbě parazitických onemocnění.

6 Seznam používaných zkratk

ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
ATFS-1	activating transcription factor associated with stress-1
BiP	chaperone-binding immunoglobulin protein
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CHOP	C/EBP homologous protein
Clp	caseinolytic protease
DR5	death receptor 5
eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2
ER	endoplasmatické retikulum
ER α	estrogen receptor α
ERAD	ER-associated degradation pathway
ERSE	ER stress responsive element
GCN-2	general control non-derepressible-2
HAC1	homologous to Atf/Creb1
HDAC 3	histone deacetylase 3
Hep1	Hsp70 escort protein
HSE	heat shock element
HSF1	heat shock factor 1
IMS	intermembrane space
Ire1	inositol-requiring enzyme 1
JNK2	c-Jun N-terminal kinase 2
MAP	mitogen-activated protein kinase
MURE	mitochondrial UPR element
PAM	presequence translocase-associated motor
PERK	protein-kinase-like endoplasmatic reticulum kinase
PIFK-1	phosphoinositide four kinase
PKR	double-stranded-RNA-activated protein kinase
RIDD	regulated Ire1-dependent decay
ROS	reactive oxygen species
TOM	translocase of outer membrane
TRAP-1	tumor necrosis factor receptor-associated protein 1
TRB3	tribbles-related protein 3
UBL-5	ubiquitin-like protein 5
UPR	unfolded protein response
VDAC	voltage-dependent anion channel
XBP1	x-box binding protein 1

7 Seznam použité literatury

- Aldridge, J. E., Horibe, T. and Hoogenraad, N. J.** (2007). Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One* **2**, e874.
- Al-Furoukh, N., Ianni, A., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., Wanrooij, S. and Braun, T.** (2015). ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPRmt) in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 2580–2591.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. and Langer, T.** (1996). The YTA10–12 Complex, an AAA Protease with Chaperone-like Activity in the Inner Membrane of Mitochondria. *Cell* **85**, 875–885.
- Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W. and Langer, T.** (1998). The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J.* **17**, 4837–47.
- * **Arrasate, M. and Finkbeiner, S.** (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* **238**, 1–11.
- Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T. and Casari, G.** (2003). Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* **163**, 777–87.
- Baker, B. M., Nargund, A. M., Sun, T. and Haynes, C. M.** (2012a). Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 α kinase GCN-2. *PLoS Genet.* **8**, e1002760.
- Baker, M. J., Mooga, V. P., Guiard, B., Langer, T., Ryan, M. T. and Stojanovski, D.** (2012b). Impaired folding of the mitochondrial small TIM chaperones induces clearance by the i-AAA protease. *J. Mol. Biol.* **424**, 227–39.
- * **Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483–95.
- Baqri, R. M., Pietron, A. V., Gokhale, R. H., Turner, B. A., Kaguni, L. S., Shingleton, A. W., Kunes, S. and Miller, K. E.** (2014). Mitochondrial chaperone TRAP1 activates the mitochondrial UPR and extends healthspan in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* **141-142**, 35–45.
- Benedetti, C., Haynes, C. M., Yang, Y., Harding, H. P. and Ron, D.** (2006). Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. *Genetics* **174**, 229–39.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. and Ron, D.** (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326–32.
- Blamowska, M., Neupert, W. and Hell, K.** (2012). Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *J. Cell Biol.* **199**, 125–35.
- Bota, D. A. and Davies, K. J. A.** (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat. Cell Biol.* **4**, 674–80.

- Burri, L., Vascotto, K., Fredersdorf, S., Tiedt, R., Hall, M. N. and Lithgow, T.** (2004). Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 50243–9.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. and Ron, D.** (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92–6.
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S. and Nakshatri, H.** (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* **276**, 9817–24.
- Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., et al.** (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**, 973–83.
- Cox, J. S. and Walter, P.** (1996). A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell* **87**, 391–404.
- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M. and Walter, P.** (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18773–84.
- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y.-I., Sauer, R. T. and Baker, T. A.** (2003). Proteomic Discovery of Cellular Substrates of the ClpXP Protease Reveals Five Classes of ClpX-Recognition Signals. *Mol. Cell* **11**, 671–683.
- Fribley, A. M., Evenchik, B., Zeng, Q., Park, B. K., Guan, J. Y., Zhang, H., Hale, T. J., Soengas, M. S., Kaufman, R. J. and Wang, C.-Y.** (2006). Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma cells by induction of Noxa. *J. Biol. Chem.* **281**, 31440–7.
- * **Fribley, A., Zhang, K. and Kaufman, R. J.** (2009). Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol. Biol.* **559**, 191–204.
- Galande, S., Purbey, P. K., Notani, D. and Kumar, P. P.** (2007). The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 408–14.
- Gardner, B. M. and Walter, P.** (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**, 1891–4.
- Ghosh, J. C., Dohi, T., Kang, B. H. and Altieri, D. C.** (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 5188–94.
- Gosline, S. J. C., Nascimento, M., McCall, L.-I., Zilberstein, D., Thomas, D. Y., Matlashewski, G. and Hallett, M.** (2011). Intracellular eukaryotic parasites have a distinct unfolded protein response. *PLoS One* **6**, e19118.
- Guisbert, E., Herman, C., Lu, C. Z. and Gross, C. A.** (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev.* **18**, 2812–21.
- * **Gundersen, V.** (2010). Protein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 82–7.
- Gur, E. and Sauer, R. T.** (2008). Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease.

