

Obsah

Důležité zkratky	2
1. Úvod.....	3
2. Klasifikace mitochondriálních proteáz.....	4
3. ATP-dependentní AAA+ proteázy	5
3.1 <i>ClpXP proteáza.....</i>	8
3.1.1 ClpX a ClpP: Podjednotky ClpXP komplexu.....	8
3.1.2 Genetika a struktura ClpP podjednotky	8
3.1.3 Genetika a struktura ClpX podjednotky	9
3.1.4 ClpX a ClpP asociují do multimerních komplexů	10
3.1.5 Funkce lidského ClpXP a jeho patologie	10
3.2 <i>Lon Proteáza.....</i>	11
3.2.1 Doménová struktura	11
3.2.2 Genetika, translace, translokace do matrix, maturace a asemblace.....	12
3.2.3 Aktivita	13
3.2.4 Rozmanité funkce Lon proteázy a její patologie	14
3.3 <i>m-AAA a i-AAA proteázy.....</i>	15
3.3.1 Isoenzymy podjednotek AAA proteáz	16
3.3.2 Lokalizace a struktura AAA proteáz	16
3.3.3 Aktivity AAA proteáz	18
3.3.4 Asociace AAA komplexů s dalšími proteiny	20
3.3.5 Tři skupiny substrátů AAA proteáz.....	21
3.3.6 Role m-AAA v dědičné spastické paraplegii a dalších onemocněních.....	22
4 Procesující peptidázy.....	24
4.1 <i>MPP.....</i>	24
4.2 <i>MIP a Icp55.....</i>	25
4.3 <i>IMP.....</i>	26
4.4 <i>Rhomboidové proteázy.....</i>	26
4.5 <i>Atp23.....</i>	27
5. Oligopeptidázy	27
6. Ostatní proteázy.....	28
7. Závěr	29
Použitá literatura	31

Důležité zkratky

AAA+	ATPases Associated with diverse cellular Activities+, „ATPázy asociované s rozmanitými buněčnými aktivitami+“
Afg3l	ATPase family gene 3-like, "Genu 3 ATPázové rodiny podobný"
Aβ	Amyloid beta
Ccp1	Cytochrome c peroxidase 1, Cytochrom c peroxidáza 1
Clp	Caseinolytic protease, "Proteáza lyzující kaseiny", co znamenají X a P a A
Cox	Cytochrome c Oxidase, cytochrom c oxidáza
Cym1	Cytosolic metalloprotease 1, "Cytosolická metaloproteáza 1"
e	escherichia coli, předzkratkou proteinu označuje jeho homolog nalezený u Escherichia coli
FtsH	Filamentous temperature sensitive H, "Vláknitý protein H citlivý na teplotu"
h	human, před zkratkou proteinu označuje jeho lidský homolog
HSP	Hereditary Spastic Paraplegia, "Dědičná spastická paraplegie"
HtrA2	High temperature requirement protein A2, "Protein s požadavkem na vysokou teplotu A2")
i-AAA	intermembrane space ATPase Associated with diverse cellular Activities, "ATPáza mezimembránového prostoru asociovaná s rozmanitými buněčnými aktivitami"
IAP	Inhibitor of Apoptosis
Icp55	Intermediate Cleaving Peptidase of 55 kDa, "Intermediární štěpící peptidáza o molekulární hmotnosti 55 kDa"
IMP	Inner Membrane Peptidase, "Peptidáza vnitřní membrána"
m-AAA	matrix ATPase Associated with diverse cellular Activities, "matrixová ATPáza asociovaná s rozmanitými buněčnými aktivitami"
MIP	Mitochondrial Intermediate Peptidase, "Intermediární mitochondriální peptidáza"
Mop112	Metalloprotease of 112 kDa, "Metaloproteáza o molekulární hmotnosti 112 kDa"
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase, "Mitochondriální procesující peptidáza"
MPT	Mitochondrial Permeability Transition, "Tranzice permeability mitochondrií"
MrpL32	Mitochondrial ribosomal protein L32, "Mitochondriální ribosomální protein L32"
NSF	N-ethylmaleimide Sensitive Fusion protein, "Fúzní protein citlivý na N-etylmaleimid"
OmA1	Overlapping with the m-AAA protease 1, "Proteáza 1 překrývající se s m-AAA"
PARL	Presenilins-associated rhomboid-like protein, "Rhomboidům podobný protein asociovaný s preseniliny"
Phb	Prohibitin
PINK	PTEN-induced putative kinase, Domnělá kináza indukovaná PTEN
Prd1	Proteinase yscD, "Proteináza yscD"
PreP	Presequence Peptidase, "Peptidáza cílicích sekvencí"
SCA28	SpinoCerebellar Ataxia 28, "Spinocerebelární ataxie 28"
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein – „Akutní protein generující produkci steroidů“
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial, "Mitochondriální transkripční faktor A"
TOM	Translocase of the Outer Membrane, Traslokáza vnější membrány
UPR ^{MT}	Unfolded Protein Response in MiTochondria
Yme1	Yeast mitochondrial escape protein 1, "Kvasinkový únikový protein 1"

V textu jsou použity jednopísmenné zkratky aminokyselin podle International Union of Pure and Applied Chemistry, na jejich použití bývá upozorněno pomocí (IUPAC).

