

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory (B3912)

Studijní obor: BMOBIBO (1515R011)



David Lorenc

Úloha tyrozinové fosforylace a tyrozinových kináz v mitochondriích
The role of tyrosine phosphorylation and tyrosine kinases in mitochondria

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D., za všechny rady a pomoc, které mi při psaní práce poskytl.

Prohlášení:

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

V Praze dne 12. 8. 2021

Abstrakt

Mitochondrie je zásadní organelou energetického metabolismu buňky. Jsou zde dále zpracovávány produkty glykolýzy v citrátovém cyklu, a vznikající redukované formy koenzymů jsou regenerovány v dýchacím řetězci. Kromě toho je tato síť enzymů využívána k tvorbě intermediátů metabolismu aminokyselin, mastných kyselina a dalších stavebních prvků buňky. Není zanedbatelná ani funkce mitochondriální signalizace v širším kontextu buňky, například v zprostředkování apoptózy. Mnoho z těchto jejích proteinů může být regulováno tyrosinovou fosforylací, s možností přeprogramování organely, potažmo celé buňky. Důsledky mohou být změny z respirace k preferenci fermentace, inhibici apoptózy nebo zvýšení produkce kyslíkových radikálů. Takové fenotypy jsou charakteristické pro nádorové buňky, přičemž je známo že mutace v genech pro tyrosinové kinázy jsou mnohdy příčinou jejich výskytu. Shrnutí funkce a vlivu tyrosinové fosforylace na mitochondriální proteiny jako takové a následně v kontextu metabolismu a organizace mitochondrií jsou tématem této práce.

Klíčová slova: tyrosinová fosforylace, mitochondrie, tyrosinové kinázy, nádorové bujení, apoptóza, Warburgův efekt, elektron transportní systém, Src, EGFR

Abstract

Mitochondrion is an essential organelle contributing to energetic metabolism of cell. Products of glycolysis are processed there in citric acid cycle and the forming reduced coenzyme compounds are regenerated there in electron transport chain. On top of that this network of enzymes is used for synthesis of metabolic intermediates of amino acids, fatty acids and more cellular building blocks. Mitochondria also play a role in cellular signaling, e.g. in apoptosis. Many of mitochondrial proteins can be modulated by tyrosine phosphorylation, with possibility of reprogramming the organelle, or even the whole cell. Consequences can be a preference for fermentation over respiration, inhibition of apoptosis or increase of reactive oxygen species formation. Such phenotypes are characteristic for cancer cells, and it is known that mutations in tyrosine kinases are often the cause of their occurrence. Summary of function and influence of tyrosine phosphorylation on mitochondrial proteins themselves, or in the context of metabolism and organization of mitochondria are the topic of this thesis.

Key words: tyrosine phosphorylation, mitochondrion, tyrosine kinases, tumor growth, apoptosis, Warburg effect, electron transport system, Src, EGFR

Seznam zkratek

- EGF – epidermal growth factor
- FASN – fatty acid synthase
- FGFR1 – Fibroblast growth factor receptor 1
- HTLV-1 - human T-cell leukaemia virus type 1
- HSP 90 – heat shock protein 90
- IPS1 – Interferon beta promoter stimulator protein 1
- OSCP – oligomycin sensitivity conferral protein
- PTPD1 – Protein-tyrosine phosphatase D1
- PKC δ – protein kináza C typu delta
- Mfn1 – Mitofusin-1
- NF- κ B – nuclear factor kappa B
- OPA1 – optical atrophy protein
- TNF – tumor necrosis factor
- SH – Src homology
- Yx – tyrosin na poloze o čísle x

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Tyrosinové kinázy	4
2.1	Evoluční původ tyrosinových kináz.....	4
2.2	Nereceptorové tyrosinové kinázy	4
2.2.1	Kinázy rodiny Src	5
2.2.2	Regulace kináz rodiny Src.....	6
2.2.3	c-Abl.....	8
2.2.4	Csk.....	8
2.2.5	Jak2	9
2.3	Receptorové tyrosinové kinázy	10
2.3.1	EGF receptory.....	11
2.3.2	TrkA	13
3.	Adaptorové proteiny.....	15
3.1	A-kinase anchor protein 1(AKAP1)	15
3.2	Docking protein 4 (Dok-4).....	16
3.3	p13.....	16
4.	Mitochondriální proteiny fosforylované na tyrosinu	17
4.1	Pyruvát dehydrogenázový komplex (PDC).....	17
4.1.1	Pyruvát dehydrogenáza podjednotka α (PDHA1)	17
4.1.2	Fosfatáza pyruvát dehydrogenázy (PDP1)	18
4.1.3	Kináza pyruvát dehydrogenázy (PDHK)	19
4.2	Elektron transportní systém.....	19
4.2.1	NADH dehydrogenáza (Komplex I)	20
4.2.2	Sukcinát-ubichinon reduktáza (Komplex II)	20
4.2.3	Ubichinon cytochrom c oxidoreduktáza(Komplex III).....	21
4.2.4	Cytochrom C.....	21
4.2.5	Cytochrom C oxidáza (COX, Komplex IV).....	22

4.2.6	ATP syntáza.....	23
4.3	Ostatní mitochondriální proteiny.....	24
4.3.1	Acetyl koenzym A transferáza (Acat1).....	24
4.3.2	Adenin nucleotid translokáza (ANT).....	24
4.3.3	Mitochondriální jaderný retrográdní regulátor 1(MNRR1).....	25
4.3.4	NADH oxidáza 4 (NOX4).....	25
4.3.5	Telomerázová reverzní transkriptáza (TERT).....	25
4.3.6	Single strand DNA binding protein (SSB).....	26
4.3.7	Glutamináza (GLS).....	26
4.3.8	Heat shock protein 60 (Hsp60).....	27
5.	Závěr.....	28
6.	Použitá literatura.....	29

1. Úvod

Proteinová fosforylace patří mezi nejvýznamnější post-translační modifikace, pomocí níž je možné regulovat aktivitu enzymů, zprostředkovávat asociaci proteinů do komplexu a podílet se na přenosu signálu, řídit genovou expresi nebo se podílet na struktuře proteinu. Jedná se o reakci, při které je přesunut γ fosfát z ATP na -OH skupinu aminokyselinového zbytku. Enzymy, které katalyzují tuto reakci, se nazývají kinázy, aktivitu v opačném směru vyvíjejí fosfatázy, které štěpí esterovou vazbu fosfoaminokyselinového zbytku. Fosforylace je tudíž reverzibilní.

Kolem 30 % všech proteinů může být tímto způsobem modifikováno, přičemž aminokyseliny, které mohou kovalentně navázat fosfát, jsou v drtivé většina serin threonin a tyrosin. Proteiny mohou být fosforylované na více místech a různými kinázami. Vliv fosforylace může být jak inhibiční tak aktivační, signalizace z různých drah se tak může velmi komplexně ovlivňovat a dovoluje buňce provádět drobné reakce na podněty.

Serin a threonin jsou fosforylovány společnými kinázami, zatímco tyrosin je fosforylován vlastním souborem kináz. V lidském genomu bylo objeveno víc jak 500 kódovaných kináz, přičemž cca 90 z nich jsou tyrosin kinázy, které tvoří vlastní větev v superrodině proteinových kináz (Manning 2002), a lze je funkčně rozdělit na nereceptorové tyrosinové kinázy a receptorové tyrosinové kinázy.

Serin/threoninová a tyrosinová fosforylace mají odlišnou dynamiku svého výskytu. Tyrosinová fosforylace má obvykle kratší trvání, protože je rychle zvrácena aktivitou protein tyrosinových fosfatáz (Tonks and Neel 2001). Funguje jako „přepínač“ různých fyziologických procesů, a většinou k ní dochází jen v závislosti na konkrétních stimulech. Fosfotyrosin na rozdíl od fosforylovaných Ser/Thr zřídka plní strukturní funkci v proteinech, jeho funkce je zpravidla regulační. Naopak často plní funkci prostředníka asociace proteinových komplexů, má vyšší afinitu ke specifickým vazebným doménám než fosforylovaný Ser/Thr, a je tak pro něj typická tvorba „lešení“ pro přenos signálu (Hunter 2009). Z těchto důvodů bývá v klidovém stavu v buňce tyrosin fosforylováno méně než 1 % fosfoproteomu (Humphrey, James, and Mann 2015).

Krátce po objevení proteinové fosforylace se ukázalo, že deregulace její fyziologické míry může vést k závažným patologiím. K deregulaci proteinové fosforylace může docházet změnou genové exprese, fúzi nebo delecí v genech kináz anebo obdobnými změnami u jejich regulačních faktorů. To vše může vést k vzniku nádorového bujení, přičemž tyrosinové kinázy

nejsou jedinou, byť nejvýznamnější větví superhrdiny proteinových kináz, které se na tomto procesu podílí. Důvodem je pravděpodobně jejich význam v regulaci růstu (Aaronson 1991), zprostředkování buněčné motility (Hsia et al. 2003; Carragher et al. 2001) a možností přeprogramovat buněčný metabolismus (Ward and Thompson 2012).

Studium fenotypů nádorových buněk ukázalo častou tendenci k přesunu těžiště energetického metabolismu na glykolýzu a fermentaci a zároveň inhibici aerobního metabolismu pravděpodobně v souvislosti se změnou tkáňového uspořádání nádoru. Přirozeně se zvyšuje spotřeba glukózy a tvorba laktátu. Souhrnně jsou takové fenotypové projevy označovány jako Warburgův jev (Warburg, Wind, and Negelein 1927). Zásadní význam má pak přeprogramování metabolické aktivity v mitochondrii.

Mitochondrie jsou organely se zásadním významem pro energetický metabolismus buňky. Jedná se o organelu s vnější a vnitřní membránou, vnitřní prostor se nazývá matrix. Probíhá v ní Citrátový cyklus, kde je zpracováván acetyl koenzym A, jehož výstupem jsou redukované koenzymy jejichž regenerace v elektron transportním řetězci vytváří gradient H^+ na opačných stranách vnitřní membrány, který je finálně přeměněn na ATP. K dokončení přenosu elektronu je zapotřebí přítomnost kyslíku, přičemž dochází k vzniku vody (Schéma 1).

Role „elektárny“ buňky není však jediná funkce mitochondrií. Intermediáty Citrátového cyklu jsou nezbytné pro syntézu organických molekul jako jsou některé neesenciální aminokyseliny, mastné kyseliny a ketolátky. Má také funkci ve vápníkové signalizaci (Pozzan, Magalhães, and Rizzuto 2000), a dále je klíčovým činitelem v endogenní apoptóze. Samotná koncentrace Ca^{2+} v mitochondrii se podílí na tvorbě PTP póru, působí jejich bobtnání a narušení integrity (Bernardi et al. 1999). Uvolnění cytochromu C do cytosolu, regulováno rovnováhou pro apoptotických (např. Bak, Bax a Bid) a anti-apoptotických (např. Bcl-2 a Bcl-XL) faktorů (Ola, Nawaz, and Ahsan 2011; Burlacu 2003), je prvním krokem v endogenní apoptóze. Obecně dysfunkce mitochondrií posouvá buňku spíše k apoptóze, avšak v poslední době se ukazuje, že dysfunkce menšího rozsahu může naopak spustit signalizaci pro spuštění mechanismů přežívání buňky (Guerra et al. 2017)

Tyrosinová fosforylace se v posledních dekáдах ukázala jako podstatný faktor v regulaci mnohých mitochondriálních procesů souvisejících s energetickým metabolismem, apoptózou, organizací mitochondrií v buňce a retrogradní signalizací. Tato práce by měla shrnout, jaké tyrosinové kinázy působí v mitochondriálních kompartmentech, jak se do nich dostávají, popř. které faktory to zprostředkovávají. Dále shrnout proteiny, které jsou jimi fosforylovány, místa fosforylace a jejich signifikanci.

Mitochondriální kompartmenty a hlavní procesy energetického metabolismu

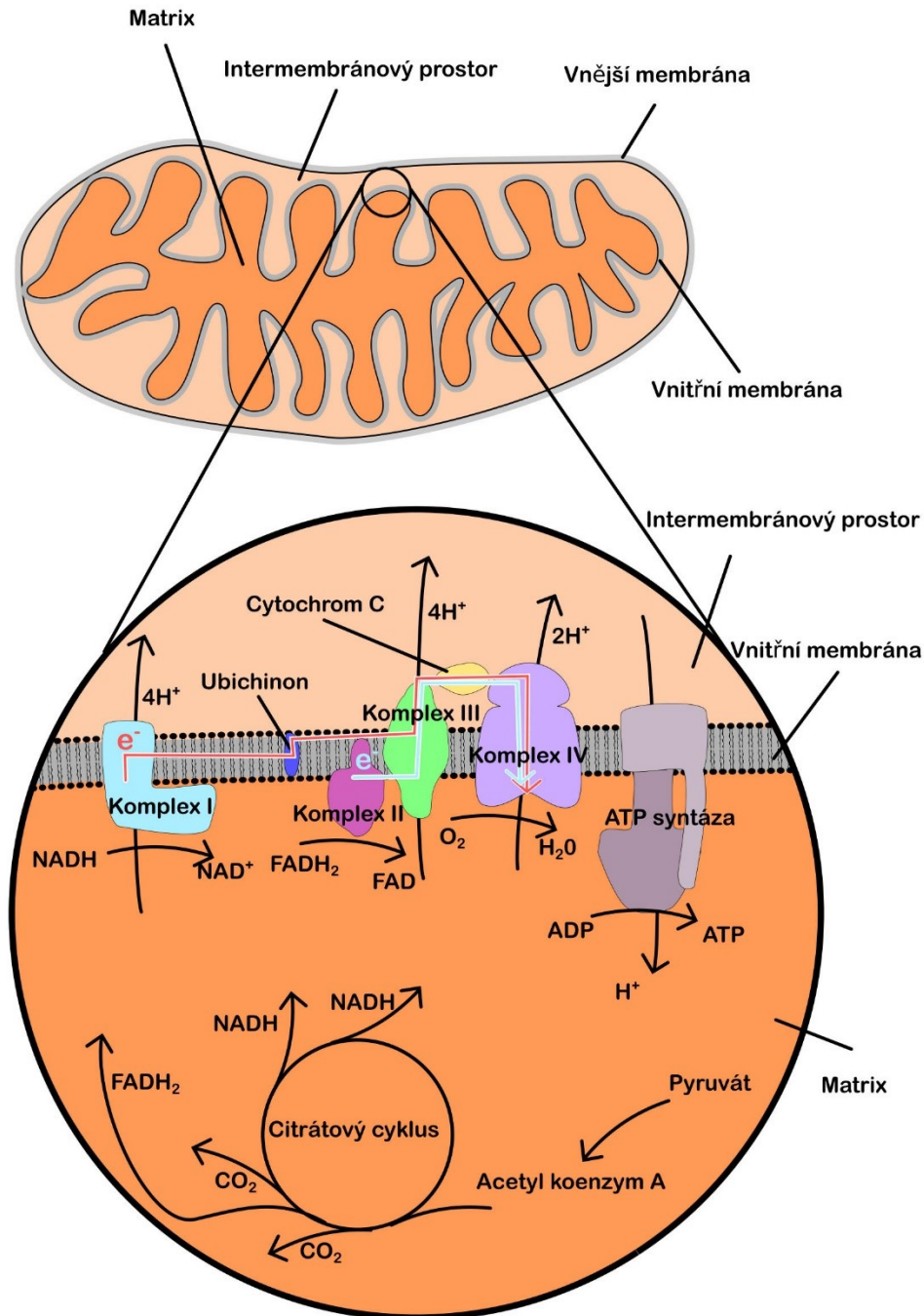


Schéma 1 Schématický náčrt kompartmentů mitochondrií a hlavních procesů energetického metabolismu uvnitř.
Zdroj: vlastní.