Genes Dev. **22**, 2267–77.

- Hahn, J.-S., Hu, Z., Thiele, D. J. and Iyer, V. R.** (2004). Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5249–56.
- Hansen, J. J., Dürr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M. N., Davoine, C.-S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N., et al.** (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1328–32.
- Harding, H. P., Zhang, Y. and Ron, D.** (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271–4.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D.** (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108.
- * **Haynes, C. M. and Ron, D.** (2010). The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J. Cell Sci.* **123**, 3849–55.
- Haynes, C. M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y. and Ron, D.** (2007). ClpP Mediates Activation of a Mitochondrial Unfolded Protein Response in *C. elegans*. *Dev. Cell* **13**, 467–480.
- Haynes, C. M., Yang, Y., Blais, S. P., Neubert, T. A. and Ron, D.** (2010). The Matrix Peptide Exporter HAF-1 Signals a Mitochondrial UPR by Activating the Transcription Factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol. Cell* **37**, 529–540.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K.** (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3787–99.
- * **Herrmann, J. M. and Riemer, J.** (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1341–58.
- Hollien, J. and Weissman, J. S.** (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* **313**, 104–7.
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. and Weissman, J. S.** (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **186**, 323–31.
- Horibe, T. and Hoogenraad, N. J.** (2007). The chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS One* **2**, e835.
- Houtkooper, R. H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., Williams, R. W. and Auwerx, J.** (2013). Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* **497**, 451–7.
- Hua, G., Zhang, Q. and Fan, Z.** (2007). Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **282**, 20553–60.
- Chen, L. and Sigler, P. B.** (1999). The Crystal Structure of a GroEL/Peptide Complex: Plasticity as a Basis for Substrate Diversity. *Cell* **99**, 757–768.
- Jaeschke, A., Karasarides, M., Ventura, J.-J., Ehrhardt, A., Zhang, C., Flavell, R. A., Shokat, K. M. and Davis, R. J.** (2006). JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Mol.*

Cell **23**, 899–911.

- * **Jovaisaite, V., Mouchiroud, L. and Auwerx, J.** (2014). The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J. Exp. Biol.* **217**, 137–43.
- Joyce, B. R., Tampaki, Z., Kim, K., Wek, R. C. and Sullivan, W. J.** (2013). The unfolded protein response in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* features translational and transcriptional control. *Eukaryot. Cell* **12**, 979–89.
- Kang, B. H., Plescia, J., Dohi, T., Rosa, J., Doxsey, S. J. and Altieri, D. C.** (2007). Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. *Cell* **131**, 257–70.
- Lahav, T., Sivam, D., Volpin, H., Ronen, M., Tsigankov, P., Green, A., Holland, N., Kuzyk, M., Borchers, C., Zilberstein, D., et al.** (2011). Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. *FASEB J.* **25**, 515–25.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. and Kaufman, R. J.** (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* **16**, 452–66.
- Lee, B., Ahn, Y., Kang, S.-M., Park, Y., Jeon, Y.-J., Rho, J. M. and Kim, S.-W.** (2015). Stoichiometric expression of mtHsp40 and mtHsp70 modulates mitochondrial morphology and cristae structure via Opa1L cleavage. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2156–67.
- Leonhard, K., Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Mannhaupt, G., Neupert, W. and Langer, T.** (1996). AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* **15**, 4218–29.
- Ma, Y., Brewer, J. W., Alan Diehl, J. and Hendershot, L. M.** (2002). Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. *J. Mol. Biol.* **318**, 1351–1365.
- Martinus, R. D., Garth, G. P., Webster, T. L., Cartwright, P., Naylor, D. J., Høj, P. B. and Hoogenraad, N. J.** (1996). Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur. J. Biochem.* **240**, 98–103.
- Masuda, Y., Shima, G., Aiuchi, T., Horie, M., Hori, K., Nakajo, S., Kajimoto, S., Shibayama-Imazu, T. and Nakaya, K.** (2004). Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *J. Biol. Chem.* **279**, 42503–15.
- Matsushima, Y., Goto, Y. and Kaguni, L. S.** (2010). Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18410–5.
- * **Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T.** (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* **7**, 766–72.
- Mick, D. U., Fox, T. D. and Rehling, P.** (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 14–20.
- Moraes, M. C. S., Jesus, T. C. L., Hashimoto, N. N., Dey, M., Schwartz, K. J., Alves, V. S., Avila,**