1. Úvod

Mitochondrie jsou specifické organely, které plní v eukaryotické buňce řadu důležitých rolí. Spolu s plastidami jsou jedinými organelami, které mají vlastní DNA nejaderného původu. Právě na základě této skutečnosti je dnes všeobecně přijímána teorie endosymbiotického původu mitochondrií, podle které jsou mitochondrie potomky aerobního prokaryota, který navázal endosymbiotickou interakci s větší anaerobní buňkou (Margulis & Bermudes, 1985). Tento prokaryot byl pravděpodobně příbuzný předkům dnešních α proteobakterií. Jeho splynutí s anaerobní buňkou se zřejmě událo v počátcích evoluce eukaryot, podle jedné z teorií eukaryogeneze dokonce právě splynutí anaerobního prokaryota s aerobním prokaryotem (budoucí mitochondrií) vedlo ke vzniku první eukaryotické buňky (Scheffler, 2001).

Pozice této události na samém kořeni eukaryotického fylogenetického stromu poukazuje na zásadní důležitost mitochondrií pro eukaryotickou buňku. Všeobecně známá je úloha mitochondrií v energetice buňky, v matrix mitochondrie je lokalizována oxidativní dekarboxylace, β -Oxidace mastných kyselin a Krebsův cyklus, ve vnitřní membráně mitochondrií jsou zabudovány komplexy oxidativní fosforylace. Mitochondrie plní i řadu dalších odvozených funkcí, často pro buňku zásadních. Jmenujme netřesovou termogenezi, biosyntézu hemů, skládání Fe-S komplexů, proces změny propustnosti mitochondriálních membrán (MPT, Mitochondrial Permeability Transition, „Tranzice Permeability mitochondrií“) – zásadní krok apoptotické dráhy, a v neposlední řadě ukládání vápníku do mitochondrií za účelem udržení jeho nízké koncentrace v cytosolu a tedy i jeho relevance v buněčné signalizaci (Scheffler, 2001).

Aby mohla mitochondrie plnit své funkce, potřebuje nejen zajistit syntézu (součinností jaderného a mitochondriálního genomu) svých přibližně 1000 – 1500 mitochondriálních proteinů (Meisinger et al, 2008), ale také musí kontrolovat, zda syntéza proběhla v pořádku a následně degradovat špatně složené či přebytečné proteiny a tak regulovat jejich kvalitu, množství a obrát v organelu. Zásadní roli v těchto procesech hrají jednak dynamické procesy mitochondriální „fusion“ (splývání mitochondrií) a „fission“ (rozpad, není nutně spojený s replikací mitochondriální (mt) DNA), které umožňují redistribuci proteinů v mitochondriích v rámci buňky, a zejména pak proteolýza, která umožňuje degradaci proteinů. Rozlišujeme neselektivní a selektivní proteolýzu. Při neselektivní proteolýze mohou být mitochondrie (které se předtím oddělili z větších komplexů pomocí mitochondriální „fission“) autofagocytovány a následně degradovány v lysozomech, nebo ve vakuolách (Mijaljica et al, 2007). Selektivní proteolýzu obstarává proteolytický systém mitochondrií. Je zodpovědný za odstraňování špatně foldedovaných¹, špatně asemblovaných² či prostě nadbytečných proteinů (systém kontroly kvality mitochondriálních proteinů – v anglickém jazyce známý jako Quality Control

¹ Folding se vztahuje k procesu zaujetí terciární struktury proteinu. Unfoldingem se pak v textu myslí děj vedoucí k rozložení této struktury.

² Asemblací míníme skládání proteinových podjednotek do kvarterních struktur – proteinových komplexů.

system), rovněž zprostředkovává maturaci proteinů v mitochondriích, zejména odštěpením specifických mitochondriálních cílicích sekvencí proteinů syntetizovaných v cytosolu (Koppen & Langer, 2007).

Funkční jednotky proteolytického systému mitochondrií, mitochondriální proteázy, prostřednictvím svých – zejména proteolytických, ale i dalších – aktivit hrají zásadní roli v biogenezi mitochondrií. Dysfunkce mitochondriálních proteáz patří mezi příčiny některých závažných neurodegenerativních onemocnění, včetně dědičné spastické paraplegie (HSP, Hereditary Spastic Paraplegia) (Tatsuta & Langer, 2008), autozomálně dominantní spinocerebelární ataxie (SCA28, SpinoCerebellar Ataxia 28) (Di Bella et al, 2010), Perraultova syndromu (Jenkinson et al, 2013) a možná také Parkinsonovy (Tatsuta & Langer, 2008) a Alzheimerovy (Teixeira & Glaser, 2013) choroby. Studium funkce mitochondriálních proteáz je tak důležitým předmětem biomedicínského výzkumu.