2. Tyrosinové kinázy

2.1 Evoluční původ tyrosinových kináz

K rozvoji tyrosinových kináz, podle studie Pincus et al. 2008, došlo nejspíš u společných předků Metazoa a jejich sesterské skupiny Choanoflagellata. Obě skupiny sdílí jádro nejpůvodnějších tyrosinových kináz, které se podobají nereceptorovým tyrosinovým kinázám, jako například c-Src. Spolu s tyrosinovými kinázami došlo v obdobné míře i k rozvoji tyrosinových fosfatáz a domén vázajících fosfotyrosin, aby mohla být signalizace tyrosinovou fosforylací efektivně regulována a signál převáděn k dalším členům signalizačních drah. Obě skupiny si také vyvinuly nezávisle na sobě rodiny kináz s unikátní architekturou, které nejsou u druhé skupiny. K evoluční radiaci tyrosinových kináz došlo v relativně rychlém sledu, organismy nejpříbuznější Metazoím a Choanoflagellatům jako kvasinky a hlenky nemají žádné tyrosinové kinázy, a jen pár tyrosinových fosfatáz a SH2 domén. Fosfatázy u nich slouží pravděpodobně hlavně k defosforylaci promiskuitně fosforylovaných tyrosinů Ser/Thr kinázami. Role tyrosinových kináz v mezibuněčné signalizaci a rozšíření buněčné informační sítě o nový způsob šíření signálu měly pravděpodobně nezanedbatelný význam ve vývoji mnohobuněčnosti živočišného typu (Pincus et al. 2008).

Tyrosinové kinázy jsou sekvenčně nejpříbuznější kinázám podobným tyrosinovým kinázám (tyrosine kinase-like, TKL) (Manning 2002), které se hojně vyskytují u *Dictyostelium discoideum* a byly popsány také u rostlin. Jsou zajímavé tím, že i když většina fosforyluje Ser/Thr, menšina z nich je schopna fosforylovat tyrosin, některé exkluzivně, jiné fosforylují zároveň i Ser/Thr (Goldberg et al. 2006).

2.2 Nereceptorové tyrosinové kinázy

Jejich kanonická funkce je zprostředkovávání signalizace v cytosolu, často přes vazbu na cytosolické domény receptorů jako jsou integriny, receptory spřažené s G proteiny, nebo receptorové tyrosinové kinázy. Mohou být upevněné na vnitřní straně plazmatické membrány skrze navázané mastné kyseliny. Až později byly objevené také v jádře a v mitochondriích.

2.2.1 Kinázy rodiny Src

Většina kináz rodiny Src má velmi podobnou strukturu. Budeme-li postupovat konvenčně od N k C-konci, nalezneme první SH4 doménu (SH = Src homology), unikátní doménu, SH3, SH2 a samotnou katalytickou protein kinázovou doménu.

SH4 je velmi krátká doména, má jen 15 aminokyselin. Její funkce tkví v určení membránové lokalizace (David-Pfeuty, Bagrodia, and Shalloway 1993). Pomocí kovalentně navázané myristové kyseliny (myristoylace) kotví příslušný protein v membráně. Molekuly Src kináz se ale vyskytují i volně difundující (Kaplan et al. 1988). K připojení myristové kyseliny dochází kotranslačně (Buss, Kamps, and Sefton 1984). Ukotvení Src kináz k membráně může být ještě posíleno buďto bazickými aminokyselinovými zbytky v SH3 a unikátní doméně (u c-Src a Blk) nebo reversibilním navázáním palmitové kyseliny (Robbins, Quintrell, and Bishop 1995) Připojení k membráně může být zásadní pro průběh signalizace (Spencer et al. 1995).

Doména SH3 má délku cca 50 aminokyselin, je schopná vázat proteinovou sekvenci s vysokým výskytem prolinu, s konzervovaně se vyskytujícím motivem Prolin – X – X – Prolin (X může být jakákoli aminokyselina). Podle kontextu okolí může být sekvence vázána oběma směry (Lichtarge, Bourne, and Cohen 1996). Doména SH2 váže proteinovou sekvenci s výskytem fosfotyrosinu, přičemž specificita je dále zvýšena okolní sekvencí a hlavně +3 zbytkem, který je nejčastěji leucin (Zhou et al. 1993). Mezi SH2 a protein kinázovou doménou se nachází zhruba 20 aminokyselin dlouhý linker, který má významnou úlohu v regulaci kinázy Src.

Kinázová doména Src se skládá ze dvou laloků, mezi nimiž se nachází aktivní místo, kde probíhá katalýza fosforylace tyrosinu. Část blíže k N-konci je menší a skládá se převážně z β -listů, zajišťuje vazbu ATP, část blíže C-konci se naopak skládá spíše z α -helixů a její funkce je vázat substrát. Oba laloky mají mezi sebou určitou flexibilitu a mohou zvětšovat či uzavírat štěrbinu, kde se nachází aktivní místo kinázy. Pro výměnu ADP za ATP je potřeba otevřenější konformace, pro katalýzu reakce je třeba uzavřenější, kdy jsou substrát i ATP blízko u sobě. Na C-konci se nachází neuspořádaná doména, kde se nachází tyrosin 527 (Y527), který se podílí na regulaci (Xu et al. 1999; Sicheri, Moarefi, and Kuriyan 1997; Williams et al., n.d.)

2.2.2 Regulace kináz rodiny Src

Kinázy rodiny Src mají poměrně složitý a sofistikovaný systém autoregulace. Y527 a tyrosin 416 (Y416, číslování podle kuřecí c-Src) jsou zbytky, které mohou být fosforylovány, Y527 za účelem inhibice nebo Y416 za účelem stimulace aktivity kinázy.

Při fosforylaci Y527, který se nachází v C-koncové neuspořádané doméně, dochází k intramolekulární interakci s SH2 doménou, schopnou vázat fosfotyrosin. Touto interakcí se stabilizuje vazba SH2 na větší C-koncový lalok kinázové domény. Zároveň se změní pozice linkeru mezi SH2 a kinázovou doménou. Linker pak leží mezi menším N-koncovým lalokem a SH3 doménou a zprostředkovává jejich interakci (Schéma 2a). Části neuspořádaného linkeru se změní sekundární struktura na polyprolinový helix a váže se jako ligand na SH3 doménu. Tímto „sevřením“ dochází k narušení katalytického místa, konkrétně pohybem α C-helixu v C-koncovém laloku. Interakce s SH2 a SH3 doménami taky zabraňuje vzájemnému pohybu obou laloků kinázové domény, nutnému k průběhu katalýzy (Xu et al. 1999).

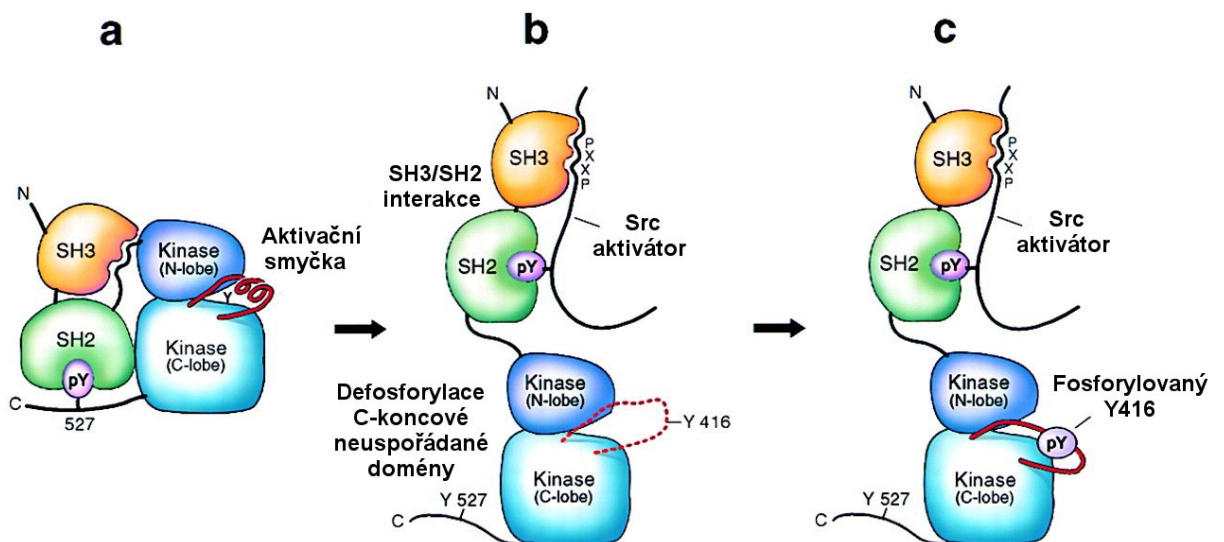


Schéma 2 a) Konformace Src kinázy v inaktivovaném stavu s 527 fosfotyrosinen asociovaném s SH2 doménou. b) Plně defosforylovaný stav c) Aktivovaný stav s fosforylovaným Y416. Převzato a upraveno z Xu et al. 1999.

Fosforylace na Y527 může být katalyzována kinázou Csk (C-terminal Src kinase)(Okada and Nakagawa 1989), která byla objevena i v mitochondriích (Salvi, Brunati, and Toninello 2005), tudíž je možné předpokládat její zásadní význam v regulaci krátkodobě trvající tyrosinové fosforylaci.

Fosforylace na Y416 naopak stabilizuje část C-koncového laloku kinázové domény zvanou aktivační smyčka, která je v místě katalýzy, a zajišťuje vázání substrátu (Schéma 2c). Primárně se jedná o transautofosforylaci (G. Sun et al. 2002).

Z kináz rodiny Src byly zatím v mitochondriích detekovány: c-Src, Fgr, Fyn a Lyn, Lck (Salvi, Brunati, and Toninello 2005; Salvi et al. 2002; Miyazaki et al. 2003).

2.2.2.1 *Fyn*

Při výzkumu fosforylace mitochondriálního translačního aparátu byla kináza Fyn objevena jako příčina tyrosinové fosforylace na proteinech komplexu mitochondriálního ribozomu, bez detailů konkrétních míst a významu. Dále byla objevena souvislost mezi snížením exprese Fyn kinázy, po jejím knock downu pomocí siRNA, a sníženou syntézou mitochondriálně kódovaných podjednotek elektronového transportního systému (ETS). Také bylo objeveno, že Fyn kinázy asociují s ribozomálními proteiny. Fyn kináza má tedy velmi pravděpodobně funkci v regulaci mitochondriální proteosyntézy (Koc, Miller-Lee, and Koc 2017)

2.2.2.2 *Lyn*

Význam kinázy Lyn ve fyziologii mitochondrií byl popsán při regeneraci krysí jaterní tkáně po parciální hepatektomii. V rozmezí 24 – 36 hodin po zákroku byla Lyn zaznamenána v intermembránovém prostoru, kam translokovala z cytoplazmatické membrány, kde se její množství naopak snížilo. Kináza byla v aktivovaném stavu, tedy fosforylována na tyrosinu 396 (ekvivalent Y416), a v komplexu s dalšími, neidentifikovanými proteiny, které pravděpodobně zprostředkovaly její translokaci. Její vliv byl zásadní pro udržení integrity membrány během prereplikační fáze G1 buněčného cyklu, kdy se v buňce vyskytuje vysoká koncentrace Ca^{2+} , ROS (reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku) a dochází k celkovému snížení metabolismu mitochondrií. Fosforylace mitochondriálních proteinů zprostředkovaná Lyn kinázou také zapříčinila vyšší membránový potenciál mitochondrií a zvýšila produkci ATP. Tento vliv byl výrazně potlačen aktivitou fosfatáz, jejichž inhibitory byly využity při výzkumu pro zvýraznění funkce Lyn (Gringeri et al. 2010).

Jeden z popsaných mechanismů lokalizace Lyn v mitochondrii je její interakce s proteinem vrozené imunity RIG-1, cytosolickým receptorem virálních RNA (Takeuchi and Akira 2008) a jeho adaptorem IPS-1, který se nachází ve vnější mitochondriální membráně a spolu s dalšími faktory zprostředkovává zánětlivou odpověď. Lyn je translokovaná na vnější mitochondriální membránu, kde tvoří s RIG-1 a IPS-1 komplex. Také je zde neznámým prostředníkem fosforylována na aktivačním tyrosinu 396. Přítomnost Lyn kinázy na vnější

mitochondriální membráně, pozitivně reguluje tvorbu anti-virálních INF- β cytokinů. Tento mechanismus byl popsán u myších makrofágu (Lim et al. 2015).

2.2.3 *c-Abl*

Tyrosinová kináza vyskytující se primárně v jádře a cytosolu. Její nejvíce prozkoumaná funkce je reakce na buněčný stress, poškozenou DNA, a její následná účast na zastavení buněčného cyklu či apoptóze. Bylo objeveno, že se může podílet také na opravě DNA nebo organizaci cytoskeletu. Stejně jako kinázy rodiny Src obsahuje SH3, SH2 a kinázovou doménu, avšak má unikátní C-konec s třemi jadernými lokalizačními signály a doménu bohatou na prolin, schopnou vázat SH3 doménu, DNA vazebnou doménu a doménu schopnou vázat F a G-aktin (Kharbanda et al. 1998). Může dojít k balancované reciproké chromozomální translokaci, při které vzniká takzvaný Filadelfský chromozóm, přičemž je gen *c-Abl* fúzován s genem *BCR*. Tak vzniká konstitutivně aktivní kináza *BCR-Abl*, která má zásadní roli v chronické myeloidní leukémii (Quintás-Cardama and Cortes 2006).

K její mitochondriální lokalizaci dochází v souvislosti se zvýšeným výskytem ROS, tento přesun je navíc zprostředkován PKC δ , Ser/Thr kinázou, přičemž vliv *c-Abl* na fyziologii mitochondrií se projevuje snížením membránového potenciálu a úbytkem ATP, jev zpravidla spojený s nekrozou (Kumar et al. 2001). Jako další signál k lokalizaci v mitochondrii může sloužit stres v endoplazmatickém retikulu (ER) způsobený zvýšeným množstvím špatně sbalených proteinů nebo rozhozením Ca²⁺ homeostázy. Určitá frakce *c-Abl* je lokalizována v ER a při zvýšeném buněčném stresu je přesunuta do mitochondrií. Zároveň s přesunem *c-Abl* dochází k uvolnění cytochromu C z mitochondrií, což je prvním krokem v endogenní, mitochondriemi zprostředkované apoptóze (Ito et al. 2001).

2.2.4 *Csk*

C-terminal Src kináza je jedním z hlavních regulátorů rodiny Src kináz, byla objevena translokovaná v mitochondriích v jedné z prvních studií zaměřujících se na toto téma (Salvi et al. 2002). Fosforyluje kinázy rodiny Src na Y527 a jeho ekvivalentech a inhibuje jejich aktivitu změnou konformace, což se projevuje snížením V_{max} (Okada and Nakagawa 1989). Kinázy rodiny Src však mohou předejít inhibici autofosforylací Y416 a jeho ekvivalentů na kinázové doméně, což zabraňuje inhibiční vazbě mezi fosforylovaným Y527 a SH2 doménou (Gongqin Sun, Sharma, and Budde 1998).

