

Evoluce eukaryotických ABC transportérů

bakalářská práce

Vojtěch Žárský

Katedra parazitologie PřFUK

2010

Abstrakt

V posledních dvaceti letech probíhal intenzivní výzkum v oblasti ABC transportérů. Zájem o tyto membránové transportéry je zapříčiněn především tím, že některé ABC transportéry hrají roli v rezistenci rakovinných buněk a patogenů vůči používaným léčivům. Tento lékařský aspekt ABC transportérů byl ve výzkumu pochopitelně výrazně upřednostňován. Z pohledu obecných fyziologických funkcí a evoluce byly pak ABC transportéry přehlíženy. V této práci se proto zaměřuji na evoluci eukaryotických ABC transportérů, přehled ABC transportérů parazitických protist a na mitochondriální ABC transportéry, které jsou nejkonzervativnějšími eukaryotickými ABC transportéry.

Klíčová slova: ABC transportér, parazitická protozoa, evoluce, mitochondrie, Fe-S centra

Abstract

In the past twenty years there has been a lot of research done on ABC transporters. This group of membrane transporters was recognized as highly important due to its ubiquity in living organisms and due to the involvement of some of the ABC transporters in multidrug resistance of cancer cells and pathogens against chemotherapeutics. This medical aspect of ABC transporters was naturally the most important one for the majority of researchers. On the other hand, the biological aspects and evolution of many ABC transporters remained untouched. In this work I give an overview of ABC transporters of parasitic protozoa and focus on the evolutionary aspect of eukaryotic transporters and on mitochondrial ABC transporters, which are the most conserved ones among eukaryotic ABC transporters.

Key words: ABC transporter, parasitic protozoa, evolution, mitochondrion, Fe-S clusters

OBSAH

1	Úvod	4
2	Klasifikace eukaryotických ABC transportérů	4
3	Evoluce eukaryotických ABC transportérů	7
3.1	Skupina "BCD"	7
3.2	Skupiny A a G	8
4	Struktura ABC transportérů	10
4.1	Funkční cyklus ABC transportérů	10
5	ABC transportér jako příčina nebo modulátor rezistence k chemoterapeutikům	12
5.1	Příklad rezistence k léčivům u Plasmodium falciparum	12
6	Mitochondriální ABC transportéry ATM	14
7	Transportéry skupiny CCM	18
8	Závěr	19
9	Přehled literatury	19

1 Úvod

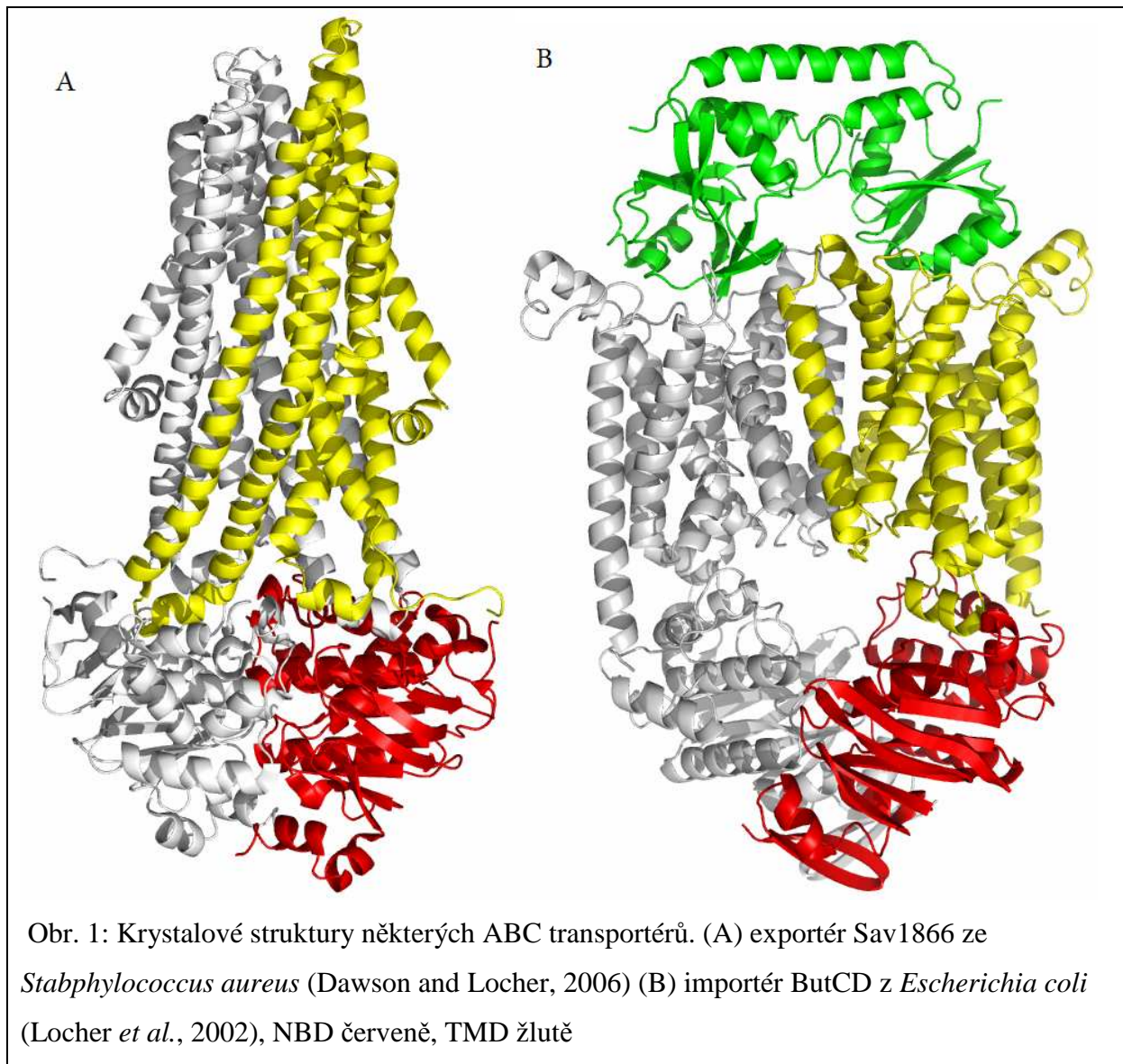
ABC transportéry jsou membránové proteiny schopné translokovat široké spektrum látek (od anorganických iontů až po peptidy, lipidy a jiné velké molekuly). Výzkum ABC transportérů probíhal od 70. let na systémech transportu aminokyselin u gramnegativních bakterií. Berger et al. vyčlenil komponenty importu, které přímo vyžadují ATP pro svoji funkci a jsou senzitivní vůči osmotickému stresu (Berger and Heppel, 1974). Higgins et al. publikoval kompletní sekvenci operonu importu histidinu *hisJQMP* u *S. typhimurium* (Higgins et al., 1982), následovala sekvence komponenty maltózoového transportéru *malK* u *E. coli* (Gilson et al., 1982b). Homologie mezi *hisP* a *malK* (což jsou atpázové domény bakteriálních ABC transportérů) vedla k hypotéze společného evolučního původu této skupiny proteinů (Gilson et al., 1982a). První charakterizovaný eukaryotický ABC transportér byl lidský exportér P-Glycoprotein/MDR1 (Gros et al., 1986), který byl již dříve popsán jako efektor rezistence rakovinných buněk vůči některým amfifilním cytotoxickým léčivům (Juliano and Ling, 1976). Pojem ABC transportér pak vznikl v roce 1990 jako zkratka pro "ATP-binding cassette" (Hyde et al., 1990). Recentní genomové projekty ukazují, že sekvence ABC proteinů (resp. sekvence jejich atpázových domén) jsou jedny z nejkonzervovanějších proteinových sekvencí, které nacházíme u všech buněčných organismů. Díky tomu se dokonce dostaly do zájmu teoretických astrobiologů (Isenbarger et al., 2008).