Tato práce si klade za cíl shrnout současné znalosti o vlastnostech mitochondriálních proteáz a jejich úloze v biogenezi organely, se zvláštním zaměřením na ATP dependentní AAA+ proteázy (ATPases Associated with various cellular Activities+) jako na nejlépe prozkoumanou skupinu v rámci proteolytického systému mitochondrií.

2. Klasifikace mitochondriálních proteáz

Selektivní proteolýzu v mitochondriích zajišťuje mitochondriální proteolytický systém, sestávající z proteáz specializovaných na různé funkce. Vedle maturace proteinů a kontroly jejich kvality mohou tyto proteázy také fungovat v dráze vedoucí k apoptóze, nebo naopak apoptózu blokovat, uplatňují se při správném skládání komplexů oxidativní fosforylace a v dalších procesech. Můžeme je klasifikovat podle různých hledisek, například podle jejich lokalizace v jednom ze čtyř mitochondriálních subkompartmentů (Matrix, vnitřní membrána, mezimembránový prostor, vnější membrána), nebo podle jejich převládající funkce.

Za osnovu této práce posloužila klasifikace mitochondriálních proteáz podle Koppena a Langera (Koppen & Langer, 2007), založená na předpokládané hlavní vlastnosti proteázy, případně na způsobu její činnosti. Takto můžeme rozdělit mitochondriální proteázy do čtyř skupin:

- **ATP-dependentní AAA+ proteázy.** Na základě fenotypů spojených s absencí těchto proteáz u kvasinek se rýsují hlavní funkce této skupiny proteáz – účast v systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů a kontrola regulačních kroků v biogenezi mitochondrií (Koppen & Langer, 2007). Z výsledků výzkumu bakteriálních homologů této třídy proteáz lze usuzovat na to, že ATP je využito k rozkládání (unfolding) proteinů a k přesunu substrátu do aktivního proteolytického místa proteinu (Baker & Sauer, 2006). Patří sem i-AAA (intermembrane space ATPase Associated with diverse cellular Activities), m-AAA (matrix ATPase Associated with diverse cellular Activities), Lon a ClpXP (Caseinolytic protease) komplexy.