Skládá se z homologů domén SH2, SH3 a kinázové domény, ale nemá jako kinázy rodiny Src aktivační tyrosinový zbytek na aktivační smyčce kinázové domény. Dvě konektorové oblasti, první mezi SH3 a SH2 a druhá mezi SH2 a kinázovou doménou, mohou interagovat s kinázovou doménou a tím ji aktivovat (Ogawa et al. 2002).

2.2.5 *Jak2*

Má významnou úlohu v převodu signálu v cytoplazmě, kde se váže na receptory hormonů jako prolaktin nebo růstový hormon (Growth hormon, GHR), nebo na receptory cytokinů z rodiny interferonů. Fosforylací tyrosinů na receptorech tvoří místa pro asociaci proteinů rodiny STAT s receptory, které po vazbě kináza JAK2 také fosforyluje na tyrosinech. Takto fosforylované proteiny rodiny STAT tvoří dimery, nebo heterodimery a vstupují do jádra, kde regulují transkripci (Sakatsume et al. 1995; Berry et al. 2011). Přesto byla kináza JAK2 objevena i v mitochondriální matrix, kde se podílí na regulaci pyruvát dehydrogenázového komplexu.

2.3 Receptorové tyrosinové kinázy

Receptorové tyrosinové kinázy (RTK) se zpravidla vyskytují na povrchu buněk a zprostředkovávají signalizaci do buňky po stimulaci extracelulárními ligandy, jako jsou ligandy rodiny EGF. RTK vážou ligandy jako diméry (Schéma 3), čímž se aktivují kinázové domény a následně se transfosforylují (Ullrich and Schlessinger 1990) a vytvářejí místa pro vázání proteinů a adapterů, slouží jako „lešení“, které zprostředkovává přenos signálu. Jejich obecná struktura od N-konce je následující: extracelulární oblast ligand vázajících domén, integrální membránová doména a kinázová doména v cytosolu na C-konci, přičemž jednotlivé rodiny mají výrazně odlišné, tak kinázové domény (Lemmon and Schlessinger 2010).

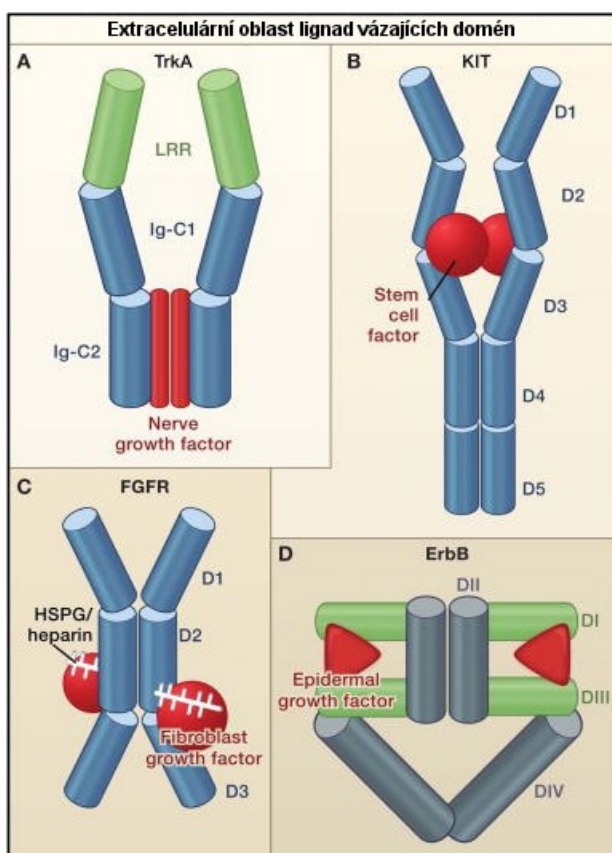


Schéma 3 Ilustrace mechanismu vazby ligandů do extracelulárních oblastí receptorových tyrosinových kináz. Ze schéma je patrný rozdíl mezi dimerizací s místem kontaktu zprostředkovaným ligandy u TrkA a proteinem zprostředkovaným kontaktem u rodiny EGF receptorů nebo FGFR. Epidermal growth factor (EGF) – epidermální růstový faktor; Stem cell factor – faktor kmenových buněk; Fibroblast growth factor – vazivový růstový faktor; Nerve growth factor – nervový růstový faktor. Převzato a upraveno z Lemmon and Schlessinger 2010.

2.3.1 EGF receptory

Jsou také známy jako ErbB/HER rodina, tvoří s ostatními RTK dané rodiny heterodimery. Kontakt mezi jednotkami je zprostředkován receptorem, ne ligandem (Garrett et al. 2002) Při vazbě ligandu dochází ke změně konformace EGF receptorů. Obě molekuly tvořící dimér či heterodimér mohou mít odlišné ligandy (Burgess et al. 2003). Díky této variabilitě mohou EGF receptory vést velmi diversifikované signály.

2.3.1.1 EGFR

Zvýšená exprese EGFR je přítomna u řady nádorů, často spolu s c-Src kinázou, přičemž je naznačena možnost jejich vzájemné stimulace. Fibroblasty se zvýšenou expresí obou kináz měly zrychlenou syntézu DNA, rychleji rostly na agaru i v laboratorních myších. EGFR je fosforylována c-Src na tyrosinu 845, v místě aktivní smyčky kinázové domény, s významným vlivem zvýšení rychlosti katalýzy (Biscardi et al. 1999).

Jako jeden z cílů synergistického působení obou kináz po stimulaci hormonem EGF byla objevena CoxII podjednotka cytochrom C oxidázy (COX) ve vnitřní mitochondriální membráně, kde dochází k její fosforylaci na neurčeném tyrosinovém zbytku. Fosforylace má za důsledek snížení aktivity ETS o 60 %. Předchází jí dosud plně nepochopený mechanismus translokace EGFR spolu s c-Src do vnější mitochondriální membrány. Ve struktuře byla však na rozdíl od c-Src objevena mitochondriální lokalizační sekvence. Pro objevenou závislost translokace na klatrinu byla navržena možnost endocytózy, avšak je jen málo a neprozkoumaných proteinů ve vnější mitochondriální membráně schopných zprostředkovat splynutí membrán (Demory et al. 2009).

Další objevené funkce EGFR v mitochondriích byla stimulace reorganizace mitochondrií skrze zrychlené dělení a podpora buněčné motility a tvorba metastází v nemalobuněčném karcinomu plic (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) Na rozdíl k předchozí studii v tomto případě dochází k celkovému zvýšení produkce ATP. Mechanismus za těmito efekty je interakce EGFR s Mfn1 – faktorem pro fúzi mitochondrií. Tato interakce pravděpodobně zeslabuje schopnost Mfn1 polymerizovat a spouštět fúzi mitochondrií (Che et al. 2015).

Opačný efekt podpory fúze mitochondrií nastává při interakci mitochondriálního EGFR s palmitátem, který je v nadbytku de novo syntetizován proteinem FASN. Ten je stimulován EGFR na plazmatické membráně, přičemž tvoří aktivní homodimer. Následně je mitochondriální EGFR, palmitoylován neznámým mechanismem na cysteinovém zbytku,

interaguje svou cytosolickou doménou s prohibitinem 2 (PHB2) a zvyšuje jeho koncentraci, přičemž toto zvýšení závisí i na jeho kinázové aktivitě. PHB2 je pleiotropní protein, vyskytující se v různých buněčných kompartmentech, má roli v signalizaci jako transkripční faktor nebo chaperone. Jeho chaperonová aktivita je přitom zásadní pro zabránění proteolytické degradace OPA1, GTPázy podporující mitochondriální fúzi (Ishihara et al. 2006). Koncentrace obou proteinů byla při knockdownu EGFR snížena. Celý proces je opět stimulován hormonem EGF (Schéma 4) (Bollu et al. 2014). Obě předchozí studie jdou v jistém smyslu proti sobě a pravděpodobně existují další činitelé nebo interakce, které oba jevy regulují a drží v rovnováze.

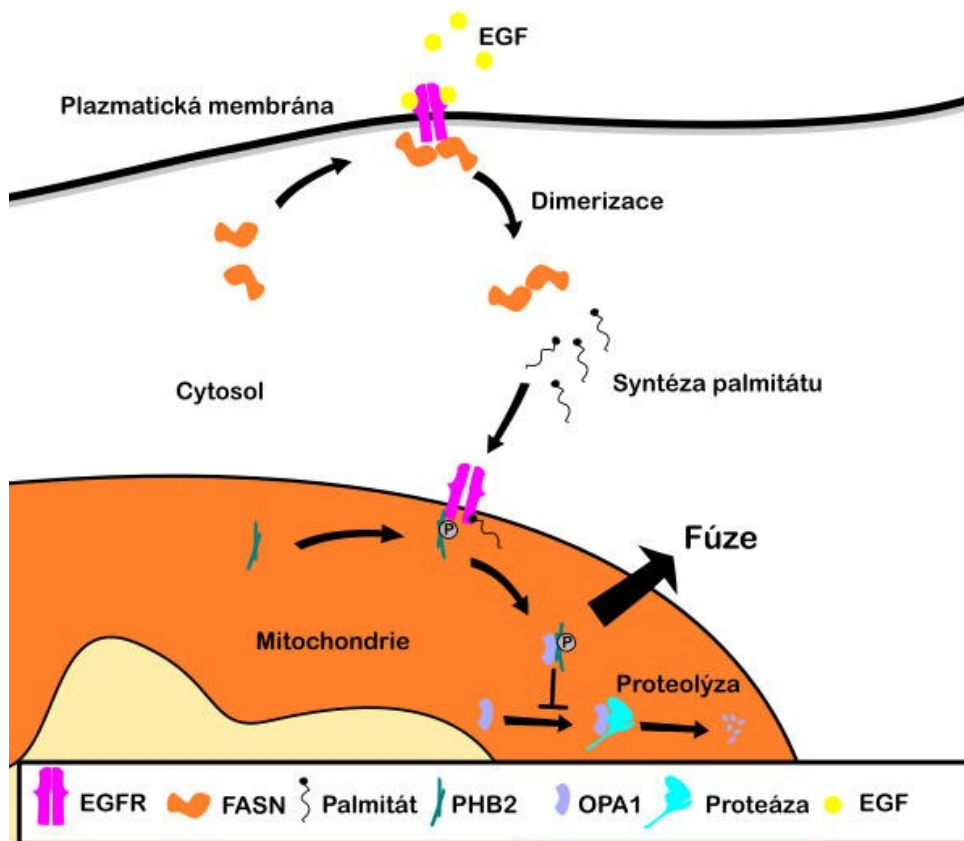


Schéma 4 Ilustrace regulace mitochondriální dynamiky v závislosti na EGF skrze de novo tvorbu palmitátu. Zdroj: vlastní.

Lokalizace EGFR na vnější membránu mitochondrií může být také iniciována vystavením myoblastů nízkým koncentracím arzénu. Podobně, jak bylo popsáno ve studii Demory et al., došlo k interakci s Cox II podjednotkou COX, a kromě toho také ke zvýšení tvorby ROS a zvýšení membránového potenciálu mitochondrií.

Nejvýznamnějším vlivem arsenem stimulované aktivity EGFR byla však zvýšená hladina jaderného cyclinu D1, proteinu, účastnícího se na regulaci buněčného cyklu podporou přechodu z G1 do S fáze. Jeho zvýšenou expresí dochází k proliferaci myoblastů na úkor jejich

diferenciace. Regulace cyclinu D1 může záviset na tvorbě ROS v mitochondriích zvýšené působením EGFR (Cheikhi et al. 2020).

2.3.1.2 *ErbB2*

Neváže sám o sobě žádné ligandy, ale působí jako koreceptor s ostatními RTK z rodiny EGF receptorů. Přitom je tvorba heterodimeru s ErbB2 dokonce upřednostňována ostatními RTK z rodiny EGF receptorů (Graus-Porta et al. 1997). V heterodimerech zesiluje signalizaci rodiny EGF receptorů a je zásadní pro přenos určitých signálů (Beerli et al. 1995). Může být také onkogenem v různých typech nádorů (Slamon and Clark 1988).

Bylo objeveno, že i za fyziologických podmínek se nachází v mitochondriích, její translokaci zprostředkovává mitochondriální Hsp70, přitom je také nezbytná mitochondriální lokalizační sekvence. Míra translokace je úměrná kinázové aktivitě ErbB2, mutanta se zvýšenou kinázovou aktivitou se vyskytovala v mitochondriích ve větším množství, mutanty se sníženou kinázovou aktivitou naopak ubylo. Samotný efekt zvýšené exprese ErbB2 se projevoval snížením příjmu O₂ a zeslabením aktivity ETS, snížením ATP/ADP poměru a membránového potenciálu mitochondrií. Naopak příjem glukózy byl zvýšen. ErbB2 asociuje s COX II podjednotkou, kterou inhibuje, přičemž míra inhibice roste s velikostí kinázové aktivity, podobě jako v některých případech u EGFR (Ding et al. 2012).

2.3.1.3 *ErbB4*

Paradoxní člen rodiny ErbB, na rozdíl od ostatních jeho aktivita přispívá v nádorových buňkách k zastavení proliferace a aktivaci apoptózy (Sartor et al. 2001). Při stimulaci hormonem heregulin β 1 dochází k proteolýze ErbB4 na cytosolické straně γ -sekretázou. Vzniklý cytosolický fragment, nazývaný 4ICD, je následně translokován na vnější mitochondriální membránu, kde interaguje s proapoptotickým faktorem BAK, který aktivuje. 4ICD obsahuje BH3 doménu, díky které může k této asociaci dojít. K apoptóze následně dochází obvyklou endogenní cestou. K samotné interakci není potřeba kinázové aktivity ErbB4, byť má pravděpodobně roli v zprostředkování proteolýzy v cytoplazmě (Naresh et al. 2006).

2.3.2 *TrkA*

Patří mezi neurotrofinové receptory (Muragaki et al. 1995). Má popsanou úlohu v proliferaci a podpoře přežívání buněk (Freund and Frossard 2004; Wu et al. 2020), přičemž

v nepřítomnost signálu NGF může naopak mít roli v apoptóze (Feinberg et al. 2017). Obvykle se nachází v plazmatické membráně, bylo však objeveno, že spolu s p75NTR – členem rodiny tumor necrosis factor receptorů – je lokalizována do mitochondrií v buňkách lidských podocytů. Tam působí proti toxickým účinkům Ca^{2+} vedoucím k narušení mitochondriální integrity (Carito et al. 2012), což potvrzuje význam TrkA v přežívání buňky, neboť se jedná o antiapoptotický účinek.

TrkB, patřící do stejné rodiny kináz, byla také objevena v mitochondrii, ale její funkce zde nebyla určena (Wiedemann et al. 2006), přestože jsou známy případy, kdy signalizace přes tento receptor ovlivnila funkčnost mitochondrií (Chen et al. 2019).

Další RTK popsané v mitochondrii jsou FGFR1, FLT3 a HGFR. Jejich biologický význam je popsán u příslušných proteinů.

3. Adaptorové proteiny

Adaptorové proteiny jsou potřebné pro přesun a lokalizace některých kináz v mitochondriích, vzhledem k jejich časté nepřítomnosti mitochondriálních lokalizačních signálů. Bylo objeveno několik takových adaptorových proteinů, které asociují s kinázami rodiny Src. Jejich význam se zprostředkováním přesunu nekončí, podílí se i na regulaci aktivity asociovaných kináz a některé i sami interagují s mitochondriálními proteiny.