V této práci se po obecném úvodu zaměřím na evoluci eukaryotických ABC transportérů. Pro přiblížení problematiky rezistencí vůči různým xenobiotikům uvedu případ rezistence *P. falciparum*, při které hraje roli právě ABC transportér. Dále se budu věnovat mitochondriálním transportérům a tomu, co o nich mohou prozradit někteří prvoci. Nakonec zmíním zajímavý relikv po endosymbiotickém předku mitochondrie – transportéry skupiny CCM.

2 Klasifikace eukaryotických ABC transportérů

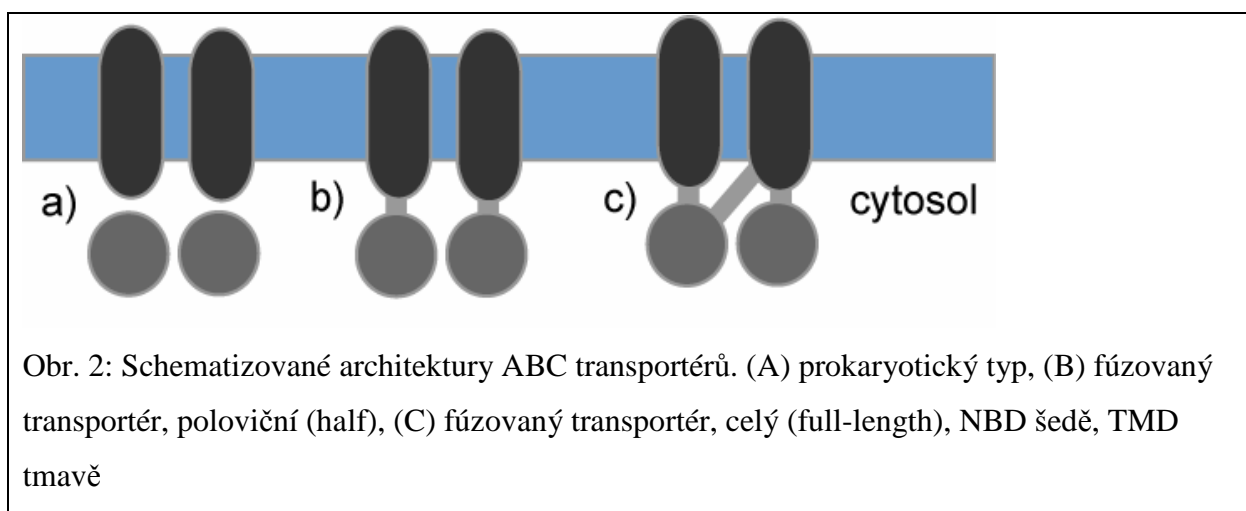
ABC transportéry jsou integrální proteiny, které se skládají ze dvou domén vázících nukleotidy (nucleotide binding domain, NBD) a dvou transmembránových domén (transmembrane domain, TMD) (Obr. 1). NBD jsou cytoplasmatické domény, které patří do velké skupiny "p-loop" atpáz, od jejichž zbytku se odlišují specifickým ABC motivem (ABC signature). NBD obsahují konzervativní úseky, které se účastní vazby a lytického cyklu ATP a interakce s transmembránovými doménami. Transmembránové domény jsou variabilní

membránové domény obsahující 5-15 α -helixů a odlišují se mezi skupinami ABC transportérů sekvenčně i organizací těchto domén.



ABC transportéry rozdělujeme na importéry a exportéry a dále pak podle architektury domén na prokaryotický typ a fúzané transportéry (Dassa and Bouige, 2001). Exportéry transportují substrát z cytoplasmy ven z buňky nebo do endomembránových kompartmentů; v případě mitochondriálních transportérů se jedná o transport z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Jednotlivé funkční domény ABC transportérů prokaryotického typu leží na separátních polypeptidech. Fúzané ABC transportéry jsou exportéry s TMD a NBD na jednom polypeptidovém řetězci. Možné varianty architektury fúzaných ABC transportérů mohou být vyjádřeny takto: NBD-TMD, (NBD-TMD)₂, TMD-NBD, (TMD-

NBD)₂ (Obr. 2). Pokud u fúzovaných ABC transportérů leží na jednom polypeptidu jedna NBD a TMD, nazýváme tyto transportéry "polovičními" (half). Pokud spolu na polypeptidu leží dvě nukleotid vážící domény a dvě transmembránové domény, jedná se o tzv. "celý" transportér (full-length). V prokaryotických genomech obvykle nacházíme velké množství importérů prokaryotického typu, ale i zástupce fúzovaných ABC transportérů. U eukaryot se vyskytují pouze fúzované ABC transportéry. Výjimkou z tohoto pravidla jsou ccmAB transportéry prokaryotického typu účastníci se maturace cytochromu C, které nacházíme kódované v mitochondriálních genomech některých rostlin a exkavátních prvoků (viz. kapitola "Transportéry skupiny CCM").



Nejrozšířenější jednotná klasifikace eukaryotických ABC transportérů je založena na systému lidských ABC proteinů, který je rozděluje na základě sekvenční podobnosti NBD do sedmi skupin A-G (Dean *et al.*, 2001). Tato klasifikace zároveň dobře vystihuje podobnosti ve funkcích a architekturách eukaryotických ABC transportérů. Kromě transportérů skupin A, B, C, D a G, jsou v této klasifikaci zahrnuty proteiny skupin E a F, které nemají transmembránové domény a nekonají funkci transportérů, ale účastní se různých jiných procesů obvykle souvisejících s rekombinací nebo translací. Známí zástupci skupin ABCE a ABCF jsou např. proteiny RLI (RNAse-L inhibitor) a SMC (Structural Maintenance of Chromosomes). Podrobnější analýzy eukaryotických ABC transportérů později potvrdily tuto klasifikaci jako správnou a ještě přidaly skupinu H, která je příbuzná skupině G a vyskytuje se u některých nematod a hmyzu.

3 Evoluce eukaryotických ABC transportérů

Všechny skupiny eukaryotických ABC transportérů mají větší či menší afinitu k bakteriálním sekvencím (ve smyslu prokaryota bez archaebakterií). Výjimkou je konzervovaný zástupce ABC proteinů skupiny E nazývaný RLI, který je jednoznačně archaebakteriálního původu. Podle evolučních minulostí lze rozdělit eukaryotické ABC transportéry na skupiny "BCD", A a G (Obr. 3).

Během evoluce eukaryotických ABC transportérů je patrný posun v sekvenci, architektuře i funkci, ke kterému došlo během vzniku eukaryotické buňky. Fylogenetická distribuce eukaryotických ABC transportérů je některými nazývána "dynamicky koherentní" (Sheps *et al.*, 2004) – při fylogenetických rekonstrukcích pozorujeme časté genové duplikace a ztráty, ale zastoupení skupin ABC transportérů je přitom fylogeneticky poměrně stabilní. Tuto vlastnost lze vysvětlit širokou substrátovou specifikou mnoha eukaryotických ABC transportérů, která může snižovat selekci proti genové ztrátě.

3.1 Skupina "BCD"

ABC transportéry skupin B, C a D tvoří na základě sekvenční podobnosti společnou skupinu. Tuto "BCD" skupinu lze charakterizovat dávnou fúzí TMD-NBD, ke které došlo před vznikem eukaryot a odštěpením jednotlivých BCD skupin. Nejrozšířenější a nejkonzervativnější transportéry této "BCD" skupiny jsou transportéry skupiny B. Díky tomu lze předpokládat, že ABC transportéry skupiny B s původní poloviční TMD-NBD architekturou představují archetypální zástupce "BCD" a ostatní zástupce ABCC a ABCD lze nahlížet jako derivované.