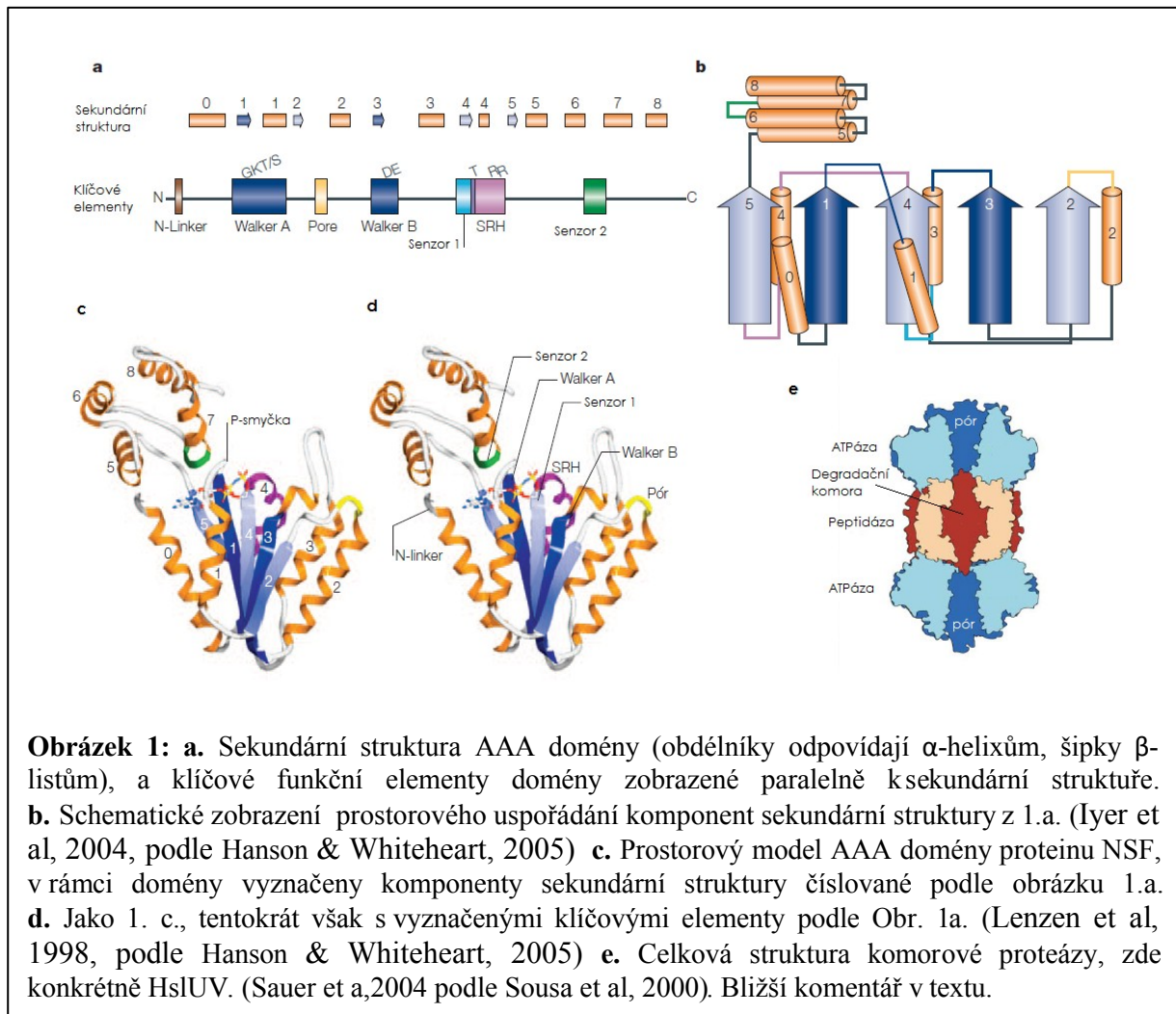
- **Procesující peptidázy nevyžadující ke své činnosti ATP.** Tyto peptidázy odštěpují cílicí sekvence mitochondriálních proteinů, nachází se v různých mitochondriálních subkompartmentech (Gakh et al, 2002). Patří sem MPP (Mitochondrial Processing Peptidase), MIP (Mitochondrial Intermediate Peptidase), IMP (Inter Membrane Peptidase), Icp55 (Intermediate cleaving peptidase of 55 kDa) a řadíme sem rovněž skupinu Rhomboidových proteáz, z nichž některé mají ale i důležité regulační funkce (Koppen & Langer, 2007; Teixeira & Glaser, 2013). Do této skupiny můžeme řadit také peptidázu Atp23, její procesující aktivita byla pozorována na substrátu Atp6 podjednotky komplexu F₁F₀-ATP syntázy (Teixeira & Glaser, 2013).
- **Oligopeptidázy.** Jedná se většinou o málo charakterizované proteiny. Jejich existence byla předpovězena poté, co bylo pozorováno, že polypeptidy mohou být kompletně degradovány v rámci mitochondrií (Young et al, 2001). Jejich společnou vlastností je tedy štěpení peptidů (typicky peptidových zbytků po proteolýze, například i-AAA proteázou (Kambacheld et al, 2005), na aminokyseliny. Patří sem zejména metalopeptidáza PreP (Presequence Peptidase, známá také jako Mop112, Metalloprotease of 112 kDa, nebo Cym1, Cytosolic metalloprotease 1) a thimetová peptidáza PrD1 (Proteinase yscD, známá také jako saccharolysin, a její lidský homolog jako neurolysin), nacházející se v mezimembránovém prostoru mitochondrií a Lap3, známá také jako hydroláza bleomycinu, lokalizovaná v matrix (Koppen & Langer, 2007).
- **Ostatní proteázy.** Nevyhovují výše uvedené klasifikaci. V textu bude pojednáno o OmA1 (Overlapping with the m-AAA protease 1) a HtrA2 (High temperature requirement protein A2).

3. ATP-dependentní AAA+ proteázy

ATP dependentní AAA+ proteázy sestávají obecně ze dvou částí, ATPázové (využívá hydrolýzu ATP jako zdroj energie) a proteolytické (štěpení peptidové vazby). ATPázová a proteolytická funkce se může nacházet na různých doménách jednoho řetězce (komplexy m-AA, i-AAA, Lon), nebo na specializovaných podjednotkách kvartérní struktury (Clp proteázový komplex) (Hanson & Whiteheart, 2005). AAA+ proteázy můžeme třídit podle toho, kde byly lokalizovány. Máme pak proteázy matrix mitochondrií (Lon, Clp) a proteázy vnitřní mitochondriální membrány (i-AAA, m-AAA). Jiné hledisko umožňuje zařadit ATP-dependentní proteázy do vysoce konzervovaných rodin spolu s úzce příbuznými bakteriálními homology – máme pak tři velké rodiny – Lon proteázy, Clp proteázy a proteázy homologické s FtsH (Filamentous temperature sensitive H; více než 40% homologie podle Langer, 2000, patří sem i-AAA a m-AAA proteázy) (Koppen & Langer, 2007).

K hlavní funkci AAA+ proteáz – degradaci mitochondriálních proteinů proteolýzou – je nezbytná činnost ATPázy. AAA+ proteázy patří mezi komorové proteázy (*viz Obr. 1e*); proteázové podjednotky jsou strukturálně uspořádány jako duté oligomery prstencovitého tvaru, uvnitř kterých dochází k proteolýze (v takzvané degradační komoře – proto komorové proteázy). Vstup do dutiny oligomeru

– degradační komory, je pro substrát – protein ve složené konformaci – příliš těsný. Zde přichází ke slovu ATPáza, obvykle rovněž prstencovitého tvaru s axiálním pórem, která daný enzym denaturuje a translokuje do degradační komory, může však také rozšiřovat vstup do této komory v proteázové podjednotce (Sauer et al, 2004). Například pokusy na proteázové podjednotce bakteriální Clp (ClpP) ukázaly, že samotná proteáza není schopna účinně degradovat svůj substrát, potřebuje ke své činnosti ATPázu (Thompson & Maurizi, 1994).