3.1 A-kinase anchor protein 1(AKAP1)

AKAP1 byl původně určen jako protein kotvící Ser/Thr kinázu PKA k různým buněčným kompartmentům. Pozdější výzkum v lidských tkáňových kulturách buněk ukázal, že je schopný vázat i další proteiny účastníci se signalizace, konkrétně c-Src a PTPD1. Ti jsou navázané s AKAP1 v komplexu, který se váže na vnější membránu mitochondrií. PTPD1 je fosfatáza, která katalyzuje aktivační defosforylaci Y527 na c-Src. Další důsledek tohoto přesunu je snížení transdukce EGF signálu do jádra, který je v nepřítomnosti AKAP1 stimulovaný společnou aktivitou PTPD1 a c-Src (Cardone et al. 2004). Samotný význam přesunu komplexu AKAP1-PTPD1-c-SRC spočívá ve fosforylaci cytochromu C oxidázy a zvýšení produkce ATP oxidativní fosforylací, zatímco při inhibici syntézy AKAP1 pomocí siRNA došlo k jejímu výraznému snížení (Livigni et al. 2006).

Další výzkum prokázal translokaci AKAP1 jen při normoxii, zatímco při hypoxii docházelo k degradaci AKAP1 zprostředkovanou ubiquitinací indukovanou ligázou Siah2, což vedlo k inhibici oxidativní fosforylace a snížení membránového potenciálu mitochondrií, nejspíš kvůli zadržení PTPD1 a c-Src v cytosolu (Carlucci et al. 2008). Tento mechanismus, objevený v kontextu ischemie, by mohl mít svou úlohu v přežívání při nízkých hladinách O₂, což je jev častý v nádorových tkáních.

AKAP1 byl také objeven v mitochondriální matrix, naznačující možný mechanismus translokace c-Src (Sardanelli et al. 2006)

3.2 Docking protein 4 (Dok-4)

Rodina proteinů Dok patří mezi adaptorové proteiny, některé jsou schopné vázat SH2 doménu, interagují s různými kinázami a mohou být fosforylované. Bylo objeveno, že Dok-4 zprostředkovává přesun c-Src do mitochondrií. Sám je do mitochondrií lokalizován skrze svou N-koncovou aminokyselinovou sekvenci a PTB doménu (phosphotyrosine binding domain).

PTB doména se vyskytuje u mnoha proteinů signálních drah, kde se účastní signalizace asociací s fosforylovanými tyrosiny a zprostředkovává přenos signálu (Bork and margolis 1995), podobně jako SH2 doména. Může také však sloužit k určení buněčné lokalizace, díky schopnosti podílet se na vazbě na membránu (Bedirian et al. 2004).

Lokalizaci c-Src za pomoci Dok-4 provází snížení exprese komplexu I ETS a zvýšená produkce ROS. To souvisí s dalšími funkcemi Dok-4, což je obohacení tvorby ROS zprostředkované cytokinem TNF- α a aktivace transkripčního faktoru NF- κ B. Pro významnou aktivaci NF- κ B byla nutná přítomnost c-Src (Itoh et al. 2005)

3.3 p13

Ke změnám v tyrosinové fosforylaci v mitochondrii nemusí docházet jen endogenně, nýbrž může být ovlivněna i jiným organismem. Doplnkový protein (accessory protein) p13 lidského T-buněčného lymfotropního viru typu 1 (HTLV-1) je schopný vázat SH3 doménu kináz c-Src, Lyn, Fyn a Fgr skrze svůj na prolin bohatý C-koncový motiv. Jako heterodimer zprostředkovává přesun kináz do intermembránového prostoru mitochondrií, kde výrazně stimuluje proteinovou fosforylaci. Kináza Lyn se pravděpodobně prostřednictvím p13 přesouvá do mitochondriálního matrix. Interakce p13 s kinázami rodiny Src také ruší patologické příznaky infekce p13, vyznačující se produkcí ROS a snížením potenciálu vnitřní mitochondriální membrány (Tibaldi et al. 2011).

4. Mitochondriální proteiny fosforylované na tyrosinu

4.1 Pyruvát dehydrogenázový komplex (PDC)

Význam komplexu v energetickém metabolismu je přeměna pyruvátu na acetyl koenzym A, který vstupuje do Citrátového cyklu, kde je dále zpracováván a slouží jako substrát pro redukci koenzymů. Jedná se o rychlost určující krok aerobního metabolismu eukaryotické buňky. Proto má jeho regulace zásadní význam v přepnutí závislosti metabolismu z oxidační fosforylace na aerobní glykolýzu a fermentaci.

4.1.1 *Pyruvát dehydrogenáza podjednotka α (PDHA1)*

Dvě kopie PDHA 1 spolu s dvěma β podjednotkami tvoří heterotetramer E1 – komponent PDC. E1 katalyzuje dekarboxylaci pyruvátu a redukční acetylaci lipoylové skupiny ostatních podjednotek PDC. Obě poloviny vážou vlastní thiamin pyrofosfát (TPP) a iont Mg^{2+} ve svém aktivním místě. PDHA1 váže Mg^{2+} a pyrofosfátovou část TPP (Kato et al. 2008).

Bylo objeveno, že PDHA1 je fosforylována na tyrosinu 301 (Y301). Bylo zjištěno, že buňky s nahrazeným Y301 za fenylalanin mají zvýšený obrat pyruvátu a sníženou produkci laktátu za normoxie a hůře se adaptují za hypoxie na glykolýzu, což se projevuje sníženou produkcí ATP. Y301 se nachází blízko aktivního místa enzymu a jeho fosforylace blokuje vazbu substrátu. Jedná se o stejný mechanismus jako inhibice fosforylací na serinu 293, avšak nijak spolu nesouvisí a defekt v jednom neovlivní druhý. Kinázy, které tuto fosforylací katalyzují, jsou BCR-ABL, FLT3, JAK2 (Fan, Kang, et al. 2014).

Možnosti posttranslačních modifikací PDHA1 však tímto nekončí, také tyrosin 289 (Y289) může být fosforylován c-Src kinázou s podobnými projevy jako předchozí modifikace. Bylo prokázáno, že PDHA1 má sníženou schopnost zpracovávat pyruvát, a tím snižuje tvorbu ROS, zvyšuje odolnost buňky proti oxidačnímu stresu a snižuje spotřebu kyslíku. Y289 se nachází v blízkosti argininu 288, který se významně podílí na ukotvení koenzymu TPP, nutného k dekarboxylaci pyruvátu. Bylo navrženo, že fosforylací Y289 nastane sterický střet s aspartátem 315, a následnou lokální reorganizací bude narušeno vázání TPP a oslabena katalytická aktivita (Jin et al. 2016).

4.1.2 Fosfatáza pyruvát dehydrogenázy (PDP1)

PDP1 je upstream regulována fosforylací na tyrosinu 381 (Y381). Její fosforylace vede k disociaci enzymu sirtuin 3 – deacetylasy – z komplexu PDP1 a PDC. Místo něho se do komplexu váže acetyl koenzym A transferáza (ACAT1), která acetyluje PDP1 na lysinu 202, čímž způsobí jeho disociaci. ACAT1 dále acetyluje PDHA1 na lysinu 321, což vede k připojení PDHK, fosforylaci serinových zbytků PDH, hlavně na serinu 293, a následnou inhibici PDHA1 (Schéma 5). Tento případ zajímavě demonstuje spřažení různých mechanismů posttranlačních modifikací v regulaci jednoho proteinového komplexu. Jako původci fosforylace Y381 byly identifikovány mnohé mitochondriální tyrosinové kinázy, mezi které patří JAK2, FLT3, FGFR1 a EGFR (Fan, Shan, Kang, Elf, Xie, Tucker, Gu, Aguiar, Lonning, Chen, Mohammadi, Britton, Garcia, Alečković, Kang, Kaluz, Devi, Van Meir, et al. 2014).

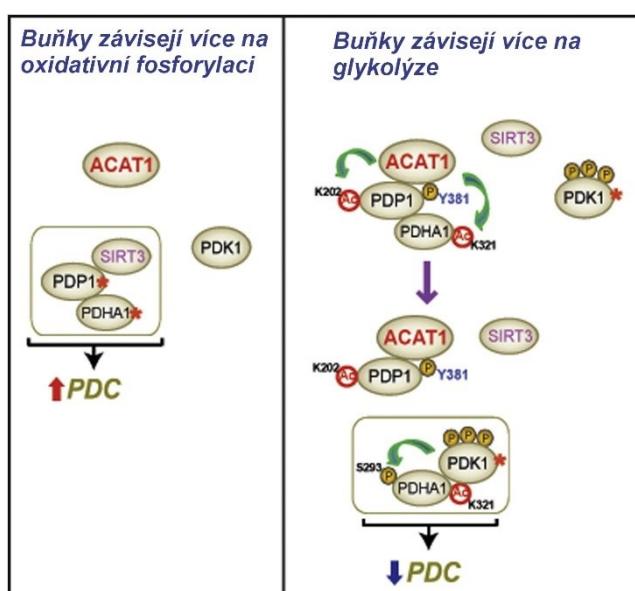


Schéma 5 Regulace PDP1 na tyrosinu 381. PDP1 (Pyruvát dehydrogenázová fosfatáza), PDK1 (Pyruvát dehydrogenázová kináza), SIRT3(Sirtuin 3), ACAT1(Acetyl koenzym A transferáza), PDHA1(pyruvát dehydrogenáza podjednotka α). Převzato z Fan et al. 2014.

PDP1 může být inhibována také fosforylací na tyrosinu 94 (Y94), kdy fosfotyrosin brání v připojení na kyselinu lipoovou, která je kovalentně vázaná na L2 podjednotku E2. Tato interakce je významná v tvorbě stabilního komplexu s E2 a následné katalytické aktivitě, přičemž je také závislá na přítomnosti Ca^{2+} kationtů. FGFR1, Bcr-Abl a JAK2 jsou schopné fosforylovat Y94. Projevuje se snížením oxidativního metabolismu a odolností vůči hypoxii (Shan et al. 2014)

4.1.3 Kináza pyruvát dehydrogenázy (PDHK)

PDHK je Ser/Thr kináza, která fosforylací PDHA1 snižuje aktivitu PDH a působí antagonisticky k PDP1. Tři tyrosinové zbytky na místech 136, 243 a 244 (Y136, Y243, Y244) mohou být fosforylovány kinázami FGFR1, FLT3, JAK2, BCR-ABL. Y243 a Y244 se nacházejí v blízkosti místa vazby ATP, zatímco Y136 se nachází blízko místa vázání molekuly inhibitoru PDH AZD7545. Fosforylace na Y243 a Y244 posiluje asociaci PDHK s PDC a může usnadňovat vazby ATP do aktivního místa enzymu, zatímco role fosforylace Y136 byla určena jen jako posílení této interakce. Důsledkem toho je zvýšení fosforylace PDHA1 na serinu 293 a snížení aktivity komplexu PDC. Mitochondrie s PDHK se substituovanými tyrosiny za fenylalaniny vykazovaly větší spotřebu kyslíku a vyšší obrát pyruvátu, zatímco rakovinové buňky s touto modifikací měly nižší rychlost proliferace než kontrolní (Hitosugi et al. 2011).

4.2 Elektron transportní systém

Nejvíce energie v podobě ATP, kterou dokáže buňka vyrobit, pochází z aktivity elektronového transportního systému v mitochondriích, kde se oxidují koenzymy vzniklé jako produkty Citrátového cyklu a glykolýzy. Elektrony z koenzymů jsou vedeny skrze několik proteinů (komplexy I, II, III, IV), přičemž je jejich energie postupně využívána k přesunu protonů do intermembránového prostoru mitochondrií. Tak vzniká elektrochemický potenciál. Ten je následně využit k uložení energie ve formě ATP. K tomu je potřeba navíc kyslík, který v posledním článku řetězce akceptuje tyto elektrony. Buňky, které procházejí nádorovou transformací, však mají často horší přístup ke kyslíku, tak pak často závisí převážně na glykolýze. Tomu musí předcházet deaktivace elektronového transportního řetězce, popřípadě modifikace jeho vlastností, aby nedocházelo k poškození buňky v důsledku jeho deregulace. Jeho aktivita spojená s kyslíkem vede neodvratně k tvorbě kyslíkových radikálů, které při zvýšení koncentrace mohou závažně poškozovat vnitřní struktury buňky.

4.2.1 NADH dehydrogenáza (Komplex I)

Za fyziologických podmínek slouží jako místo pro vstup protonu do elektron transportního řetězce, NADH jako donor. Při nádorové transformaci neztrácí svou důležitost, jeho role v metabolismu buňky se však mění. Pomáhá udržovat správný poměr NADH a NAD, významný pro rovnováhu mezi anabolickými a katabolickými procesy.

Bylo objeveno, že fosforylace podjednotky NDUFB10 c-Src kinázou může zvýšit aktivitu protonové pumpy komplexu, a tím udržovat protonový gradient mezi matrix a intermembránovým prostorem, který je nutný pro transport proteinů do mitochondrií, k udržení funkce Citrátového cyklu, potažmo jeho funkce v tvorbě prekursorů biomolekul potřebných k proliferaci. Inhibice c-Src kinázy vede ke snížení proliferace. Fosforylace NDUFB10 se také významně podílí v udržování aktivity komplexu (Hebert-Chatelain et al. 2012)

Naopak fosforylace na tyrosinu 193 (Y193) podjednotky NDUFV2 c-Src kinázou působí zvýšením aktivity NADH dehydrogenázy a zvyšuje životaschopnost buněk a je nutná pro efektivní fungování ETS. Bylo také pozorováno, že dochází ke snížení produkce ROS. Podjednotka NDUFV2 se nachází v blízkosti místa vazby NADH a fosforylace na Y193 se pravděpodobně významně podílí na funkci dehydrogenázy (Ogura et al. 2012).

Pomocí proteomických postupů byla dále objevena další místa tyrosinové fosforylace na různých podjednotkách Komplexu I, avšak jejich role v regulaci nebyla zatím prozkoumána (Cesaro and Salvi 2010).

4.2.2 Sukcinát-ubichinon reduktáza (Komplex II)

Jedná se o enzym, skrze který vstupují do respiračního řetězce elektrony z FADH₂, které jsou získávány z přeměny sukcinátu na fumarát v Citrátovém cyklu. Tuto reakci i komplex sám katalyzuje, jako jediný má roli jak v Krebsově cyklu, tak v elektronovém transportním systému (Cecchini 2003). Elektrony jsou dále předávány na ubichinon, difundující v membráně, na kterém pokračují dál v ETS. Skládá se ze čtyřech proteinů: SDHA, SDHB, SDHC a SDHD. Všechny jsou kódovány v jádře, což je jeho další ojedinělost mezi proteiny ETS. Komplex II obsahuje 5 prostetických skupin: FAD, hem, 3 železo-sírná jádra.

Bylo zjištěno, že má roli v přeprogramování metabolismu buňky z aerobní glykolýzy na anaerobní, přičemž se mění poměr koncentrace FAD a NAD z cca. 1:5 na 1:2. Aktivita komplexu II se zvyšuje prostřednictvím fosforylace na tyrosinu 543 a tyrosinu 604 (Salvi et al. 2007)). Tuto reakci katalyzuje kináza Fgr. Zvýšení aktivity komplexu II souvisí s inhibicí

aktivity komplexu I, a projevuje se v buňkách s mutovaným komplexem I, pravděpodobně jako reakce na dysfunkci komplexu I. Také je projevem zvýšení koncentrace kyslíkových radikálů, konkrétně peroxidu vodíku, ale ne superoxidů. Sama fosforylace komplexu II vede ke zvýšení jejich produkce a posílení tohoto efektu. Jedná se o příklad dráhy zapojující se do radikálové signalizace (Acín-Pérez et al. 2014).