Přítomnost ABCD transportérů u některých proteobakterií a cyanobakterií naznačuje, že k odštěpení této skupiny došlo ještě před vznikem eukaryot. Eukaryotické ABCD transportéry jsou konzervativně asociovány s peroxisomy a chybí např. u většiny apikomplex, u kterých skutečně peroxisomy chybí. Naopak přítomnost sekvencí homologních k ABCD proteinům v genomu *Mastigamoeba balamuthi* (volně žijící příbuzný *Entamoeba histolytica* ze skupiny Archamoebae) naznačuje, že by tento prvok mohl mít peroxisomy, což by u anaerobního prvoka bylo velice neobvyklé. U ABCD transportérů nedocházelo k dalším fúzím, takže mají pouze TMD-NBD architekturu. Jako snad u většiny biologických pravidel však i zde existuje výjimka – suchozemské rostliny mají skupinu D velice zmnoženou a v několika případech u nich nalézáme (TMD-NBD)₂ architekturu (např. NP_568072.1 u *Arabidopsis thaliana*).

Proteiny skupiny C se zdají být jedinečné pro eukaryota a jsou charakterizovány fúzí dvou TMD-NBD jednotek za vzniku (TMD-NBD)₂ architektury. Na rozdíl od mnoha jiných podobných fúzí, ke kterým došlo v evoluci eukaryotických ABC transportérů, se v tomto případě jedná o jedinečnou fúzi, ke které došlo před rozdělením hlavních eukaryotických skupin. Při fylogenetických rekonstrukcích jednotlivých NBD ABCC proteinů je dobře patrná vyrovnaná koevoluce mezi N- a C- terminálními NBD doménami. Transportéry skupiny C dnešních eukaryot nacházíme v plasmatické membráně nebo v různých částech endomembránového systému, např. ve vakuolách a lysosomech.

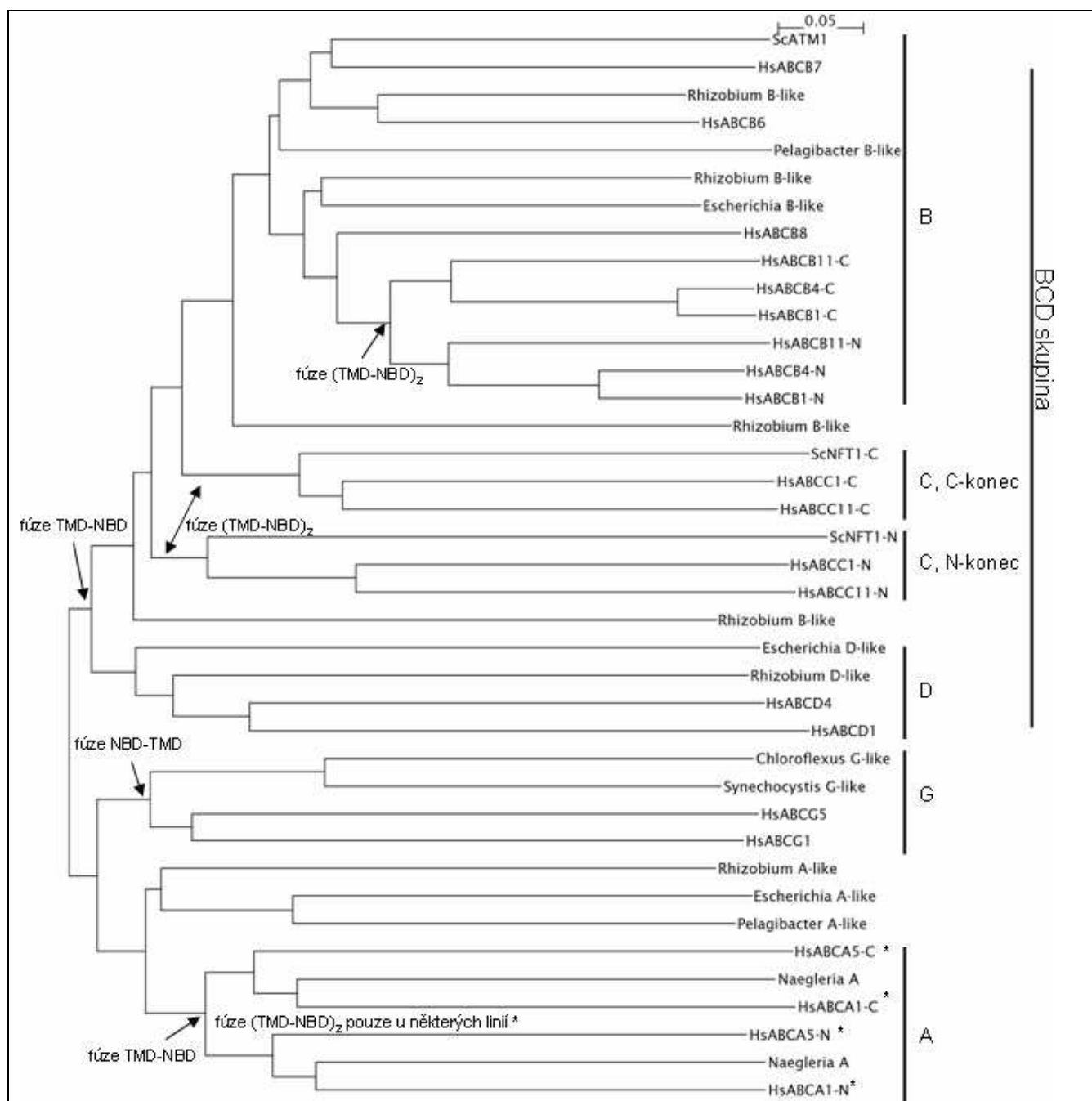
Skupina B obsahuje eukaryotické ABC transportéry, které mají jednoznačné ortology mezi alfa-proteobakteriálními transportéry. Mezi tyto transportéry patří i mitochondriální ATM (viz. kapitola "Mitochondriální ABC transportéry ATM"). Fylogenetická rekonstrukce proteinů skupiny B odhaluje, že eukaryotické ABCB proteiny tvoří monofyletickou skupinu a že k rozrůzněním hlavních skupin ABCB transportérů došlo před vznikem Eukaryot. Později pak u eukaryotických ABCB transportérů došlo několikrát nezávisle ke vzniku (TMD-NBD)₂ architektury. Tento typ architektury pak nahrává širší substrátové specifitě, rychlejší evoluci, ale i snadnější ztrátě v širších evolučních měřítkách.

3.2 Skupiny A a G

Evoluční původ skupin A a G není jednoznačný. Ke vzniku transportérů skupiny A muselo dojít před oddělením hlavních eukaryotických větví, přičemž došlo k fúzi TMD-NBD, podobně jako tomu je u skupiny "BCD". Následně pak podobně jako skupiny B docházelo k dalším fúzím za vzniku (TMD-NBD)₂ struktur. Transportéry skupiny A nacházíme obvykle v membránách endomembránového systému a v plasmatické membráně.