Zatím co proteolytická část AAA+ proteázy potřebuje ke své činnosti ATPázu, ATPázové podjednotky mohou v obměněných rolích fungovat i samostatně. Například výzkumy na ClpA ATPázových podjednotkách ukázaly, že fungují i samostatně jako chaperony (Wickner et al, 1994). Společným strukturním znakem ATP dependentních proteáz je doména AAA+ (viz Obr. 1a., b., prostorová struktura Obr. 1c., 1d.). Tato doména sestává ze dvou subdomén, α -helikální subdomény na C konci a Rossmanova α/β foldu na N konci. Sekundární struktura Rossmanova foldu je tvořena střídajícími se alfa helixy a paralelními β listy. Terciární struktura foldu pak připomíná klín, ve kterém jsou β -listy uspořádány stabilně v pořadí $\beta 5$ - $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 3$ - $\beta 2$ (Viz Obr. 1b.) Množství α helixů mezi jednotlivými β listy se liší v závislosti na konkrétním proteinu, na kterém se AAA+ doména nachází. N-terminálně od α -helixu 0 se nachází konzervovaný motiv N-linkeru, přispívající k vazbě

adeninového kruhu ATP. Pro vazbu ATP pak mají hlavní význam Walker A a Walker B motivy, které se nachází dále směrem k C konci od N-linkeru. Na Walker A se nachází P-smyčka, která přímo interaguje s fosfáty ATP. Činí tak zřejmě pomocí lysinu v konsenzuální sekvenci GXXXXGK(T/S) (IUPAC), neboť mutace v této doméně obvykle eliminuje ATPázovou aktivitu. Walker B motiv obsahuje hhhhDE sekvenci (IUPAC, h zde znamená hydrofobní), aspartátový zbytek této sekvence koordinuje Mg^{2+} kationty, které jsou nutné pro zdárný průběh hydrolýzy ATP, zbytek kyseliny glutamové by měl aktivovat vodu pro hydrolýzu. Pokračujeme-li dál směrem k C konci, narazíme na SRH, neboli Second Region of Homology. Tento region se nenachází zachovaný celý u všech AAA+ proteinů, ale vždy můžeme nalézt alespoň obdobné struktury. V N-koncové části SRH se nachází Senzor 1, v terciární struktuře je tento element umístěn mezi Walker A a Walker B motivy, interaguje s Walker B a γ -fosfátem ATP (Hanson & Whiteheart, 2005). Mutace kvasinkové proteázy NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Fusion protein) ukázaly, že Senzor I je nezbytný k hydrolýze ATP (Steel et al, 2000). Na C konci SRH se nachází argininové prsty, v rámci oligomeru se prsty jednoho protomeru (podjednotky komplexu) účastní ATP-vazebného místa na sousedním protomeru. C-koncová α -helikální doména sestává z několika alfa helixů a nachází se nad širším koncem Rossmanna foldu, tvoříc částečné víčko nad ATP-vázajícím místem foldu. V rámci α -helikální domény se nachází Senzor 2, jehož součástí je nabitá aminokyselina (často arginin), která interaguje přímo s γ -fosfátem ATP. V rámci AAA+ hexameru se Senzor 2 nachází blízko Rossmanna foldu sousedního protomeru. Spolu s argininovými prsty SRH tak mohou nabitě zbytky Senzoru 2 zprostředkovávat konformační změny mezi protomery oligomeru. (Hanson & Whiteheart, 2005) Indukované mutace v Senzoru 2 potvrzují roli tohoto regionu v hydrolýze ATP a unfoldingu proteinů (Joshi et al, 2003). Strukturální motiv dvou subdomén je v rámci AAA+ rodiny konzervovanější, než struktury v rámci jednotlivých subdomén (Smith et al, 2004).

Všechny degradační procesy v buňce je třeba kontrolovat. V případě AAA+ proteáz je tato kontrola uskutečněna hlavně přes určitou specificitu v rozeznávání substrátu. Různé AAA+ proteázy však nejsou specializované přímo na určité třídy proteinů, ale mají preference ke krátkým sekvencím na N nebo C konci proteinu (Sauer et al, 2004). Například hmotnostní spektrometrie substrátů polapených deaktivovanou ATPázovou podjednotkou bakteriální ClpXP (tedy ClpX proteinem) identifikovala stovky různých substrátů, které rozeznává podle několika typů peptidových signálů, tři motivy byly lokalizovány na N konci a dva motivy na C konci (Flynn et al, 2003). Větší množství signálů zřejmě umožňuje jemnější regulaci degradace pomocí Clp (Sauer et al, 2004).