- C. C., Bangs, J. D., Dever, T. E., Schenkman, S., et al.** (2007). Novel membrane-bound eIF2 α kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **6**, 1979–91.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. and Yura, T.** (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* **1**, 803–17.
- Morimoto, R. I.** (2011). The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 91–9.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y.-S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., et al.** (2013). The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* **154**, 430–41.
- Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M. and Haynes, C. M.** (2012). Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation. *Science* (80-.). **337**, 587–590.
- * **Nyström, T.** (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**, 1311–7.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. and Hayashi, H.** (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* **24**, 1243–1255.
- Papa, L. and Germain, D.** (2011). Estrogen receptor mediates a distinct mitochondrial unfolded protein response. *J. Cell Sci.* **124**, 1396–402.
- Petros, J. A., Baumann, A. K., Ruiz-Pesini, E., Amin, M. B., Sun, C. Q., Hall, J., Lim, S., Issa, M. M., Flanders, W. D., Hosseini, S. H., et al.** (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 719–24.
- Qi, Y., Liu, H., Daniels, M. P., Zhang, G. and Xu, H.** (2016). Loss of *Drosophila* i-AAA protease, dYME1L, causes abnormal mitochondria and apoptotic degeneration. *Cell Death Differ.* **23**, 291–302.
- Radke, S., Chander, H., Schäfer, P., Meiss, G., Krüger, R., Schulz, J. B. and Germain, D.** (2008). Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *J. Biol. Chem.* **283**, 12681–5.
- Rath, E., Berger, E., Messlik, A., Nunes, T., Liu, B., Kim, S. C., Hoogenraad, N., Sans, M., Sartor, R. B. and Haller, D.** (2012). Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation. *Gut* **61**, 1269–78.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. and Bukau, B.** (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**, 1501–7.
- Runkel, E. D., Liu, S., Baumeister, R. and Schulze, E.** (2013). Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet.* **9**, e1003346.
- Shamu, C. E. and Walter, P.** (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15**, 3028–39.

- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K., et al.** (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* **107**, 893–903.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. and Prywes, R.** (2002). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev. Cell* **3**, 99–111.
- Schatz, G. and Dobberstein, B.** (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519–26.
- Siegelin, M. D., Dohi, T., Raskett, C. M., Orlowski, G. M., Powers, C. M., Gilbert, C. A., Ross, A. H., Plescia, J. and Altieri, D. C.** (2011). Exploiting the mitochondrial unfolded protein response for cancer therapy in mice and human cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 1349–60.
- Sichting, M., Mokranjac, D., Azem, A., Neupert, W. and Hell, K.** (2005). Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. *EMBO J.* **24**, 1046–56.
- Straus, D., Walter, W. and Gross, C. A.** (1990). DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. *Genes Dev.* **4**, 2202–9.
- Taipale, M., Jarosz, D. F. and Lindquist, S.** (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 515–28.
- Van Dyck, L., Pearce, D. A. and Sherman, F.** (1994). PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 238–42.
- * **Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Li, X. X., Schumacker, P. T., Colombini, M. and Thompson, C. B.** (2000). Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4666–71.
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. and Neupert, W.** (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* **13**, 5135–45.
- Wang, N., Gottesman, S., Willingham, M. C., Gottesman, M. M. and Maurizi, M. R.** (1993). A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11247–51.
- Wang, X. Z., Lawson, B., Brewer, J. W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L. J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L. M. and Ron, D.** (1996). Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4273–80.
- Wang, X., Zuo, X., Kucejova, B. and Chen, X. J.** (2008). Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1090–7.
- Weiss, C., Schneider, S., Wagner, E. F., Zhang, X., Seto, E. and Bohmann, D.** (2003). JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J.* **22**, 3686–95.
- Wek, S. A., Zhu, S. and Wek, R. C.** (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4497–506.

- Yamaguchi, H.** (2004). CHOP Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 45495–45502.
- Yamamoto, H., Momose, T., Yatsukawa, Y.-I., Ohshima, C., Ishikawa, D., Sato, T., Tamura, Y., Ohwa, Y. and Endo, T.** (2005). Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane. *FEBS Lett.* **579**, 507–11.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (2000). ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355–1364.
- Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S. G., Harding, H. P. and Ron, D.** (2004). Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J. Cell Sci.* **117**, 4055–66.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K.** (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741–9.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. and Mori, K.** (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6755–67.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K.** (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* **107**, 881–891.
- Zhai, P., Stanworth, C., Liu, S. and Silberg, J. J.** (2008). The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial hsp70 and regulates ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **283**, 26098–106.
- Zhang, K. and Kaufman, R. J.** (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455–62.
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V, Stasinopoulos, S., Ryan, M. T. and Hoogenraad, N. J.** (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* **21**, 4411–9.

* označuje sekundární citace