Na rozdíl od zbytku eukaryotických ABC transportérů, u vzniku skupiny G byla fúze obrácená, která vedla k architektuře NBD-TMD. V práci, která se zabývá bakteriálními kořeny eukaryotických ABC transportérů, vedla autory přítomnost proteinů skupiny G u některých bakterií skupin *Cyanobacteria* a *Actinobacteria* k závěru, že se jedná o horizontální přenos z eukaryot (Igarashi *et al.*, 2004). Autoři dále argumentovali tím, že některé tyto bakteriální homologы mají na N-konci doménu FHA (forked head-associated), která je známá hlavně z eukaryot, kde váže fosforylované peptidy. Nyní se však jeví jako pravděpodobnější, že ke vzniku skupiny ABCG došlo před vznikem eukaryot a že pozorované fylogenetické rozložení těchto proteinů je výsledkem ztrát u některých skupin recentních bakterií. FHA doména není u bakterií ve skutečnosti nijak zvlášť výjimečná a u žádných eukaryotických

ABCG proteinů ji nenajdeme. Horizontální genové transfery z eukaryot do bakterií jsou velmi vzácné a scénář přenosu ABCG do bakterií by se neobešel bez několika takových přenosů.



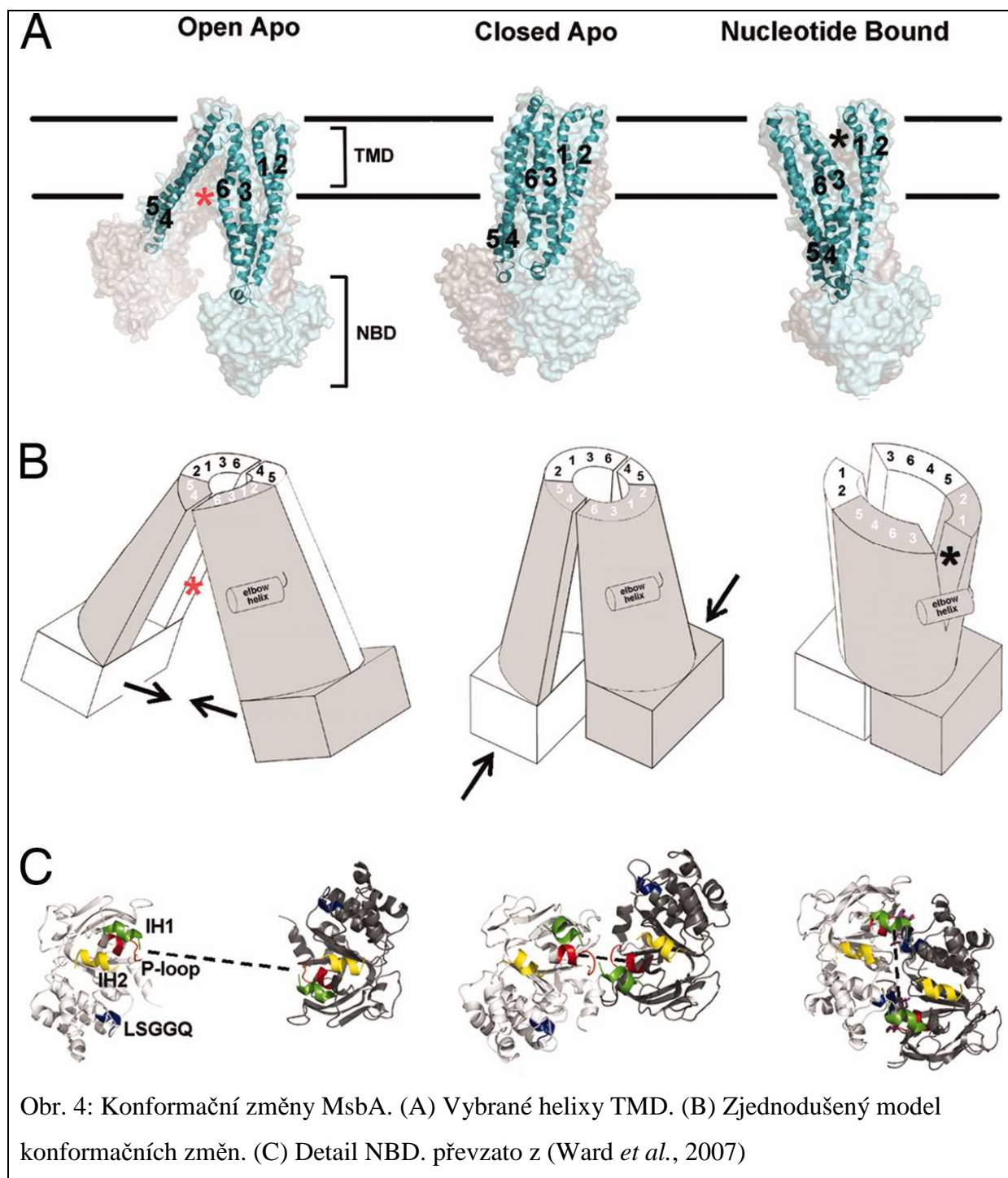
Obr. 3: Fylogenetický strom jednotlivých atpázových domén (NBD) zástupců eukaryotických ABC transportérů a vybraných prokaryotických homologů. U transportérů s celou architekturou jsou zvlášť vyznačeny N- a C-koncové domény. Hs: *Homo sapiens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Naegleria: *Naegleria gruberi*, Rhizobium: *Rhizobium leguminosarum*, Pelagibacter: *Pelagibacter ubique*, Escherichia: *Escherichia coli*, Chloroflexus: *Chloroflexus aurantiacus*, Synechocystis: *Synechocystis sp.*

4 Struktura ABC transportérů

Strukturních informací o ABC transportérech donedávna nebylo mnoho. Roku 2001 byla publikována první struktura celého ABC transportéru MsbA z *E. coli* (Chang and Roth, 2001). Za pomoci této struktury pak byla stejnou skupinou určena další struktura MsbA z *Vibrio cholerae* (Chang, 2003). Až roku 2006 se další skupině povedlo vykrytalizovat příbuzný transportér Sav1866 ze *Staphylococcus aureus* (Obr. 1A) (Dawson *et al.*, 2006). Tato krystalová struktura měla lepší rozlišení (3.0 Å) než předchozí (4.5 Å) a prokázala jejich chybnost. Následovalo pak několik dalších strukturálních studií ABC transportérů: molybdátový importér ModABC z *Archaeoglobus fulgidus* (Hollenstein *et al.*, 2007b), importér vitamínu B12 BtuCD z *Escherichia coli* (Obr. 1B) (Hvorup *et al.*, 2007) a myší exportér MDR1 (Aller *et al.*, 2009). Struktura transportéru MsbA byla přehodnocena ve světle posledních poznatků a krystalových struktur s lepším rozlišením než byly ty předchozí (Ward *et al.*, 2007). Výsledkem byla dobrá strukturální podobnost MsbA s transportérem Sav1866.

4.1 Funkční cyklus ABC transportérů

Vývoj v poznání struktur ABC transportérů vedl k vytvoření modelu jejich funkčního cyklu (Hollenstein *et al.*, 2007a). Základní myšlenkou této hypotézy je změna stavů transmembránových domén - ven nebo dovnitř ("inward-facing", "outward-facing"), která je spojena s lytickým cyklem ATP a se změnou přístupnosti vazebných míst pro substrát (Obr. 4).



Exportér s nenávaným ATP se nachází ve formě, kdy jsou od sebe NBD více či méně vzdáleny a translokační tunel je otevřen "dovnitř", což umožňuje vazbu translokovaného substrátu na specifická vazebná místa. Po navázání ATP dojde k těsnému přiblížení NBD, což způsobí překlopení translokačního tunelu a jeho otevření směrem ven. Během této změny se změní místa interagující se substrátem a ten je následně uvolněn na opačné straně membrány. Tento model poukazuje na to, jak důležité jsou pro určení substrátové specifity a směru transportu transmembránové domény.