Poté, co ATPázová podjednotka rozezná svůj substrát, může přistoupit k jeho unfoldingu. Tento děj je energeticky velmi náročný a probíhá jako sled jednotlivých pokusů o rozbalení proteinu (Sauer et al, 2004). Několik studií poukazuje na to, že množství potřebných pokusů nekoreluje přímo s celkovou stabilitou proteinového komplexu, ale závisí hlavně na stabilitě domény nacházející se za sekvencí určující protein k degradaci (Kenniston et al, 2003; Lee et al, 2001).

Po unfoldingu substrátu AAA+ ATP dependentní proteázou následuje jeho translokace do degradační komory proteázy, kde dochází ke štěpení polypeptidového řetězce na kratší peptidy. Tyto peptidy jsou následně transportovány z mitochondrií, nebo jsou degradovány mitochondriálními oligopeptidázami. Nyní přistoupíme k diskuzi jednotlivých mitochondriálních AAA+ proteáz.

3.1 ClpXP proteáza

Mitochondriální AAA proteázový komplex ClpXP byl lokalizován v matrix mitochondrií (Corydon et al, 1998; de Sagarra et al, 1999; Santagata et al, 1999). ClpXP je heterooligomerní komplex sestávající ze dvou proteinových podjednotek ClpX a ClpP, členů rodiny Clp proteinů a homologů stejnojmenných proteinů bakterií (Koppen & Langer, 2007). Sekvence lidských Clp proteinů vykazují vysokou míru podobnosti s bakteriálními sekvencemi, včetně konzervace všech katalytických zbytků *Escherichia coli* u lidských Clp (Kang et al, 2002).

3.1.1 ClpX a ClpP: Podjednotky ClpXP komplexu

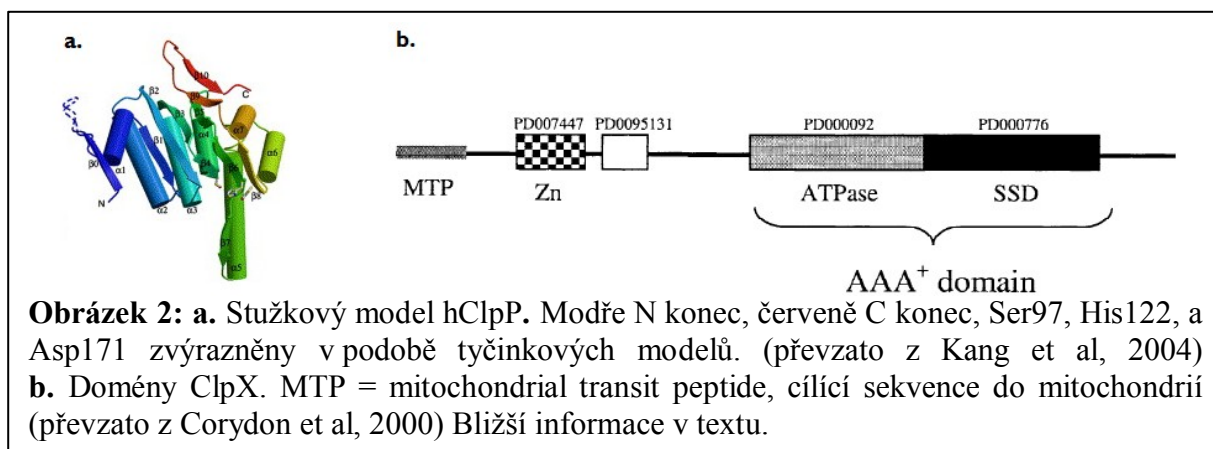
ClpP je serinová proteáza (Koppen & Langer, 2007), proteolytická aktivita byla nicméně detekována pouze u komplexu ClpXP (Kang et al, 2002), nikoli u samostatného ClpP proteinu (Corydon et al, 1998; de Sagarra et al, 1999; Kang et al, 2005). Tato skutečnost naznačuje, že mitochondriální ClpP podjednotka sama o sobě nestačí na vykonávání proteolytické funkce. Clp proteáza tedy podobně jako ostatní AAA proteázy potřebuje ke zdárnému plnění své funkce nejen proteolytickou podjednotku ClpP, ale také ATPázovou podjednotku (ClpX), která rozeznává substrát (Kang et al, 2002). Bakteriální homolog (eClpX) substrát po jeho rozeznání unfolduje a zprostředkuje jej tak proteolytickému centru (eClpP). Vzhledem k podobnosti mezi hClpX a eClpX – při experimentech vytvářela hClpP s eClpX funkční ClpXP komplex (Kang et al, 2002) – lze s velkou pravděpodobností usuzovat, že rovněž lidská hClpX substrát po jeho rozeznání unfolduje a zprostředkuje jej tak proteolytickému centru hClpP. Na rozdíl od nesamostatného fungování ClpP naznačuje studium bakteriální ClpX, že tato podjednotka může vykonávat samostatně funkci chaperonu, tedy bez asociace do komplexu ClpXP (Wawrzynow et al, 1995).