4.2.3 Ubichinon cytochrom c oxidoreduktáza(Komplex III)

Přenáší elektrony z ubichinonu na cytochrom C, spojuje alternativní místa vstupu elektronů. Skládá se z 10 podjednotek, podjednotka cytochrom b je kódována mtDNA, zbytek v jádře. Pouze 3 podjednotky se účastní přenosu elektronů: cytochrom c1, Rieske Fe-S protein a výše zmíněný cytochrom b.

Místo fosforylace bylo objeveno u podjednotky 2, nacházející se v jádře komplexu III, při zvýšení koncentrace peroxidu vodíku (Augereau et al. 2005). Nebylo však zatím více charakterizováno.

4.2.4 Cytochrom C

Jeho hlavní funkcí je přenos 2 elektronů mezi komplexem III a IV za pomoci prostetické skupiny hemu vázající atom železa. Jedná se o převážně volně difundující intermembránový globulární protein s afinitou ke kardiolipinům, fosfolipidům, vyskytující se ve vnitřní mitochondriální membráně. Jeho další, později objevenou funkcí, je zprostředkování apoptózy skrze interakci s proteinem Apaf-1 (Green 2000), který následně oligomerizuje na multimolekulární komplex apoptozóm a spouští kaspázovou kaskádu skrze aktivaci proteinu kaspáza-3, přičemž váže ATP jako regulátor interakce s Apaf-1 (Patriarca et al. 2009). Další funkce cytochromu C zahrnují peroxidázovou aktivitu (Pereverzev et al. 2003), související s oxidací fosfolipidů (Kagan et al. 2005).

U dvou tyrozinových zbytků na cytochromu C bylo objeveno, že mohou být fosforylovány: tyrosin 48 (Y48) a tyrosin 97 (Y97). Nebyly zatím identifikovány kinázy zodpovědné za tyto modifikace. Fosforylace na Y97 byla objevena v tkáni kravského srdce. Bylo zjištěno, že působí změnou kinetiky oxidace cytochromu C cytochrom C oxidázou, mění závislost na koncentraci substrátu na sigmoidální, přičemž zvyšuje K_m přibližně dvojnásobně a koncentrace substrátu nutná k dosažení V_{max} je zvýšena 2.2krát, V_{max} však jinak zůstává stejná. Jako důsledek polohy Y97 v hydrofobní části molekuly byl navržen mechanismus regulace

afinity ke kardiolipinům, který by mohl být zodpovědný za zvýšení nebo snížení oxidázové aktivity cytochromu C, ale jeho přesný význam nebyl určen (Lee et al. 2006).

Dále byla objevena v tkáni kravských jater fosforylace na Y48 a její vliv na snížení obratu cytochromu C v dýchacím řetězci zhruba o polovinu (Yu et al. 2008). Další výzkum s použitím fosfomimetické varianty Y48E ukázal, že snižuje jeho redoxní potenciál skrze částečnou denaturaci proteinu a odkrytí hemové prostetické skupiny vodnímu prostředí. Může to být jedním z důvodů snížení obratu cytochromu C. Fosforylace také snižuje afinitu ke kardiolipinům ve vnitřní membráně, zároveň zeslabuje peroxidázovou aktivitu závislou na přítomnosti kardiolipinů, přičemž tuto ztrátu aktivity do jisté míry kompenzuje. Nejzásadnější vliv má tato modifikace na funkci započetí apoptózy, kterou velmi silně inhibuje. Přestože přímý mechanismus není známý, mohlo by jít o rozsáhlejší změnu konformace proteinu (Pecina et al. 2010).

4.2.5 Cytochrom C oxidáza (COX, Komplex IV)

Je finálním proteinem dýchacího řetězce, přijímá elektron od cytochromu C a přenáší jej skrze redoxní systém přenašečů na finální akceptor O₂, za současné tvorby elektrochemického gradientu H⁺. Jedná se o komplex tvořený 13 podjednotkami, 3 z nich tvořící jádro proteinu jsou kódovány v mitochondrii. Komplex je alostericky inhibován vysokou koncentrací ATP, aktivován ADP a AMP (Arnold and Kadenbach 1999; Napiwotzki et al. 1997) podle energetického stavu buňky. V rámci kinetiky dýchacího řetězce může mít v některých buněčných liniích pozici rychlost reakce limitujícího enzymu (Villani et al. 1999).

První případ regulace COX tyrosinovou fosforylací byl objeven v osteoklastech, kde jejich zvýšená aktivita závisela na přítomnosti c-Src kinázy, zvyšující aktivitu COX, a tím zároveň rychlost tvorby ATP. Fosforylována byla podjednotka II, přesné místo fosforylace nebylo odhaleno (Miyazaki et al. 2003). Určitějším poznatkem bylo zjištění, že tyrosin 304 (Y304) na podjednotce I v játrech může být fosforylován. Děje se tak pod vlivem cAMP, indukovaným hormonem glukagonem, případně forskolinem, který aktivuje přímo adenylyl cyklázu. Fosforylace tohoto místa má na aktivitu COX inhibiční účinek při V_{max} okolo 50 %, při fyziologických koncentracích aktivitu v podstatě vypíná. Ve stejné práci byla objevena fosfotyrosinová místa na dalších podjednotkách COX, konkrétně na II a IV, byť zodpovídající kinázy zůstávají neznámé (Lee et al. 2005). Jako další faktor vedoucí k fosforylaci Y304 byl objeven cytokin TNF α, taktéž v jaterních buňkách krávy (Samavati et al. 2008), pro který je typické snížení oxidativního metabolismu (Berg et al. 2003).

4.2.6 ATP syntáza

Je to proteinový komplex, který syntetizuje ATP z ADP a fosfátu. Je poháněn gradientem H^+ mezi matrix a intermembránovým prostorem mitochondrií. Tento protein má naprosto zásadní význam v energetickém metabolismu, neboť zde vzniká většina ATP obligátně aerobně respirujícího organismu.

Skládá se z dvou jednotek, F_0 a F_1 . F_0 je integrální membránový komplex nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně. Skládá se z podjednotek a, b, c, d, e, f, g, A6L, F_6 a OSCP. C podjednotka se vyskytuje v 10 a více kopiích, podle zkoumaného organismu, které asociují do kruhového komplexu, který slouží ATP syntáze jako „rotor“. Sousedním lalokem z podjednotek a, e, f, g, a A6L prochází kanál, kterým se vracejí H^+ do matrix, přičemž otáčejí rotorem z c podjednotek.

F_0 jednotku tvoří ještě poslední funkční část sestávající z podjednotek b, d, F_6 a OSCP. Tvoří periferní stonek, který vystupuje z membrány a interaguje s F_1 . Upevňuje spojení F_0 s F_1 a slouží jako „stator“ - nepohybuje se spolu s kruhem c podjednotek a drží F_1 ve statické poloze.

Samotnou katalýzu provádí jednotka F_1 , tvořena podjednotkami α , β , γ , δ , ϵ . Podjednotky γ , δ , ϵ se pohybují spolu s rotorem z c podjednotek a jejich pohyb pohání změnu konformace a tvorbu ATP ve třech kopiích α a β , které tuto reakci katalyzují (Rubinstein, Walker, and Henderson 2003).

Na tomto komplexu byla objevena fosforylace na tyrosinu 75 na δ podjednotce F_1 , jako reakce na stimulaci kortikálního neuronu myši hormonem PDGF, jeho biologická signifikance však zůstává neobjasněna (Ko et al. 2002). Fosforylaci může zabránit inkubace s lysofosfatidickou kyselinou (Inoue et al. 1997). Další výzkum se zabíral stavem fosforylace ATP syntázy v klidovém stavu. Na podjednotce γ bylo objeveno místo fosforylace v srdeční tkáni krávy. Přesné místo fosforylace bylo obtížné určit pro výskyt více tyrosinových zbytků na peptidech podrobovaných hmotnostní spektrometrii. Za pomoci webové aplikace pro predikci míst proteinové fosforylace NetPhos (Blom, Gammeltoft, and Brunak 1999) bylo místo fosforylace určeno na tyrosinu 52 (di Pancrazio et al. 2006). Dimerická forma ATP syntázy, mající význam na tvorbě krist u *S. cerevisiae* (Arselin et al. 2004), fosforylována na podjednotce γ nebyla.

4.3 Ostatní mitochondriální proteiny

4.3.1 Acetyl koenzym A transferáza (*Acat1*)

Katalyzuje tvorbu acetoacetyl koenzymu A z dvou molekul acetyl koenzymu A (Antonenkov et al. 2000) v mitochondriích a v cytosolu, respektive jeho ACAT1 a ACAT2 isoformy (Fukao et al. 1997). Jeho význam v energetickém metabolismu zde však nekončí, uplatňuje se také v regulaci acetylací proteinů. Děje se tak u PDH a PDP1, které se vlivem acetylce inhibují (Fan, Shan, Kang, Elf, Xie, Tucker, Gu, Aguiar, Lonning, Chen, Mohammadi, Britton, Garcia, Alečković, Kang, Kaluz, Devi, VanMeir, et al. 2014), což je významný krok k přeprogramování metabolismu na aerobní glykolýzu. Samotná aktivita ACAT1 může být regulována tyrosinovou fosforylací na tyrosinu 407 (Y407) při stimulaci EGF. K fosforylaci dochází jen na tetramerních formách ACAT1, které mají zvýšenou aktivitu oproti monomerům, fosforylace stabilizuje tetramer. Zvýšená aktivita enzymu ACAT1 byla objevena v mnoha typech nádorů. Za fosforylaci na Y407 jsou zodpovědné tyrosinové kinázy FGFR1 a EGFR, podle typu buněk (Fan et al. 2016).

4.3.2 Adenin nucleotid translokáza (*ANT*)

Přenáší ATP z matrix do intermembránového prostoru, a naopak ADP přenáší dovnitř. Jedná se o integrální membránový protein. Je zásadní pro udržení chodu oxidativního metabolismu. ANT může změnit konformaci na dva stavy: otevřený do mitochondriálního intermembránového prostoru (c-stav) a otevřený do mitochondriální matrix (m-stav). Hypotetický mechanismus výměny ATP za ADP by mohl být započat rozrušením sítě solných můstků na příslušné straně nukleotidem. Například ADP rozrušením sítě solných můstků ANT v c-stavu ze strany intermembránového prostoru spustí změnu konformace na m-stav, přičemž je přesunut do matrix. Skrze rozrušení m-stavu může zase dojít k opačně směřovanému přesunu ATP. Tímto je také zachována stechiometrie přesunu 1 : 1 (Robinson, Overy, and Kunji 2008; Wang and Tajkhorshid 2008). Savčí genom obsahuje 4 isoformy, které jsou exprimovány u buněk v různých stádiích růstu (Stepien et al. 1992).

U isoformy ANT1 bylo objeveno, že tyrosiny 184, 190 a 194 mohou být fosforylovány. Bylo navrženo, že fosforylace na tyrosinech 190 a 194 by mohla mít roli v zprostředkování změny konformace z m-stavu do c-stavu, při přechodu ATP z matrix do intermembránového prostoru. Při defosforylaci je zabráněno správné funkci enzymu, jak bylo demonstrováno substitucí tyrosinů 194 a 190 za fenylalaniny v transgenních kvasinkách. Ty ztratily schopnost

růstu na nefermentovatelných substrátech. Tyrosinové kinázy Src a Lck byly identifikovány jako původci fosforylace těchto zbytků (Feng et al. 2010).

4.3.3 Mitochondriální jaderný retrográdní regulátor 1 (MNRR1)

Je to regulační faktor působící v jádře i v mitochondriálním intermembránovém prostoru, kde různými mechanismy reguluje elektronový transportní řetězec. V mitochondrii se váže na COX a zvyšuje jeho aktivitu, spotřebu O₂ a snižuje výskyt ROS – zajišťuje jeho optimální funkci, možná pomáhá tvorbě dimeru. V jádře zvyšuje expresi podjednotky COX 412, jeho exprese je zvýšena při hypoxickém stresu (Aras et al. 2015). Velký význam pro mitochondriální aktivitu MNRR1 má fosforylace na tyrosinu 99 kinázou BCR-Abl. V defosforylovaném stavu není MNRR1 schopen správně interakce s COX. V buňce pak dochází k poklesu respirace.

Kináza BCR-Abl se vyskytuje jen v patologických podmínkách, takže je předpokládáno, že za fyziologického stavu by mohla být za touto fosforylací v mitochondrii se vyskytující Abl2 (Aras et al. 2017).

4.3.4 NADH oxidáza 4 (NOX4)

Vyskytuje se v kardiomyocytech, její funkcí je tvorba ROS. Účastní se remodelace tkání iniciací apoptózy přes mitochondrii (Ago et al. 2010). Vyskytuje se v i cytosolu a ER. První známý mechanismus její regulace byla změna hladiny exprese (Geiszt 2006), ale ukázalo se, že za udržováním její fyziologické míry aktivity stojí také kináza Fyn. Interaguje s C-koncem NOX4 a fosforyluje silně evolučně konzervovaný tyrosin 566. Aktivita Fyn se zvyšuje v oxidativním prostředí. Mechanismus inhibice NOX4 spočívá v oslabení interakce s p22^{phox}, membránovým proteinem nutným k jeho správné funkci (Matsushima et al. 2016).

4.3.5 Telomerázová reverzní transkriptáza (TERT)

Kanonická funkce TERT je zabránění zkracování telomer chromozómů v jádře při replikaci (Collins 2000), byla však taktéž objevena v mitochondrii, kde plní rozličné funkce. Její aktivita v mitochondrii souvisí s potlačováním efektů oxidačního stresu způsobeného ROS (Ahmed et al. 2008), ochranou mitochondriálního DNA (mtDNA) před poškozením (Haendeler et al. 2009; Miwa et al. 2016), nebo potlačením apoptózy (Singhapol et al. 2013). Byl popsán mechanismus regulace telomerázy v jádře, při němž dochází k jeho exportu při oxidativním stresu, jenž je zprostředkován fosforylací kinázou z rodiny Src (Haendeler et al. 2003). Stejný mechanismus translokace byl zaznamenán i v mitochondriích Hek buněk. Při oxidativním

stresu se zvyšuje aktivita Src kinázy skrze její fosforylaci na Y416, aby pak dále fosforylovala TERT na tyrosinu 707. To vede ke snížení koncentrace TERT v mitochondrii dosud neznámým mechanismem (Büchner et al. 2010). Můžeme se domnívat, že tato regulace má proapoptotický účinek. Podobně jako jeho jaderná obdoba, deaktivací TERT kinázou Src jsou potlačeny prostředky regenerace a údržby organely v buňce potenciálně poškozené oxidačním stresem.

4.3.6 *Single strand DNA binding protein (SSB)*

Mitochondriálně lokalizovaný SSB má roli ve stimulaci replikačního aparátu: helikázy Twinkle (Korhonen, Gaspari, and Falkenberg 2003) a polymerázy γ (Ciesielski et al. 2015) a v celkové údržbě mtDNA. Jeho nízká exprese se pojí s úbytkem mtDNA a proliferací buněk nádorových linií (Ruhanen et al. 2010). Snížení množství mtDNA se také může zprostředkovat fosforylací SSB na tyrosinu 73, katalyzovanou c-Src kinázou v buňkách nádoru prsu, včetně těžké varianty triple negative (Djeungoue-Petga et al. 2019). Snížený obsah mtDNA se pojí s rozvojem nádoru prsu a metastáz (Weerts et al. 2016), a s tím související přeměnou epitel-mesenchym (Naito et al. 2008).