5 ABC transportér jako příčina nebo modulátor rezistence k chemoterapeutikům

Význam ABC transportérů při vzniku rezistence (multidrug resistance - MDR) k léčivům byl prokázán u celé řady parazitických prvků (Sauvage *et al.*, 2009). Jedná se převážně o "celé" transportéry (full-length) skupin B, C a G. (Přehled zastoupení skupin ABC transportérů u vybraných prvků viz. tabulka 1.) Jako možné efekторы rezistence parazitů vůči xenobiotikům se udávají tyto mechanismy: aktivní vypuzování, omezený příjem, modifikace cíle daného xenobiotika, modifikace, ukládání a kompetice (Jones and George, 2005). Typický zástupce MDR proteinů je lidský P-Glykoprotein (syn. MDR1, ABCB1). Tento transportér může komplikovat léčbu různých typů rakovin tím, že je schopen exportovat široké spektrum cytotoxických látek. V některých jiných případech se však ukazuje, že ABC transportéry mohou způsobovat rezistenci i jinými mechanismy než pouhým exportem xenobiotika.

	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCG
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	12	12	0	1
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0	2	15	1	2
<i>Plasmodium falciparum</i>	0	8	2	0	1
<i>Leishmania major</i>	20	9	16	3	6
<i>Trypanosoma brucei</i>	4	7	6	3	4
<i>Giardia intestinalis</i>	14	2	6	0	1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	47	33	0	2	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	9	18	2	15
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	0	5	0	0	5

tabulka 1: Zastoupení skupin ABC transportérů mezi vybranými parazitickými prvky.

5.1 Příklad rezistence k léčivům u *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum je prvek ze skupiny Apicomplexa, který způsobuje nejrozšířenější a nejnebezpečnější formu lidské malárie. Ve čtyřicátých letech minulého století se začalo používat antimalarikum chlorochin, který se v určitých případech používá dodnes. Jednou z největších komplikací léčby je rezistence některých kmenů, která se začala objevovat v různých částech světa (BOX *et al.*, 1963; YOUNG *et al.*, 1963). Rezistence *P. falciparum* vůči chlorochinu se zdála být podobná MDR savčích rakovinných buněk. Bylo prokázáno, že rezistentní buňky akumulují méně chlorochinu a že lze obnovit citlivost verapamilem, což je

známý inhibitor MDR transportérů (Krogstad *et al.*, 1987). (více o antimalarikách viz. rámeček Antimalarická léčiva)

Genom *P. falciparum* nese na pátém chromosomu gen podobný lidskému MDR1/ABCB1 zvaný PfABCB1. Protein PfABCB1 je lokalizovaný v parazitické potravní vakuole (účinném místě většiny antimalarik) a v menší míře pak také na plasmatické membráně (Cowman *et al.*, 1991). U některých izolátů rezistentních k chlorochinu jsou některé alelické varianty tohoto genu amplifikovány (Foote *et al.*, 1989). Pomocí křížení rezistentních kmenů bylo ale zjištěno, že alela, která je přímo zodpovědná za rezistenci k chlorochinu, leží na chromosomu 7 (Wellems *et al.*, 1990). Později byla tato alela identifikována jako gen pro transportér CRT (chloroquine resistance transporter), který je lokalizován v membráně parazitické potravní vakuoly a jehož mutace způsobují rezistenci vůči chlorochinu (Fidock *et al.*, 2000). Úloha PfABCB1 se tedy v tomto případě ukázala být pouze modulační.

Vzhledem k rozmáhající se rezistenci vůči chlorochinu se začaly nasazovat nové léky, jako je např. meflochin nebo artemisin. Úloha PfABCB1 při snížené citlivosti proti těmto lékům byla jednoznačně prokázána. Například u thajských izolátů je amplifikace PfABCB1 spolehlivým molekulárním markerem meflochinové rezistence a mutace v PfABCB1 genu vedou ke zvýšené citlivosti k meflochinu (Price *et al.*, 2004). Je zajímavé, že *in vitro* navozená rezistence k meflochinu zároveň zvyšuje rezistenci k artemisinu, ale naopak zvyšuje citlivost k chlorochinu (Sidhu *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 1993).

Ukazuje se, že PfABCB1 má širokou substrátovou specifitu, která může být modulována mutacemi v tomto genu. PfABCB1 je uložen ve vakuolární membráně tak, že jeho NBD jsou v cytoplasmě a je tedy schopen transportovat substráty z cytoplasmy do vakuoly (Karcz *et al.*, 1993). V tomto případě lze uvažovat dva možné mechanismy působení PfABCB: buď přímo transportuje léčiva do vakuoly, nebo do vakuoly transportuje jiné molekuly, které mohou modulovat léčivo popř. jeho toxické produkty. Eseje s fluorescenční barvou Fluo-4 ukázaly, že mutace v PfABCB1, které vedou ke snížené citlivosti k meflochinu, jsou asociovány se zvýšenou akumulací této barvy v potravní vakuole (Rohrbach *et al.*, 2006). To by naznačovalo, že při této mutaci nedochází ke snížení míry transportu, ale naopak snad k jeho zvýšení popř. ke změně substrátové specifity. Není tedy vyloučeno, že jedním ze substrátů PfABCB1 je např. glutathion, který pak může ve vakuole modulovat oxidativní stres, který nepochybně provází účinek antimalarik.

rámeček: Antimalarická léčiva

Chinin (quinine) je nejstarší antimalarikum známé pro západní svět, které je jako celá řada ostatních derivátů aromatického chinonu. Přírodním zdrojem chininu je kůra původně jihoamerických keřů rodu *Cinchona* ze skupiny *Rubiaceae*. Chinin byl používán jako hlavní antimalarikum až do 40. let minulého století, kdy byl zaveden chlorochinon. **Chlorochinon** (chloroquinone) byl až donedávna nejpoužívanějším antimalarikem, vůči kterému v důsledku masivního užívání začaly v různých oblastech vznikat rezistentní kmeny. Chlorochinon je schopen díky své hydrofobicitě difundovat membránami do napadených červených krvinek a pak dále do parazitické digestivní vakuoly. V kyselém prostředí vakuoly je chlorochinon protonován, čímž se zabrání zpětné difúzi ven z vakuoly. Chlorochinon se pak váže na hem a zabraňuje jeho krystalizaci (což je důležitý krok pro detoxifikaci hemu). Toxický volný hem a komplex chlorochinu a hemu nakonec působí lýzu a smrt buňky parazita (Slater, 1993).

Halofantrin (halofantrine) je další derivát chinonu, u kterého byla diskutována značná rizika vedlejších účinků, jako je např. kardiotoxicita nebo arytmie srdce. **Meflochin** (mefloquine) je lék vyvinutý během války ve Vietnamu. Dnes se používá u rezistentních kmenů obvykle v kombinaci s deriváty artemisininu. **Artemisin** (artemisinine) je nejstarší dokumentované antimalarikum, jehož účinky byly v čínské literatuře prokazatelně popsány v polovině čtvrtého století. Mechanismus účinku artemisininu není vyjasněný. Jedna z hypotéz předpokládá reakci redukováného železa uvolněného degradací hemu s artemisininem. Redukce intramolekulární peroxidové vazby artemisininu spustí radikálovou kaskádu vedoucí k produkci toxických reaktivních forem kyslíku (Olliaro *et al.*, 2001).

6 Mitochondriální ABC transportéry ATM

Nejkonzervativnější eukaryotický ABC transportér je poloviční transportér skupiny B lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně nazývaný Atm1 podle kvasinkového zástupce Atm1 (ABC Transporter of the Mitochondria). Pravděpodobně se také jedná o jediný esenciální eukaryotický ABC transportér. Ortology tohoto proteinu nacházíme ve všech známých eukaryotických genomech s výjimkou některých anaerobních prvoků, jako jsou např. *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* a *Entamoeba histolytica*.