3.1.2 Genetika a struktura ClpP podjednotky

Gen pro hClpP podjednotku byl lokalizován na lidském chromozomu 19 (Bross et al, 1995). Produkt translace tohoto genu má molekulární hmotnost ~35 kDa. Jakožto mitochondriální protein kódovaný v jádře obsahuje čerstvě translatovaný ClpP pro-protein cílicí N-koncovou sekvencí neznámé délky. Po úspěšném navedení proteinu do mitochondrie je cílicí sekvence autokatalyticky (tedy jiným již aktivním ClpXP komplexem) odštěpena (Kang et al, 2004); a zůstává protomer ClpP o hmotnosti 26 kDa.³ Značení pomocí anti-hClpP protilátek s navázaným zlatem a následná elektronová mikroskopie umožnily lokalizovat ClpP do matrix mitochondrií, a v rámci matrix poukázaly na zvýšený výskyt ClpP poblíž vnitřní vrstvy vnitřní mitochondriální membrány (de Sagarra et al, 1999).

³ Corydon et al, 2000 uvádí trochu jiné hodnoty pro atomové hmotnosti ClpP: 37-39 kDa pro translatovaný prekurzor ClpP, 32 kDa po odštěpení cílicí sekvence.

hClpP je strukturně podobný svému bakteriálnímu homologu. (viz Obr. 2a.) Elektronová mikroskopie lidských ClpXP (dále jen hClpXP) ukázala, že protomery hClpP samostatně asociují do prstencovitých heptamerů o vnějším průměru 121 Å (de Sagarra et al, 1999), jejichž vnitřek tvoří aktivní proteolytická místa, jedná se tedy o komorové proteázy. (Viz Obr. 3a.) Proteolytická místa tvoří katalytická triáda typická pro serinové proteázy, v případě ClpP ji tvoří Serin 97, Histidin 122 a Aspartát 171. Proteolytická místa se nachází v dutině heptameru, který jednotlivé protomery ClpP tvoří. Na N konci ClpP protomerů se nachází hydrofobní sekvence, které se stýkají v místě osního otvoru (12 Å) do heptameru, nachází se tak v pozici, kde mohou interagovat s unfoldovanými substráty translokovanými na toto místo chaperonovou ClpX částí ClpXP komplexu. Mutace nebo delece zbytků těchto hydrofobních N-koncových sekvencí ClpP vedla k drastickému poklesu proteolytické aktivity ClpXP komplexu. Proto lze předpokládat, že tyto peptidy se účastní procesu translokace substrátu do degradační komory, primárně zprostředkovaného ClpX podjednotkami ClpXP komplexu. N-koncovou sekvencí následují zbytky 8 až 16, které vystupují nad rovinu heptameru a jsou rovněž důležité pro aktivitu ClpXP komplexu. Na okraji heptamerního prstence se pak nachází specifická savčí C-koncová sekvence dlouhá 28 aminokyselin, tvoří zde smyčku, která vyčnívá z povrchu prstence. Aminokyselinové zbytky na začátku C-koncové domény se dotýkají místa styku sousedních ClpP protomerů v rámci heptameru, ovlivňují tak skládání (asemblaci) heptameru a jeho stabilitu (Kang et al, 2004).



3.1.3 Genetika a struktura ClpX podjednotky

Gen pro hClpX podjednotku byl lokalizován na lidském chromozomu 15. CLPX gen je dlouhý více než 27 kbp a sestává ze 14 exonů a 13 intronů. Prekurzorový protein vzniklý po translaci je dlouhý 633 aminokyselin. Na jeho N-konci se nachází sekvence cílicí prekurzorový protein do mitochondrií, kde je tato sekvence odštěpena – předpokládá se, že mezi 56. a 57. aminokyselinou. Maturované protomery hClpX pak tvoří prstencovité hexamery. (Viz Obr. 3b.)