4.3.7 *Glutamináza (GLS)*

Jedná se o velmi významný protein podporující Warburgův efekt. Katalyzuje přeměnu glutamátu na α -ketoglutarát. Tato reakce má význam v doplnění citrátového cyklu při syntéze monomerů pro tvorbu biopolymerů. Tomuto jevu se říká glutaminolýza. Jsou známy dvě isoformy: GLS a GLS2, respektive varianta objevená v ledvinách a játrech.

Může mít zvýšenou aktivitu vlivem fosforylace receptorovou tyrosinovou kinázou MET/HGFR (Hepatocyte growth factor receptor) po stimulaci HGF (Hepatocyte growth factor) v kultuře jaterních buněk. Kináza MET je spojena s nádorovým bujením v játrech, kde byla poprvé objevena. Není známo, jakým způsobem se jako integrální membránový receptor dostává k fosforylaci mitochondriální GLS ani jaký tyrosinový zbytek je fosforylován, ale jejich přímý kontakt byl potvrzen imunoprecipitací. MET se při aktivaci autofosforyluje na tyrosinech 1234 a 1235, je to zásadní pro tuto regulaci. Druhý substrát MET kinázy byl PDC, který byl inhibován. O povaze jeho inhibice vyvstávají stejné otázky jako u GLS (Huang et al. 2019).

4.3.8 *Heat shock protein 60 (Hsp60)*

Je to jeden ze silně konzervovaných buněčných chaperonů, vyskytuje se jak v cytosolu, tak v mitochondrii. Byla objevena souvislost jeho degradace v mitochondrii s fosforylací na tyrosinu 227 c-Src kinázou při infekci rotavirem. Hsp60 při infekci zprostředkovává přesun jednoho z nestrukturních proteinů rotaviru do mitochondrií, kde spouští proapoptotické dráhy. Rotavirus nejspíš nějakým způsobem zmanipuluje c-Src kinázu, aby tuto dráhu podporou degradace Hsp60 inhibovaly. c-Src kináza se přitom vyskytuje v aktivované formě s fosforylovaným Y416 (Chattopadhyay et al. 2017).

5. Závěr

Demonstroval jsme, že aktivita tyrosinových kináz a přidružených proteinů se podílí na mnohých mitochondriálních procesech, častěji svou kanonickou funkcí proteinové fosforylace, ale mnohdy i pouhou asociací s proteiny, nezávisle na kinázové aktivitě. Nedá se říct, že by tyrosinové kinázy plnily jen prostou úlohu vypínače mitochondrií nebo jejího zachránce. Bohatství možností regulace tyrosinovou fosforylací zahrnuje velmi často zcela odlišně odezvy. Tyrosinové kinázy se mohou podílet na zajištění správné funkce elektron transportního řetězce, ale jiné nebo i ty samé za jiného stimulu mohou jeho aktivitu potlačit. Podobně by se dalo mluvit i o dalších vlastnostech mitochondrií jako apoptóza nebo jejich autonomní dělení. Tyto zásadní procesy se mohou však při ztrátě kontroly obrátit proti organismu, a stát se původci nádorového bujení a dalších patologií.

Mnoho bylo objasněno, byť leckde schází komplexnější chápání vztahů mezi kinázami, enzymy či místy fosforylace. Někde možná celé dráhy čekají na objevení.

Proteomickými metodami bylo objeveno mnoho potenciálních cílů budoucího výzkumu (Cesaro and Salvi 2010; Guedouari et al. 2021). Některé zásadní mitochondriální procesy, jako je Citrátový cyklus, jsou z hlediska tyrosinové fosforylace v podstatě neprozkoumané, přestože u většiny z jeho komponentů byla popsána místa tyrosinové fosforylace. Webové databáze jako např. PhosphoSitePlus (Hornbeck et al. 2015) poskytují významný přehled těchto míst a mohou sloužit jako odrazový můstek k dalšímu výzkumu. V této práci jsem se pokusil shrnout, co je zatím objevené, ale mnoho dalšího ještě čeká.

6. Použitá literatura

- Aaronson, S. 1991. "Growth Factors and Cancer." *Science* 254 (5035). <https://doi.org/10.1126/science.1659742>.
- Acín-Pérez, Rebeca, Isabel Carrascoso, Francesc Baixauli, Marta Roche-Molina, Ana Latorre-Pellicer, Patricio Fernández-Silva, María Mittelbrunn, et al. 2014. "ROS-Triggered Phosphorylation of Complex II by F₁F₀ Kinase Regulates Cellular Adaptation to Fuel Use." *Cell Metabolism* 19 (6): 1020–33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.015>.
- Ago, Tetsuro, Shouji Matsushima, Junya Kuroda, Daniela Zablocki, Takanari Kitazono, and Junichi Sadoshima. 2010. "The NADPH Oxidase Nox4 and Aging in the Heart." *Aging* 2 (12). <https://doi.org/10.18632/aging.100261>.
- Ahmed, Shaheda, João F. Passos, Matthew J. Birket, Tina Beckmann, Sebastian Brings, Heiko Peters, Mark A. Birch-Machin, Thomas von Zglinicki, and Gabriele Saretzki. 2008. "Telomerase Does Not Counteract Telomere Shortening but Protects Mitochondrial Function under Oxidative Stress." *Journal of Cell Science* 121 (7). <https://doi.org/10.1242/jcs.019372>.
- Antonenkova, Vasily D., Kathleen Croes, Etienne Waelkens, Paul P. van Veldhoven, and Guy P. Mannaerts. 2000. "Identification, Purification and Characterization of an Acetoacetyl-CoA Thiolase from Rat Liver Peroxisomes." *European Journal of Biochemistry* 267 (10). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01314.x>.
- Aras, Siddhesh, Hassan Arrabi, Neeraja Purandare, Maik Hüttemann, John Kamholz, Stephan Züchner, and Lawrence I. Grossman. 2017. "Abl2 Kinase Phosphorylates Bi-Organellar Regulator MNRR1 in Mitochondria, Stimulating Respiration." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1864 (2): 440–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.029>.
- Aras, Siddhesh, Minbo Bai, Icksoo Lee, Roger Springett, Maik Hüttemann, and Lawrence I. Grossman. 2015. "MNRR1 (Formerly CHCHD2) Is a Bi-Organellar Regulator of Mitochondrial Metabolism." *Mitochondrion* 20 (January): 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.003>.
- Arnold, Susanne, and Bernhard Kadenbach. 1999. "The Intramitochondrial ATP/ADP-Ratio Controls Cytochrome c Oxidase Activity Allosterically." *FEBS Letters* 443 (2). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01694-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01694-9).
- Arselin, Geneviève, Jacques Vaillier, Bénédicte Salin, Jacques Schaeffer, Marie France Giraud, Alain Dautant, Daniel Brêthes, and Jean Velours. 2004. "The Modulation in Subunits e and g Amounts of Yeast ATP Synthase Modifies Mitochondrial Cristae Morphology." *Journal of Biological Chemistry* 279 (39). <https://doi.org/10.1074/jbc.M404316200>.
- Augereau, O., S. Claverol, N. Boudes, M.-J. Basurko, M. Bonneu, R. Rossignol, J.-P. Mazat, T. Letellier, and J. Dachary-Prigent. 2005. "Identification of Tyrosine-Phosphorylated Proteins of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Machinery." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (13). <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5005-7>.
- Bedirian, Arda, Cindy Baldwin, Jun Ichi Abe, Tomoko Takano, and Serge Lemay. 2004. "Pleckstrin Homology and Phosphotyrosine-Binding Domain-Dependent Membrane Association and Tyrosine Phosphorylation of Dok-4, an Inhibitory Adapter Molecule Expressed in Epithelial Cells." *Journal of Biological Chemistry* 279 (18). <https://doi.org/10.1074/jbc.M310689200>.
- Beerli, R R, D Graus-Porta, K Woods-Cook, X Chen, Y Yarden, and N E Hynes. 1995. "Neu Differentiation Factor Activation of ErbB-3 and ErbB-4 Is Cell Specific and Displays a Differential Requirement for ErbB-2." *Molecular and Cellular Biology* 15 (12). <https://doi.org/10.1128/mcb.15.12.6496>.
- Berg, Sören, Penny L. Sappington, Lynda J. Guzik, Russell L. Delude, and Mitchell P. Fink. 2003. "Proinflammatory Cytokines Increase the Rate of Glycolysis and Adenosine-5'-Triphosphate Turnover in Cultured Rat Enterocytes." *Critical Care Medicine* 31 (4). <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000059647.92390.92>.
- Bernardi, Paolo, Luca Scorrano, Raffaele Colonna, Valeria Petronilli, and Fabio di Lisa. 1999. "Mitochondria and Cell Death. Mechanistic Aspects and Methodological Issues." *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00725.x>.

- Berry, Daniel C., Hui Jin, Avijit Majumdar, and Noa Noy. 2011. "Signaling by Vitamin A and Retinol-Binding Protein Regulates Gene Expression to Inhibit Insulin Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (11). <https://doi.org/10.1073/pnas.101115108>.
- Biscardi, Jacqueline S., Ming Chei Maa, David A. Tice, Michael E. Cox, Tzeng Horne Leu, and Sarah J. Parsons. 1999. "C-Src-Mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function." *Journal of Biological Chemistry* 274 (12). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8335>.
- Blom, Nikolaj, Steen Gammeltoft, and Søren Brunak. 1999. "Sequence and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites." *Journal of Molecular Biology* 294 (5). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310>.
- Bollu, Lakshmi Reddy, Jianguo Ren, Alicia Marie Blessing, Rajasekhara Reddy Katreddy, Guang Gao, Lei Xu, Jinrong Wang, Fei Su, and Weihua Zhang. 2014. "Involvement of de Novo Synthesized Palmitate and Mitochondrial EGFR in EGF Induced Mitochondrial Fusion of Cancer Cells." *Cell Cycle* 13 (15). <https://doi.org/10.4161/cc.29338>.
- Bork, Peer, and Benjamin margolis. 1995. "A Phosphotyrosine Interaction Domain." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90347-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90347-X).
- Büchner, Nicole, Tim Christian Zschau, Margarete Lukosz, Joachim Altschmied, and Judith Haendeler. 2010. "Downregulation of Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Induced by H₂O₂ Is Src Kinase Dependent." *Experimental Gerontology* 45 (7–8): 558–62. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.003>.
- Burgess, Antony W, Hyun-Soo Cho, Charles Eigenbrot, Kathryn M Ferguson, Thomas P.J Garrett, Daniel J Leahy, Mark A Lemmon, Mark X Sliwkowski, Colin W Ward, and Shigeyuki Yokoyama. 2003. "An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors." *Molecular Cell* 12 (3). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00350-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00350-2).
- Burlacu, Alexandrina. 2003. "Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 7 (3). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00225.x>.
- Buss, J E, M P Kamps, and B M Sefton. 1984. "Myristic Acid Is Attached to the Transforming Protein of Rous Sarcoma Virus during or Immediately after Synthesis and Is Present in Both Soluble and Membrane-Bound Forms of the Protein." *Molecular and Cellular Biology* 4 (12). <https://doi.org/10.1128/mcb.4.12.2697-2704.1984>.
- Cardone, Luca, Annalisa Carlucci, Adele Affaitati, Alessandra Livigni, Tiziana deCristofaro, Corrado Garbi, Stelio Varrone, et al. 2004. "Mitochondrial AKAP121 Binds and Targets Protein Tyrosine Phosphatase D1, a Novel Positive Regulator of Src Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 24 (11). <https://doi.org/10.1128/mcb.24.11.4613-4626.2004>.
- Carito, Valentina, Attilio Pingitore, Erika Cione, Ida Perrotta, Domenico Mancuso, Antonio Russo, Giuseppe Genchi, and Maria Cristina Caroleo. 2012. "Localization of Nerve Growth Factor (NGF) Receptors in the Mitochondrial Compartment: Characterization and Putative Role." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1820 (2): 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.015>.
- Carlucci, Annalisa, Annagrazia Adornetto, Antonella Scorziello, Davide Viggiano, Mariapaola Foca, Ornella Cuomo, Lucio Annunziato, Max Gottesman, and Antonio Feliciello. 2008. "Proteolysis of AKAP121 Regulates Mitochondrial Activity during Cellular Hypoxia and Brain Ischaemia." *EMBO Journal* 27 (7). <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.33>.
- Carragher, Neil O., Valerie J. Fincham, Deborah Riley, and Margaret C. Frame. 2001. "Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Different Proteases during Src-Regulated Transformation and Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 276 (6). <https://doi.org/10.1074/jbc.M008972200>.
- Cecchini, Gary. 2003. "Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain." *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>.
- Cesaro, Luca, and Mauro Salvi. 2010. "Mitochondrial Tyrosine Phosphoproteome: New Insights from an up-to-Date Analysis." *BioFactors* 36 (6). <https://doi.org/10.1002/biof.123>.
- Chattopadhyay, Shiladitya, Arpita Mukherjee, Upayan Patra, Rahul Bhowmick, Trayambak Basak, Shantanu Sengupta, and Mamta Chawla-Sarkar. 2017. "Tyrosine Phosphorylation Modulates Mitochondrial Chaperonin Hsp60 and Delays Rotavirus NSP4-Mediated Apoptotic Signaling in Host Cells." *Cellular Microbiology* 19 (3). <https://doi.org/10.1111/cmi.12670>.