Mutace v lidském homologu zvaném ABCB7 způsobují u mužů vzácnou chorobu zvanou XLSA/A (X-linked sideroblastic anemia and ataxia), při které dochází ke zhoršené produkci hemoglobinu a akumulaci železa v krvinkách (Allikmets *et al.*, 1999) a následně

narušené koordinaci pohybu pacienta. XLSA/A může být také způsobena mutacemi v genu pro frataxin, což je mitochondriální protein důležitý pro správný metabolismus železa a tvorbu Fe-S center. (Pro více informací o Fe-S centrech a jejich tvorbě viz rámeček Biogeneze Fe-S center.)

Tradičním modelem pro výzkum metabolismu železa a Fe-S center v mitochondrii je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Odstranění genu *Atm1* v kvasince způsobuje ztrátu cytochromů, neschopnost respirace a nestabilitu mitochondriálního genomu (Leighton and Schatz, 1995). Dále bylo zjištěno, že se v mitochondrii $\Delta atm1$ kmenů akumuluje železo (výrazně více než u mutantů frataxinu) a zároveň se buňka chová, jako kdyby měla nedostatek železa, a stimuluje mechanismy příjmu železa (Kispal *et al.*, 1997).

Mitochondrie jsou centrální organelou pro tvorbu Fe-S center a maturaci Fe-S proteinů v celé buňce. Právě *Atm1* se ukázal být esenciální pro maturaci cytoplasmatických Fe-S proteinů (Kispal *et al.*, 1999), nikoliv však pro tvorbu mitochondriálních Fe-S proteinů. Další známé mitochondriální komponenty, které jsou potřebné specificky pro tvorbu cytosolických Fe-S proteinů, jsou *Erv1* (Lange *et al.*, 2001) a glutathion (Sipos *et al.*, 2002). *Erv1* je sulfhydryl oxidáza mezimembránového prostoru mitochondrie. Je známo, že *Erv1* je součástí importní dráhy některých malých cysteinových proteinů mezimembránového prostoru (například malé TIM proteiny), přičemž dochází k zavádění disulfidických můstků do těchto importovaných proteinů (Allen *et al.*, 2005).

Co stále zůstává otevřenou otázkou, je povaha substrátu, který je transportován *Atm1*. To, že se akumuluje železo v mitochondriích $\Delta atm1$ kvasinek, vedlo některé vědce k názoru, že *Atm1* transportuje železo. Tento pohled nejspíše neobstojí vzhledem k výzkumu na homologu *Atm1* v *Arabidopsis thaliana*, nazvaném *Stal* nebo také *AtAtm3*. *AtAtm3* byl schopen plně nahradit *Atm1* u $\Delta atm1$ kvasinek (Chen *et al.*, 2007). Pečlivá analýza *AtAtm3* mutantů u *A. thaliana* vedla ke zjištění, že u tohoto organismu je *AtAtm3* důležitý pro maturaci cytosolických Fe-S proteinu, ale nedochází k žádným dramatickým změnám v metabolismu železa (Bernard *et al.*, 2009). To ukazuje, že rozvrat v metabolismu železa kvasinek a lidských buněk s narušeným *Atm1* je zapříčiněn regulačním mechanismem, který je pravděpodobně závislý na cytosolických Fe-S proteinech. Nejedná se přímo o narušení exportu železa z mitochondrie.

Nejjednodušším vysvětlením tedy může být přímo transport Fe-S centra. Tento model je však také problematický, neboť Fe-S centra jsou málo stabilní a transport celého holoproteinu s navázaným Fe-S centrem je vzhledem k jeho velikosti jen těžko představitelný. *In vitro* eseje s *Atm1* rekonstituovaným v proteoliposomech ukázaly, že atpázová aktivita

transportéru je obecně stimulována peptidy s volnými thiolovými skupinami (Kuhnke *et al.*, 2006). Během těchto pokusů nebyl bohužel prokázán přímo transport těchto látek, takže se jedná pouze o další nepřímou indicii.

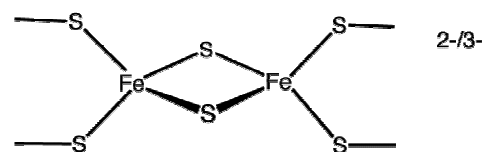
Při uvažování substrátu Atm1 je třeba také uvažovat o tom, že Atm1 je ve vnitřní mitochondriální membráně a substrát se tedy neocitne v cytoplasmě, ale v mitochondriální periplasmě, která má velice specifické chemické podmínky a nepochybně ještě skrývá mnohá překvapení. Otázkou tedy může také být, jestli se substrát Atm1 po translokaci do mezimembránového prostoru nestává substrátem Erv1.

Zajímavý aspekt, ke kterému je třeba také přihlížet, je nepřítomnost Atm1 ortologů u anaerobních prvoků, jakými jsou např. *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* a *Entamoeba histolytica*. V genomech *T. vaginalis* a *E. histolytica* jsou zachovány alespoň podobné transportéry příbuzné mitochondriálnímu Mdl1 z *S. cerevisiae*, jehož overexprese v $\Delta atm1$ kvasinkách částečně potlačuje fenotyp tohoto mutantu (Chloupkova *et al.*, 2003). V případě *T. vaginalis* a *E. histolytica* lze tedy spekulovat, že tyto podobné ABC transportéry byly schopny v evoluci nahradit Atm1. Naprostou záhadou je pak situace u *G. intestinalis*, v jejímž genomu lze najít jen jednoho zástupce transportérů skupiny B, který je velmi divergentní, takže neumožňuje přesvědčivé přiřazení k některé užší skupině ABC transportérů. Přitom bylo prokázáno, že centrální komponenty tvorby Fe-S center (IscU, IscS) jsou konzervované i u *G. intestinalis* a jsou targetované do jejich silně redukované mitochondrie (mitosomu) (Tovar *et al.*, 2003). Co je tedy pojitkem mezi mitosomální tvorbou Fe-S center a cytoplasmatickými a nukleárními Fe-S proteiny *G. intestinalis*, je nejasné. Tento případ naznačuje, že přímý přenos Fe-S centra pomocí Atm1 je málo pravděpodobný – tuto funkci bychom pak očekávali i u mitosomů *G. intestinalis*, ale výkonný protein by nám chyběl.

rámeček: Biosyntéza Fe-S center

Fe-S centra jsou jednoduché anorganické kofaktory, které se váží na cysteiny celé řady důležitých Fe-S proteinů. Železo těchto center je schopno měnit oxidativní stav mezi +2 a +3. Známé Fe-S proteiny jsou např. ferredoxiny, NADH dehydrogenáza (komplex I), succinát dehydrogenáza (komplex II), akonitáza, nitrogenáza, RLI (ABC protein skupiny E) aj.

Nejjednodušší forma [2Fe-2S] vypadá takto:



Přestože chemická syntéza Fe-S center není nijak zvlášť náročná, v buňce se jedná o dosti specializovaný a regulovaný proces. To je pravděpodobně dáno tím, že volné redukované železo může reagovat s kyslíkem za vzniku toxických reaktivních forem kyslíku. U eukaryot nacházíme ISC systém pro tvorbu Fe-S center, který zdělila po bakteriálním předku mitochondrie. Všechny komponenty tohoto systému jsou lokalizovány v mitochondrii. Výjimkami jsou některé isoformy lidského IscS, které lokalizují v cytoplasmě a jádru (Land and Rouault, 1998; Nakai *et al.*, 2001) a IscU z mikrosporidie *Trachipleistophora hominis*, který je pravděpodobně lokalizovaný v cytoplasmě (Goldberg *et al.*, 2008).

Základní komponentou tvorby Fe-S center je cystein desulfuráza IscS. IscS je pyridoxal 5'-fosfát dependentní dimerický protein, který katalyzuje konverzi L-cysteinu na L-alanin, přičemž vzniká persulfid navázaný na konzervovaném cysteinovém residuu (Mihara and Esaki, 2002; Schwartz *et al.*, 2000). Síra se dále přenáší na tzv. scaffold protein IscU (Urbina *et al.*, 2001) na kterém dochází ke koordinaci Fe-S centra. Pro tuto reakci je potřebný donor železa frataxin (Babcock *et al.*, 1997; Bulteau *et al.*, 2004) a zdroj elektronů pro redukci S^0 persulfidu na S^{-2} , kterým je mitochondriální ferredoxin a NADH dependentní ferredoxin reduktáza (Jung *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2000). Pro další přenos Fe-S centra z IscU na apoproteiny jsou potřeba další proteiny, mezi které patří mitochondriální Hsp70 (v případě *S. cerevisiae* Ssq1) a jeho cochaperon Jac1, který patří do rodiny Hsp40/DnaJ proteinů (Lutz *et al.*, 2001).

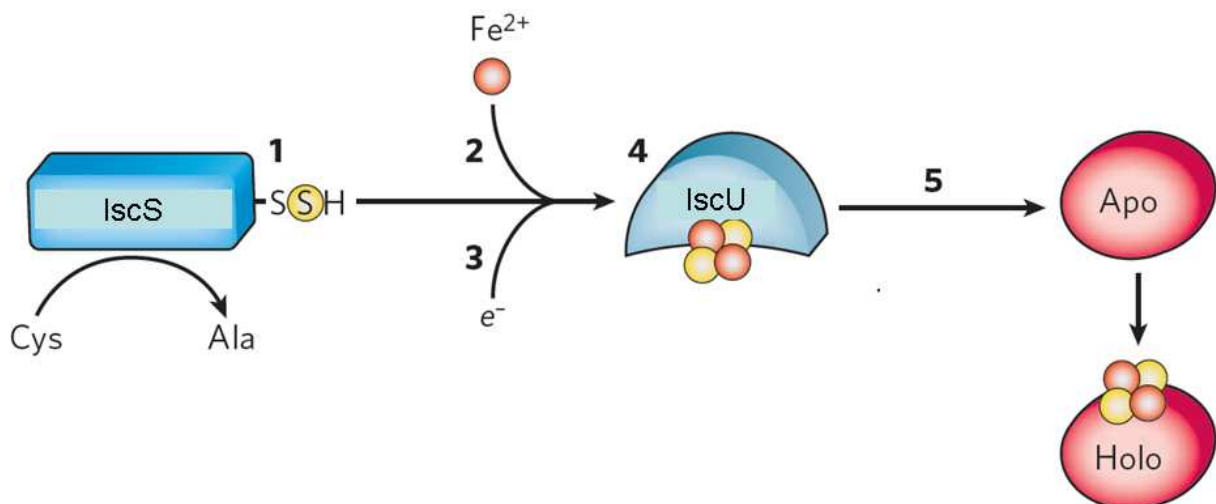


Schéma tvorby Fe-S center s názvoslovím odvozeným od proteinů *S. cerevisiae*: (1) cystein desulfuráza - IscS1/Nfs1, (2) donor železa - frataxin Yfh1, (3) donor elektronů - ferredoxin Yah1 a NADH dependentní ferredoxin oxidoreduktáza Arh1, (4) scaffold - IscU, (5) přenos Fe-S centra do apoproteinů - Ssq1-Jac1. převzato z (Lill, 2009)

7 Transportéry skupiny CCM

ABC transportéry *ccmAB* (Cytochrome C Maturation) jsou exportéry prokaryotické typu účastníci se maturace cytochromu c typu 1. Jedná se o proteiny složené ze separátních podjednotek – *CcmA* kóduje NBD, *CcmB* kóduje TMD. Předpokládá se, že se transportér *ccmAB* účastní exportu hemu do periplasmatického prostoru gramnegativních bakterií popř. do mezimembránového prostoru mitochondrií. Důležité součásti typického CCM systému jsou dále *ccmC* - protein interagující s hemem (heme interacting protein) a *ccmF* - hem lyáza. Většina eukaryot má jiný systém maturace hemu tzv. CCHL/3 (Hamel *et al.*, 2009).

Proteiny pro CCM typ maturace hemu nalézáme v mitochondriích rostlin a některých exkavátních prvoků. U *Arabidopsis thaliana* je protein *ccmA* kódovaný v jádře a *ccmB* mitochondriálním genomem, nicméně interakce podjednotek *ccmA* a *ccmB* byla experimentálně potvrzena (Rayapuram *et al.*, 2007). Geny *ccmABCF* si v mitochondriálním genomu *Reclinomonas americana* zachovaly operonovou strukturu. U *Malawimonas jakobiformis* zůstaly mitochondriálně kódované pouze geny *ccmB* a *ccmC*, nelze ale vyloučit transfer *ccmA* do jádra podobně jako k tomu došlo u rostlin. V mitochondriálním genomu *Naegleria gruberi* zůstaly pouze geny *ccmC* a *ccmF*. Prohledávání sekvence nukleárního genomu (Fritz-Laylin *et al.*, 2010) neodhalila žádné další *ccmA* nebo *ccmB* geny. Vidíme zde tedy celé spektrum různě zachovaných drah CCM (viz. tabulka 2).

	<i>ccmA</i>	<i>ccmB</i>	<i>ccmC</i>	<i>ccmF</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	jádro	mito	mito	mito
<i>Reclinomonas americana</i>	mito	mito	mito	mito
<i>Malawimonas jakobiformis</i>	?	mito	mito	mito
<i>Naegleria gruberi</i>	-	-	mito	mito

tabulka 2: Přehled CCM proteinů u vybraných eukaryot. jádro: protein kódovaný jaderným genomem, mito: protein kódovaný v mitochondriálním genomu

Je zajímavé, že výskyt těchto genů v organelárních genomech koreluje s přítomností některých podjednotek twin-arginin translokáz (*tat*) proteinového transportního systému, který nalézáme v bakteriálních membránách a který byl popsán i v thylakoidech chloroplastů některých vyšších rostlin (Chaddock *et al.*, 1995). Snad je to zapříčiněno tím, že je *tat* systém důležitý pro maturaci některých z hydrofóbních membránových proteinů (*ccmB*, *ccmC*) nebo ještě jiným způsobem interaguje s maturační mašinerií CCM.

8 Závěr

Na příkladu evoluce eukaryotických ABC transportérů můžeme pozorovat několik velice zajímavých fenoménů. Jedná se především o případy konvergentních fúzí TMD a NBD u všech skupin eukaryotických ABC transportérů, které byly následovány dalšími fúzemi za vzniku (TMD-NBD)₂ architektur nebo architektury (NBD-TMD)₂ v případě skupiny G. Dále je u většiny skupin patrný skokový posun v sekvencích i funkci, ke kterému došlo během vzniku eukaryotické buňky. Posledním reliktem, kterého se tyto události takřka netýkají, jsou transportéry CCM systému maturace hemu, které nacházíme kódované v mitochondriálních genomech některých suchozemských rostlin a exkavátních prvoků.

Výzkum podobných dílčích událostí v evoluci eukaryot snad povede k lepšímu pochopení vzniku eukaryot nebo nám alespoň pomůže pochopit, proč této události tak málo rozumíme.