- Che, Ting Fang, Ching Wen Lin, Yi Ying Wu, Yu Ju Chen, Chia Li Han, Yih leong Chang, Chen Tu Wu, Tzu Hung Hsiao, Tse Ming Hong, and Pan Chyr Yang. 2015. "Mitochondrial Translocation of EGFR Regulates Mitochondria Dynamics and Promotes Metastasis in NSCLC." *Oncotarget* 6 (35). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5736>.
- Cheikhi, Amin, Teresa Anguiano, Jane Lasak, Baoli Qian, Amrita Sahu, Hikaru Mimiya, Charles C Cohen, Peter Wipf, Fabrisia Ambrosio, and Aaron Barchowsky. 2020. "Arsenic Stimulates Myoblast Mitochondrial Epidermal Growth Factor Receptor to Impair Myogenesis." *Toxicological Sciences* 176 (1). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa031>.
- Chen, Xingyong, Yeye Du, Grace F. Boni, Xue Liu, Jinlong Kuang, and Zhaoyu Geng. 2019. "Consuming Egg Yolk Decreases Body Weight and Increases Serum HDL and Brain Expression of TrkB in Male SD Rats." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99 (8). <https://doi.org/10.1002/jsfa.9610>.
- Ciesielski, Grzegorz L., Oya Bermek, Fernando A. Rosado-Ruiz, Stacy L. Hovde, Orrin J. Neitzke, Jack D. Griffith, and Laurie S. Kaguni. 2015. "Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Proteins Stimulate the Activity of DNA Polymerase γ by Organization of the Template DNA." *Journal of Biological Chemistry* 290 (48). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673707>.
- Collins, Kathleen. 2000. "Mammalian Telomeres and Telomerase." *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00103-4).
- David-Pfeuty, T., S. Bagrodia, and D. Shalloway. 1993. "Differential Localization Patterns of Myristoylated and Nonmyristoylated C-Src Proteins in Interphase and Mitotic c-Src Overexpresser Cells." *Journal of Cell Science* 105 (3). <https://doi.org/10.1242/jcs.105.3.613>.
- Demory, Michelle L., Julie L. Boerner, Robert Davidson, William Faust, Tsuyoshi Miyake, Icksoo Lee, Maik Hüttemann, Robert Douglas, Gabriel Haddad, and Sarah J. Parsons. 2009. "Epidermal Growth Factor Receptor Translocation to the Mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* 284 (52). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000760>.
- Ding, Yan, Zixing Liu, Shruti Desai, Yuhua Zhao, Hao Liu, Lewis K. Pannell, Hong Yi, et al. 2012. "Receptor Tyrosine Kinase ErbB2 Translocates into Mitochondria and Regulates Cellular Metabolism." *Nature Communications* 3. <https://doi.org/10.1038/ncomms2236>.
- Djeungoue-Petga, Marie Ange, Olivier Lurette, Stéphanie Jean, Geneviève Hamel-Côté, Rebeca Martín-Jiménez, Marine Bou, Astrid Cannich, Patrick Roy, and Etienne Hebert-Chatelain. 2019. "Intramitochondrial Src Kinase Links Mitochondrial Dysfunctions and Aggressiveness of Breast Cancer Cells." *Cell Death and Disease* 10 (12). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2134-8>.
- Fan, Jun, Hee Bum Kang, Changliang Shan, Shannon Elf, Ruiting Lin, Jianxin Xie, Ting Lei Gu, et al. 2014. "Tyr-301 Phosphorylation Inhibits Pyruvate Dehydrogenase by Blocking Substrate Binding and Promotes the Warburg Effect." *Journal of Biological Chemistry* 289 (38). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593970>.
- Fan, Jun, Ruiting Lin, Siyuan Xia, Dong Chen, Shannon E. Elf, Shuangping Liu, Yaozhu Pan, et al. 2016. "Tetrameric Acetyl-CoA Acetyltransferase 1 Is Important for Tumor Growth." *Molecular Cell* 64 (5): 859–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.014>.
- Fan, Jun, Changliang Shan, Hee Bum Kang, Shannon Elf, Jianxin Xie, Meghan Tucker, Ting Lei Gu, Mike Aguiar, Scott Lonning, Huaibin Chen, Moosa Mohammadi, Laura Mae P. Britton, Benjamin A. Garcia, Maša Alečković, Yibin Kang, Stefan Kaluz, Narra Devi, Erwin G. VanMeir, et al. 2014. "Tyr Phosphorylation of PDP1 Toggles Recruitment between ACAT1 and SIRT3 to Regulate the Pyruvate Dehydrogenase Complex." *Molecular Cell* 53 (4): 534–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.026>.
- Fan, Jun, Changliang Shan, Hee-Bum Kang, Shannon Elf, Jianxin Xie, Meghan Tucker, Ting-Lei Gu, Mike Aguiar, Scott Lonning, Huaibin Chen, Moosa Mohammadi, Laura-Mae P. Britton, Benjamin A. Garcia, Maša Alečković, Yibin Kang, Stefan Kaluz, Narra Devi, Erwin G. Van Meir, et al. 2014. "Tyr Phosphorylation of PDP1 Toggles Recruitment between ACAT1 and SIRT3 to Regulate the Pyruvate Dehydrogenase Complex." *Molecular Cell* 53 (4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.026>.
- Feinberg, Konstantin, Adelaida Kolaj, Chen Wu, Natalie Grinshtein, Jonathan R. Krieger, Michael F. Moran, Lee L. Rubin, Freda D. Miller, and David R. Kaplan. 2017. "A Neuroprotective Agent That Inactivates Prodegenerative TrkA and Preserves Mitochondria." *Journal of Cell Biology* 216 (11). <https://doi.org/10.1083/jcb.201705085>.
- Feng, Jianhua, Eliana Lucchinetti, Giray Enkavi, Yi Wang, Peter Gehrig, Bernd Roschitzki, Marcus C. Schaub, Emad Tajkhorshid, Kathrin Zaugg, and Michael Zaugg. 2010. "Tyrosine Phosphorylation by Src

- within the Cavity of the Adenine Nucleotide Translocase 1 Regulates ADP/ATP Exchange in Mitochondria.” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 298 (3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00310.2009>.
- Freund, Véronique, and Nelly Frossard. 2004. “Expression of Nerve Growth Factor in the Airways and Its Possible Role in Asthma.” In *Progress in Brain Research*, 146:335–46. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46021-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46021-4).
- Fukao, Toshiyuki, Xiang Qian Song, Grant A. Mitchell, Seiji Yamaguchi, Kazuko Sukegawa, Tadao Oorii, and Naomi Kondo. 1997. “Enzymes of Ketone Body Utilization in Human Tissues: Protein and Messenger RNA Levels of Succinyl-Coenzyme A (CoA):3-Ketoacid CoA Transferase and Mitochondrial and Cytosolic Acetoacetyl-CoA Thiolases.” *Pediatric Research* 42 (4). <https://doi.org/10.1203/00006450-199710000-00013>.
- Garrett, Thomas P.J., Neil M. McKern, Meizhen Lou, Thomas C. Elleman, Timothy E. Adams, George O. Lovrecz, Hong-Jian Zhu, et al. 2002. “Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α .” *Cell* 110 (6). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00940-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00940-6).
- Geiszt, Miklós. 2006. “NADPH Oxidases: New Kids on the Block.” *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.05.004>.
- Goldberg, Jonathan M., Gerard Manning, Allen Liu, Petra Fey, Karen E. Pilcher, Yanji Xu, and Janet L. Smith. 2006. “The Dictyostelium Kinome - Analysis of the Protein Kinases from a Simple Model Organism.” *PLoS Genetics* 2 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020038>.
- Graus-Porta, Diana, Roger R. Beerli, John M. Daly, and Nancy E. Hynes. 1997. “ErbB-2, the Preferred Heterodimerization Partner of All ErbB Receptors, Is a Mediator of Lateral Signaling.” *EMBO Journal* 16 (7). <https://doi.org/10.1093/emboj/16.7.1647>.
- Green, Douglas R. 2000. “Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors.” *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00003-9).
- Gringeri, Enrico, Amedeo Carraro, Elena Tibaldi, Francesco E. D’Amico, Mario Mancon, Antonio Toninello, Mario A. Pagano, Claudia Vio, Umberto Cillo, and Anna M. Brunati. 2010. “Lyn-Mediated Mitochondrial Tyrosine Phosphorylation Is Required to Preserve Mitochondrial Integrity in Early Liver Regeneration.” *Biochemical Journal* 425 (2). <https://doi.org/10.1042/BJ20090902>.
- Guedouari, Hala, Yasmine Ould Amer, Nicolas Pichaud, and Etienne Hebert-Chatelain. 2021. “Characterization of the Interactome of C-Src within the Mitochondrial Matrix by Proximity-Dependent Biotin Identification.” *Mitochondrion* 57 (March): 257–69. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.12.012>.
- Guerra, Flora, Nicoletta Guaragnella, Arnaldo A. Arbini, Cecilia Bucci, Sergio Giannattasio, and Loredana Moro. 2017. “Mitochondrial Dysfunction: A Novel Potential Driver of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer.” *Frontiers in Oncology* 7 (December). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00295>.
- Haendeler, Judith, Stefan Dröse, Nicole Büchner, Sascha Jakob, Joachim Altschmied, Christine Goy, Ioakim Spyridopoulos, Andreas M. Zeiher, Ulrich Brandt, and Stefanie Dimmeler. 2009. “Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Binds to and Protects Mitochondrial DNA and Function from Damage.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (6). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185546>.
- Haendeler, Judith, Jörg Hoffmann, Ralf P. Brandes, Andreas M. Zeiher, and Stefanie Dimmeler. 2003. “Hydrogen Peroxide Triggers Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase via Src Kinase Family-Dependent Phosphorylation of Tyrosine 707.” *Molecular and Cellular Biology* 23 (13). <https://doi.org/10.1128/mcb.23.13.4598-4610.2003>.
- Hebert-Chatelain, Etienne, Caroline Jose, Nicolas Gutierrez Cortes, Jean-William Dupuy, Christophe Rocher, Jeanne Dachary-Prigent, and Thierry Letellier. 2012. “Preservation of NADH Ubiquinone-Oxidoreductase Activity by Src Kinase-Mediated Phosphorylation of NDUFB10.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (5). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.01.014>.
- Hitosugi, Taro, Jun Fan, Tae Wook Chung, Katherine Lythgoe, Xu Wang, Jianxin Xie, Qingyuan Ge, et al. 2011. “Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Is Important for Cancer Metabolism.” *Molecular Cell* 44 (6): 864–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.015>.
- Hornbeck, Peter v., Bin Zhang, Beth Murray, Jon M. Kornhauser, Vaughan Latham, and Elzbieta Skrzypek. 2015. “PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and Recalibrations.” *Nucleic Acids Research* 43 (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gku1267>.

- Hsia, Datsun A., Satyajit K. Mitra, Christof R. Hauck, Daniel N. Streblow, Jay A. Nelson, Dusko Ilic, Shuang Huang, et al. 2003. "Differential Regulation of Cell Motility and Invasion by FAK." *Journal of Cell Biology* 160 (5). <https://doi.org/10.1083/jcb.200212114>.
- Huang, Xing, Guangming Gan, Xiaoxiao Wang, Ting Xu, and Wei Xie. 2019. "The HGF-MET Axis Coordinates Liver Cancer Metabolism and Autophagy for Chemotherapeutic Resistance." *Autophagy* 15 (7). <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1580105>.
- Humphrey, Sean J., David E. James, and Matthias Mann. 2015. "Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26 (12). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.013>.
- Hunter, Tony. 2009. "Tyrosine Phosphorylation: Thirty Years and Counting." *Current Opinion in Cell Biology* 21 (2). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.028>.
- Inoue, Chiyoko N., Young H. Ko, William B. Guggino, Hayley G. Forster, and Murray Epstein. 1997. "Lysophosphatidic Acid and Platelet-Derived Growth Factor Synergistically Stimulate Growth of Cultured Rat Mesangial Cells." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 216 (3). <https://doi.org/10.3181/00379727-216-44184>.
- Ishihara, Naotada, Yuu Fujita, Toshihiko Oka, and Katsuyoshi Mihara. 2006. "Regulation of Mitochondrial Morphology through Proteolytic Cleavage of OPA1." *EMBO Journal* 25 (13). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184>.
- Ito, Yasumasa, Pramod Pandey, Neerad Mishra, Shailendra Kumar, Navneet Narula, Surender Kharbanda, Satya Saxena, and Donald Kufe. 2001. "Targeting of the C-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis." *Molecular and Cellular Biology* 21 (18). <https://doi.org/10.1128/mcb.21.18.6233-6242.2001>.
- Itoh, Seigo, Serge Lemay, Masaki Osawa, Wenyi Che, Yuntao Duan, Andrew Tompkins, Paul S. Brookes, Shey-Shing Sheu, and Jun-ichi Abe. 2005. "Mitochondrial Dok-4 Recruits Src Kinase and Regulates NF- κ B Activation in Endothelial Cells." *Journal of Biological Chemistry* 280 (28). <https://doi.org/10.1074/jbc.M410262200>.
- Jin, Yue, Qingsong Cai, Anitha K. Shenoy, Sangbin Lim, Ying Zhang, Steve Charles, Miriam Tarrash, et al. 2016. "Src Drives the Warburg Effect and Therapy Resistance by Inactivating Pyruvate Dehydrogenase through Tyrosine-289 Phosphorylation." *Oncotarget* 7 (18). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7159>.
- Kagan, Valerian E., Vladimir A. Tyurin, Jianfei Jiang, Yulia Y. Tyurina, Vladimir B. Ritov, Andrew A. Amoscato, Anatoly N. Osipov, et al. 2005. "Cytochrome C Acts As A Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors." *Nature Chemical Biology* 1 (4). <https://doi.org/10.1038/nchembio727>.
- Kaplan, J M, G Mardon, J M Bishop, and H E Varmus. 1988. "The First Seven Amino Acids Encoded by the V-Src Oncogene Act as a Myristylation Signal: Lysine 7 Is a Critical Determinant." *Molecular and Cellular Biology* 8 (6). <https://doi.org/10.1128/mcb.8.6.2435-2441.1988>.
- Kato, Masato, R. Max Wynn, Jacinta L. Chuang, Shih Chia Tso, Mischa Machius, Jun Li, and David T. Chuang. 2008. "Structural Basis for Inactivation of the Human Pyruvate Dehydrogenase Complex by Phosphorylation: Role of Disordered Phosphorylation Loops." *Structure* 16 (12). <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.010>.
- Kharbanda, Surender, Zhi Min Yuan, Ralph Weichselbaum, and Donald Kufe. 1998. "Determination of Cell Fate by C-Abl Activation in the Response to DNA Damage." *Oncogene* 17 (25). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202571>.
- Ko, Young Hee, Weiyang Pan, Chiyoko Inoue, and Peter L. Pedersen. 2002. "Signal Transduction to Mitochondrial ATP Synthase: Evidence That PDGF-Dependent Phosphorylation of the δ -Subunit Occurs in Several Cell Lines, Involves Tyrosine, and Is Modulated by Lysophosphatidic Acid." *Mitochondrion* 1 (4). [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(01\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(01)00036-8).
- Koc, Emine C., Jennifer L. Miller-Lee, and Hasan Koc. 2017. "Fyn Kinase Regulates Translation in Mammalian Mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861 (3): 533–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.004>.
- Korhonen, Jenny A., Martina Gaspari, and Maria Falkenberg. 2003. "TWINKLE Has 5' \rightarrow 3' DNA Helicase Activity and Is Specifically Stimulated by Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein." *Journal of Biological Chemistry* 278 (49). <https://doi.org/10.1074/jbc.M306981200>.