9 Přehled literatury

1. Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, and Tokatlidis K (2005) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol*, **353**, 937-944.
2. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, and Chang G (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, **323**, 1718-1722.
3. Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, and Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet*, **8**, 743-749.
4. Babcock M, de SD, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, and Kaplan J (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, **276**, 1709-1712.
5. Berger EA and Heppel LA (1974) Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **249**, 7747-7755.
6. Bernard DG, Cheng Y, Zhao Y, and Balk J (2009) An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **151**, 590-602.

7. Box ED, Box QT, and Young MD (1963) Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum from Porto Velho, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, **12**, 300-304.
8. Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, and Szweda LI (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science*, **305**, 242-245.
9. Chaddock AM, Mant A, Karnauchov I, Brink S, Herrmann RG, Klosgen RB, and Robinson C (1995) A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J*, **14**, 2715-2722.
10. Chang G (2003) Structure of MsbA from Vibrio cholera: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol*, **330**, 419-430.
11. Chang G and Roth CB (2001) Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, **293**, 1793-1800.
12. Chen S, Sanchez-Fernandez R, Lyver ER, Dancis A, and Rea PA (2007) Functional characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a subfamily of Arabidopsis half-molecule ATP-binding cassette transporters implicated in iron homeostasis. *J Biol Chem*, **282**, 21561-21571.
13. Chloupkova M, LeBard LS, and Koeller DM (2003) MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J Mol Biol*, **331**, 155-165.
14. Cowman AF, Karcz S, Galatis D, and Culvenor JG (1991) A P-glycoprotein homologue of Plasmodium falciparum is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol*, **113**, 1033-1042.
15. Dassa E and Bouige P (2001) The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol*, **152**, 211-229.
16. Dawson RJ and Locher KP (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, **443**, 180-185.
17. Dean M, Hamon Y, and Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, **42**, 1007-1017.
18. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, and Wellems TE (2000) Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*, **6**, 861-871.
19. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, and Kemp DJ (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of P. falciparum. *Cell*, **57**, 921-930.
20. Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredes A, Chapman J, Pham J, Shu S, Neupane R, Cipriano M, Mancuso J, Tu H,

- Salamov A, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grigoriev IV, Cande WZ, Fulton C, Rokhsar DS, and Dawson SC (2010) The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell*, **140**, 631-642.
21. Gilson E, Higgins CF, Hofnung M, Ferro-Luzzi AG, and Nikaido H (1982a) Extensive homology between membrane-associated components of histidine and maltose transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **257**, 9915-9918.
 22. Gilson E, Nikaido H, and Hofnung M (1982b) Sequence of the *malK* gene in *E. coli* K12. *Nucleic Acids Res*, **10**, 7449-7458.
 23. Goldberg AV, Molik S, Tsaousis AD, Neumann K, Kuhnke G, Delbac F, Vivares CP, Hirt RP, Lill R, and Embley TM (2008) Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature*, **452**, 624-628.
 24. Gros P, Croop J, and Housman D (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, **47**, 371-380.
 25. Hamel P, Corvest V, Giege P, and Bonnard G (2009) Biochemical requirements for the maturation of mitochondrial c-type cytochromes. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 125-138.
 26. Higgins CF, Haag PD, Nikaido K, Ardeshir F, Garcia G, and Ames GF (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature*, **298**, 723-727.
 27. Hollenstein K, Dawson RJ, and Locher KP (2007a) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **17**, 412-418.
 28. Hollenstein K, Frei DC, and Locher KP (2007b) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, **446**, 213-216.
 29. Hvorup RN, Goetz BA, Niederer M, Hollenstein K, Perozo E, and Locher KP (2007) Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science*, **317**, 1387-1390.
 30. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, and Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, **346**, 362-365.
 31. Igarashi Y, Aoki KF, Mamitsuka H, Kuma K, and Kanehisa M (2004) The evolutionary repertoires of the eukaryotic-type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes. *Mol Biol Evol*, **21**, 2149-2160.
 32. Isenbarger TA, Carr CE, Johnson SS, Finney M, Church GM, Gilbert W, Zuber MT, and Ruvkun G (2008) The most conserved genome segments for life detection on Earth and other planets. *Orig Life Evol Biosph*, **38**, 517-533.

33. Jones PM and George AM (2005) Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *Int J Parasitol*, **35**, 555-566.
34. Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, **455**, 152-162.
35. Jung YS, Gao-Sheridan HS, Christiansen J, Dean DR, and Burgess BK (1999) Purification and biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein. *J Biol Chem*, **274**, 32402-32410.
36. Karcz SR, Galatis D, and Cowman AF (1993) Nucleotide binding properties of a P-glycoprotein homologue from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **58**, 269-276.
37. Kispal G, Csere P, Guiard B, and Lill R (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett*, **418**, 346-350.
38. Kispal G, Csere P, Prohl C, and Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J*, **18**, 3981-3989.
39. Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, and Schlesinger PH (1987) Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*, **238**, 1283-1285.
40. Kuhnke G, Neumann K, Muhlenhoff U, and Lill R (2006) Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds. *Mol Membr Biol*, **23**, 173-184.
41. Land T and Rouault TA (1998) Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol Cell*, **2**, 807-815.
42. Lange H, Kaut A, Kispal G, and Lill R (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1050-1055.
43. Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, and Lill R (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep*, **2**, 715-720.
44. Leighton J and Schatz G (1995) An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J*, **14**, 188-195.
45. Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, **460**, 831-838.
46. Locher KP, Lee AT, and Rees DC (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
47. Lutz T, Westermann B, Neupert W, and Herrmann JM (2001) The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol*, **307**, 815-825.

48. Mihara H and Esaki N (2002) Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60**, 12-23.
49. Nakai Y, Nakai M, Hayashi H, and Kagamiyama H (2001) Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem*, **276**, 8314-8320.
50. Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, and Yuthavong Y (2001) Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol*, **17**, 122-126.
51. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, and Krishna S (2004) Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet*, **364**, 438-447.
52. Rayapuram N, Hagenmuller J, Grienemberger JM, Giege P, and Bonnard G (2007) AtCCMA interacts with AtCcmB to form a novel mitochondrial ABC transporter involved in cytochrome c maturation in Arabidopsis. *J Biol Chem*, **282**, 21015-21023.
53. Rohrbach P, Sanchez CP, Hayton K, Friedrich O, Patel J, Sidhu AB, Ferdig MT, Fidock DA, and Lanzer M (2006) Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in Plasmodium falciparum. *EMBO J*, **25**, 3000-3011.
54. Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, and Villena I (2009) The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol*, **167**, 81-94.
55. Schwartz CJ, Djaman O, Imlay JA, and Kiley PJ (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9009-9014.
56. Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, and Ling V (2004) The ABC transporter gene family of Caenorhabditis elegans has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol*, **5**, R15.
57. Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, and Fidock DA (2006) Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*, **194**, 528-535.
58. Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, and Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem*, **277**, 26944-26949.
59. Slater AF (1993) Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum. *Pharmacol Ther*, **57**, 203-235.
60. Tovar J, Leon-Avila G, Sanchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernandez M, Muller M, and Lucocq JM (2003) Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, **426**, 172-176.
61. Urbina HD, Silberg JJ, Hoff KG, and Vickery LE (2001) Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J Biol Chem*, **276**, 44521-44526.

62. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, and Chang G (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19005-19010.
63. Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, and Krogstad DJ (1990) Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, **345**, 253-255.
64. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, and Wirth DF (1993) Amplification of pfmdr 1 associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol*, **57**, 151-160.
65. Young MD, Contacos PG, Stitche JE, and Millar JW (1963) Drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, **12**, 305-314.