- Kumar, Shailendra, Ajit Bharti, Neerad C. Mishra, Deepak Raina, Surender Kharbanda, Satya Saxena, and Donald Kufe. 2001. "Targeting of the C-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in the Necrotic Cell Death Response to Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 17281–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101414200>.
- Lee, Icksoo, Arthur R. Salomon, Scott Ficarro, Isabella Mathes, Friedrich Lottspeich, Lawrence I. Grossman, and Maik Hüttemann. 2005. "CAMP-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Subunit I Inhibits Cytochrome c Oxidase Activity." *Journal of Biological Chemistry* 280 (7): 6094–6100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411335200>.
- Lee, Icksoo, Arthur R. Salomon, Kebin Yu, Jeffrey W. Doan, Lawrence I. Grossman, and Maik Hüttemann. 2006. "New Prospects for an Old Enzyme: Mammalian Cytochrome c Is Tyrosine-Phosphorylated in Vivo." *Biochemistry* 45 (30): 9121–28. <https://doi.org/10.1021/bi060585v>.
- Lemmon, Mark A., and Joseph Schlessinger. 2010. "Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases." *Cell* 141 (7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- Lichtarge, Olivier, Henry R. Bourne, and Fred E. Cohen. 1996. "An Evolutionary Trace Method Defines Binding Surfaces Common to Protein Families." *Journal of Molecular Biology* 257 (2). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0167>.
- Lim, Young Ju, Jung Eun Koo, Eun-Hee Hong, Zee-Yong Park, Kyung-Min Lim, Ok-Nam Bae, and Joo Young Lee. 2015. "A Src-Family-Tyrosine Kinase, Lyn, Is Required for Efficient IFN- β Expression in Pattern Recognition Receptor, RIG-I, Signal Pathway by Interacting with IPS-1." *Cytokine* 72 (1). <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.008>.
- Livigni, Alessandra, Antonella Scorziello, Savina Agnese, Annagrazia Adornetto, Annalisa Carlucci, Corrado Garbi, Imma Castaldo, Lucio Annunziato, Enrico v. Avvedimento, and Antonio Feliciello. 2006. "Mitochondrial AKAP121 Links CAMP and Src Signaling to Oxidative Metabolism." *Molecular Biology of the Cell* 17 (1). <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-09-0827>.
- Manning, G. 2002. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." *Science* 298 (5600). <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- Matsushima, Shouji, Junya Kuroda, Peiyong Zhai, Tong Liu, Shohei Ikeda, Narayani Nagarajan, Shin Ichi Oka, et al. 2016. "Tyrosine Kinase FYN Negatively Regulates NOX4 in Cardiac Remodeling." *Journal of Clinical Investigation* 126 (9). <https://doi.org/10.1172/JCI85624>.
- Miwa, Satomi, Rafal Czapiewski, Tengfei Wan, Amy Bell, Kirsten N. Hill, Thomas von Zglinicki, and Gabriele Saretzki. 2016. "Decreased MTOR Signalling Reduces Mitochondrial ROS in Brain via Accumulation of the Telomerase Protein TERT within Mitochondria." *Aging* 8 (10). <https://doi.org/10.18632/aging.101089>.
- Miyazaki, Tsuyoshi, Lynn Neff, Sakae Tanaka, William C. Horne, and Roland Baron. 2003. "Regulation of Cytochrome c Oxidase Activity by C-Src in Osteoclasts." *Journal of Cell Biology* 160 (5). <https://doi.org/10.1083/jcb.200209098>.
- Muragaki, Yoshihiro, Nigel Timothy, Susan Leight, Barbara L. Hempstead, Moses v. Chao, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. 1995. "Expression of Trk Receptors in the Developing and Adult Human Central and Peripheral Nervous System." *Journal of Comparative Neurology* 356 (3). <https://doi.org/10.1002/cne.903560306>.
- Naito, Akihiro, Cody C. Cook, Takatsugu Mizumachi, Mian Wang, Cheng-hui Xie, Teresa T. Evans, Thomas Kelly, and Masahiro Higuchi. 2008. "Progressive Tumor Features Accompany Epithelial-Mesenchymal Transition Induced in Mitochondrial DNA-Depleted Cells." *Cancer Science* 99 (8). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00879.x>.
- Napiwotzki, Jörg, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, and Bernhard Kadenbach. 1997. "ATP and ADP Bind to Cytochrome c Oxidase and Regulate Its Activity." *Biological Chemistry* 378 (9). <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.9.1013>.
- Naresh, Anjali, Weiwen Long, Gregory A. Vidal, William C. Wimley, Luis Marrero, Carolyn I. Sartor, Sian Tovey, Timothy G. Cooke, John M.S. Bartlett, and Frank E. Jones. 2006. "The ERBB4/HER4 Intracellular Domain 4ICD Is a BH3-Only Protein Promoting Apoptosis of Breast Cancer Cells." *Cancer Research* 66 (12). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2368>.
- Ogawa, Akira, Yoshiharu Takayama, Hiroaki Sakai, Khoon Tee Chong, Satoru Takeuchi, Atsushi Nakagawa, Shigeyuki Nada, Masato Okada, and Tomitake Tsukihara. 2002. "Structure of the Carboxyl-

- Terminal Src Kinase, Csk.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (17). <https://doi.org/10.1074/jbc.C200086200>.
- Ogura, Masato, Junko Yamaki, Miwako K. Homma, and Yoshimi Homma. 2012. “Mitochondrial C-Src Regulates Cell Survival through Phosphorylation of Respiratory Chain Components.” *Biochemical Journal* 447 (2). <https://doi.org/10.1042/BJ20120509>.
- Okada, M., and H. Nakagawa. 1989. “A Protein Tyrosine Kinase Involved in Regulation of Pp60(c-Src) Function.” *Journal of Biological Chemistry* 264 (35): 20886–93. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)30019-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)30019-5).
- Ola, Mohammad Shamsul, Mohd. Nawaz, and Haseeb Ahsan. 2011. “Role of Bcl-2 Family Proteins and Caspases in the Regulation of Apoptosis.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 351 (1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0709-x>.
- Pancrazio, Francesca di, Elena Bisetto, Vera Alverdi, Irene Mavelli, Gennaro Esposito, and Giovanna Lippe. 2006. “Differential Steady-State Tyrosine Phosphorylation of Two Oligomeric Forms of Mitochondrial F0F1ATPsynthase: A Structural Proteomic Analysis.” *Proteomics* 6 (3): 921–26. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500077>.
- Patriarca, Antonella, Tommaso Eliseo, Federica Sinibaldi, Maria Cristina Piro, Riccardo Melis, Maurizio Paci, Daniel O. Cicero, Fabio Polticelli, Roberto Santucci, and Laura Fiorucci. 2009. “ATP Acts as a Regulatory Effector in Modulating Structural Transitions of Cytochrome c: Implications for Apoptotic Activity.” *Biochemistry* 48 (15). <https://doi.org/10.1021/bi801837e>.
- Pecina, Petr, Grigory G. Borisenko, Natalia A. Belikova, Yulia Y. Tyurina, Alena Pecinova, Icksoo Lee, Alejandro K. Samhan-Arias, Karin Przyklenk, Valerian E. Kagan, and Maik Hüttemann. 2010. “Phosphomimetic Substitution of Cytochrome c Tyrosine 48 Decreases Respiration and Binding to Cardiolipin and Abolishes Ability to Trigger Downstream Caspase Activation.” *Biochemistry* 49 (31): 6705–14. <https://doi.org/10.1021/bi100486s>.
- Pereverzev, M. O., T. v. Vygodina, A. A. Konstantinov, and V. P. Skulachev. 2003. “Cytochrome c, an Ideal Antioxidant.” In *Biochemical Society Transactions*. Vol. 31. <https://doi.org/10.1042/bst0311312>.
- Pincus, David, Ivica Letunic, Peer Bork, and Wendell A. Lim. 2008. “Evolution of the Phospho-Tyrosine Signaling Machinery in Premetazoan Lineages.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (28). <https://doi.org/10.1073/pnas.0803161105>.
- Pozzan, T., P. Magalhães, and R. Rizzuto. 2000. “The Comeback of Mitochondria to Calcium Signalling.” *Cell Calcium* 28 (5–6). <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0166>.
- Quintás-Cardama, Alfonso, and Jorge E. Cortes. 2006. “Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment.” In *Mayo Clinic Proceedings*. Vol. 81. <https://doi.org/10.4065/81.7.973>.
- Robbins, S M, N A Quintrell, and J M Bishop. 1995. “Myristoylation and Differential Palmitoylation of the HCK Protein-Tyrosine Kinases Govern Their Attachment to Membranes and Association with Caveolae.” *Molecular and Cellular Biology* 15 (7). <https://doi.org/10.1128/MCB.15.7.3507>.
- Robinson, Alan J., Catherine Overy, and Edmund R. S. Kunji. 2008. “The Mechanism of Transport by Mitochondrial Carriers Based on Analysis of Symmetry.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (46). <https://doi.org/10.1073/pnas.0809580105>.
- Rubinstein, John L., John E. Walker, and Richard Henderson. 2003. “Structure of the Mitochondrial ATP Synthase by Electron Cryomicroscopy.” *EMBO Journal* 22 (23). <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg608>.
- Ruhanen, Heini, Sarah Borrie, Gyorgy Szabadkai, Henna Tyynismaa, Aleck W.E. Jones, Dongchon Kang, Jan Willem Taanman, and Takehiro Yasukawa. 2010. “Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein Is Required for Maintenance of Mitochondrial DNA and 7S DNA but Is Not Required for Mitochondrial Nucleoid Organisation.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1803 (8): 931–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.04.008>.
- Sakatsume, Minoru, Ken-ichi Igarashi, Karen D. Winestock, Gianni Garotta, Andrew C. Lerner, and David S. Finbloom. 1995. “The Jak Kinases Differentially Associate with the α and β (Accessory Factor) Chains of the Interferon γ Receptor to Form a Functional Receptor Unit Capable of Activating STAT Transcription Factors.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (29). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17528>.
- Salvi, Mauro, Anna Maria Brunati, Luciana Bordin, Nicoletta la Rocca, Giulio Clari, and Antonio Toninello. 2002. “Characterization and Location of Src-Dependent Tyrosine Phosphorylation in Rat Brain

- Mitochondria.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1589 (2). [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00174-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00174-X).
- Salvi, Mauro, Anna Maria Brunati, and Antonio Toninello. 2005. “Tyrosine Phosphorylation in Mitochondria: A New Frontier in Mitochondrial Signaling.” *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.006>.
- Salvi, Mauro, Nick A. Morrice, Anna Maria Brunati, and Antonio Toninello. 2007. “Identification of the Flavoprotein of Succinate Dehydrogenase and Aconitase as in Vitro Mitochondrial Substrates of Fgr Tyrosine Kinase.” *FEBS Letters* 581 (29): 5579–85. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.005>.
- Samavati, Lobelia, Icksoo Lee, Isabella Mathes, Friedrich Lottspeich, and Maik Hüttemann. 2008. “Tumor Necrosis Factor α Inhibits Oxidative Phosphorylation through Tyrosine Phosphorylation at Subunit I of Cytochrome c Oxidase.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (30): 21134–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801954200>.
- Sardanelli, Anna Maria, Anna Signorile, Rosanna Nuzzi, Domenico de Rasmio, Zuzana Technikova-Dobrova, Zdenek Drahota, Antonella Occhiello, Alessandra Pica, and Sergio Papa. 2006. “Occurrence of A-Kinase Anchor Protein and Associated CAMP-Dependent Protein Kinase in the Inner Compartment of Mammalian Mitochondria.” *FEBS Letters* 580 (24). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.020>.
- Sartor, Carolyn I., Hong Zhou, Ewa Kozłowska, Katherine Guttridge, Evelyn Kawata, Laura Caskey, Jennifer Harrelson, et al. 2001. “HER4 Mediates Ligand-Dependent Antiproliferative and Differentiation Responses in Human Breast Cancer Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 21 (13). <https://doi.org/10.1128/mcb.21.13.4265-4275.2001>.
- Shan, Changliang, Hee Bum Kang, Shannon Elf, Jianxin Xie, Ting Lei Gu, Mike Aguiar, Scott Lonning, et al. 2014. “Tyr-94 Phosphorylation Inhibits Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase 1 and Promotes Tumor Growth.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (31). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581124>.
- Sicheri, Frank, Ismail Moarefi, and John Kuriyan. 1997. “Crystal Structure of the Src Family Tyrosine Kinase Hck.” *Nature* 385 (6617). <https://doi.org/10.1038/385602a0>.
- Singhapol, Chatchawan, Deepali Pal, Rafal Czapiewski, Mahendar Porika, Glyn Nelson, and Gabriele C. Saretzki. 2013. “Mitochondrial Telomerase Protects Cancer Cells from Nuclear DNA Damage and Apoptosis.” *PLoS ONE* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052989>.
- Slamon, DJ, and GM Clark. 1988. “Amplification of C-ErbB-2 and Aggressive Human Breast Tumors?” *Science* 240 (4860). <https://doi.org/10.1126/science.3289120>.
- Spencer, David M., Isabella Graef, David J. Austin, Stuart L. Schreiber, and Gerald R. Crabtree. 1995. “A General Strategy for Producing Conditional Alleles of Src-like Tyrosine Kinases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (21). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9805>.
- Stepien, Georges, Antonio Torroni, Andrew B. Chung, Judy A. Hodge, and Douglas C. Wallace. 1992. “Differential Expression of Adenine Nucleotide Translocator Isoforms in Mammalian Tissues and during Muscle Cell Differentiation.” *Journal of Biological Chemistry* 267 (21). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42082-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42082-0).
- Sun, G., L. Ramdas, W. Wang, J. Vinci, J. McMurray, and R. J.A. Budde. 2002. “Effect of Autophosphorylation on the Catalytic and Regulatory Properties of Protein Tyrosine Kinase Src.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (1). <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2627>.
- Sun, Gongqin, Ajay K Sharma, and Raymond Ja Budde. 1998. “Autophosphorylation of Src and Yes Blocks Their Inactivation by Csk Phosphorylation.” <http://www.stockton-press.co.uk/onc>.
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2008. “RIG-I-like Antiviral Protein in Flies.” *Nature Immunology* 9 (12). <https://doi.org/10.1038/ni1208-1327>.
- Tibaldi, Elena, Andrea Venerando, Francesca Zonta, Carlo Bidoia, Elisa Magrin, Oriano Marin, Antonio Toninello, et al. 2011. “Interaction between the SH3 Domain of Src Family Kinases and the Proline-Rich Motif of HTLV-1 P13: A Novel Mechanism Underlying Delivery of Src Family Kinases to Mitochondria.” *Biochemical Journal* 439 (3). <https://doi.org/10.1042/BJ20101650>.
- Tonks, Nicholas K, and Benjamin G Neel. 2001. “Combinatorial Control of the Specificity of Protein Tyrosine Phosphatases.” *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2). [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00196-4).

- Ullrich, Axel, and Joseph Schlessinger. 1990. "Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity." *Cell* 61 (2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90801-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90801-K).
- Villani, Gaetano, Marilena Greco, Sergio Papa, and Giuseppe Attardi. 1999. "Low Reserve of Cytochrome c Oxidase Capacity in Vivo in the Respiratory Chain of a Variety of Human Cell Types." *Journal of Biological Chemistry* 273 (48). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.31829>.
- Wang, Y., and E. Tajkhorshid. 2008. "Electrostatic Funneling of Substrate in Mitochondrial Inner Membrane Carriers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (28). <https://doi.org/10.1073/pnas.0801786105>.
- Warburg, Otto, Franz Wind, and Erwin Negelein. 1927. "THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY." *Journal of General Physiology* 8 (6). <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
- Ward, Patrick S., and Craig B. Thompson. 2012. "Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006783>.
- Weerts, Marjolein J.A., Anieta M. Sieuwerts, Marcel Smid, Maxime P. Look, John A. Foekens, Stefan Sleijfer, and John W.M. Martens. 2016. "Mitochondrial DNA Content in Breast Cancer: Impact on *in Vitro* and *in Vivo* Phenotype and Patient Prognosis." *Oncotarget* 7 (20). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8688>.
- Wiedemann, Falk R., Detlef Siemen, Christian Mawrin, Thomas F. Horn, and Knut Dietzmann. 2006. "The Neurotrophin Receptor TrkB Is Colocalized to Mitochondrial Membranes." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38 (4). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.024>.
- Williams, John C, Albert Weijland, Stefania Gonfloni, Andy Thompson, Sara A Courtneidge, Giulio Superti-Furga, and Rik K Wierenga. n.d. "The 2.35 Å Crystal Structure of the Inactivated Form of Chicken Src: A Dynamic Molecule with Multiple Regulatory Interactions."
- Wu, Pingan, Xiaoxia Shi, Mengxin Luo, Inam-U-llah, Kaixin Li, Mengren Zhang, Jingran Ma, et al. 2020. "Taurine Inhibits Neuron Apoptosis in Hippocampus of Diabetic Rats and High Glucose Exposed HT-22 Cells via the NGF-Akt/Bad Pathway." *Amino Acids* 52 (1). <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02810-6>.
- Xu, Wenqing, Amish Doshi, Ming Lei, Michael J. Eck, and Stephen C. Harrison. 1999. "Crystal Structures of C-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism." *Molecular Cell* 3 (5). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80356-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80356-1).
- Yu, Hong, Icksoo Lee, Arthur R. Salomon, Keping Yu, and Maik Hüttemann. 2008. "Mammalian Liver Cytochrome c Is Tyrosine-48 Phosphorylated in Vivo, Inhibiting Mitochondrial Respiration." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1777 (7–8): 1066–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.023>.
- Zhou, Songyang, Steven E. Shoelson, Manas Chaudhuri, Gerald Gish, Tony Pawson, Wayne G. Haser, Fred King, et al. 1993. "SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences." *Cell* 72 (5). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90404-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90404-E).