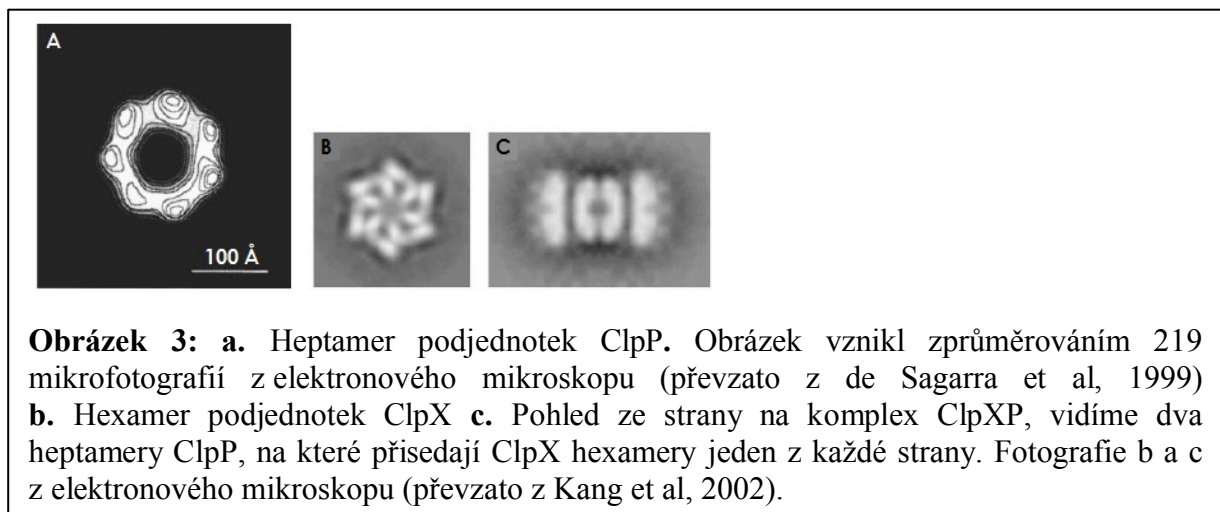
Pro strukturu ClpX (Viz Obr. 2b.) je zásadní výše diskutovaný AAA⁺ modul, sestávající z SSD (substrát vázající) a ATPázové domény. Směrem k N konci od AAA⁺ modulu se nachází další dvě konzervované domény s neznámou funkcí. Blíže k N-konci z nich se nachází doména, která obsahuje

čtyři cysteinové zbytky obdobně jako bakteriální homolog ClpX v této oblasti (Corydon et al, 2000). Tyto cysteinové zbytky by mohly tvořit zinkový prst (Gottesman et al, 1993). Vzhledem k tomu, že tento motiv ClpX nebyl nalezen u *Saccharomyces cerevisiae* (van Dyck et al, 1998), kde rovněž nebyl nalezen protein ClpP, lze se domnívat, že se motiv podílí na vazbě ClpX na ClpP v rámci ClpXP komplexu (Corydon et al, 2000).

U purifikovaného myšího ClpX byla pozorována samostatná ATPázová aktivita, s $K_m \approx 25$ mM a $V_{max} \approx 660$ pmol*min⁻¹*mg⁻¹. ATPáza je aktivní v poměrně širokém rozmezí pH a teploty. (Santagata et al, 1999).

3.1.4 ClpX a ClpP asociují do multimerních komplexů

V přítomnosti hexamerů hClpX asociují heptamery hClpP do dvojic a tvoří tak tetradekamer, ke kterému se přikládají hexamery hClpX – jeden z každé strany. Vytváří se tak stabilní částečně asymetrický komplex ClpXP (*Viz Obr 3c.*) (Kang et al, 2005; Kang et al, 2002). Stejně částečně asymetrické uspořádání sestávající z hexamerů a heptamerů má i bakteriální komplex ClpXP a ClpAP, a někteří autoři se domnívají, že toto uspořádání vede k rotaci hexamerů a heptamerů vůči sobě a tak vytváří tah, který pomáhá translokaci unfoldovaného peptidu do proteolytické komory ClpP (Beuron et al, 1998).



Obrázek 3: a. Heptamer podjednotek ClpP. Obrázek vznikl zprůměrováním 219 mikrofotografií z elektronového mikroskopu (převzato z de Sagarra et al, 1999) b. Hexamer podjednotek ClpX c. Pohled ze strany na komplex ClpXP, vidíme dva heptamery ClpP, na které přisedají ClpX hexamery jeden z každé strany. Fotografie b a c z elektronového mikroskopu (převzato z Kang et al, 2002).

3.1.5 Funkce lidského ClpXP a jeho patologie

Na rozdíl od poměrně rozsáhlých vědomostí o funkci bakteriálního komplexu ClpXP, o funkci lidského homologu ClpXP zatím mnoho nevíme. Dosud bylo identifikováno jen několik substrátů ClpXP (Matsushima & Kaguni, 2012). Výsledky studií ukazují na zvýšenou expresi ClpP za stresových podmínek a účast ClpP v signalizaci v rámci mitochondriální funkční odpovědi na stres UPR^{MT} (unfolded protein response in mitochondria). Zdá se, že Clp se podobně jako další AAA+

proteázy podílí na systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů (Haynes et al, 2007; Zhao et al, 2002).⁴

V případě ClpX byla dokumentována vazba tohoto proteinu na inhibitor apoptózy IAP (Inhibitor of Apoptosis) (Verhagen et al, 2007). Proapoptotickou funkci ClpXP by naznačovala i nedávná studie na modelové vřeckovýtusné houbě *Podospora anserina*. Delece genu CLPP pro ClpP podjednotku ClpXP proteázy vedla k prodloužení života houby. Fenotyp se vrátil do původního stavu, pokud byla v houbě indukována exprese lidského ClpP homologu (Fischer et al, 2013).

Nová studie identifikovala recesivní mutaci v genu CLPP pro ClpP protein jako jednu z příčin Perraultova syndromu, heterogenního autozomálně recesivního onemocnění charakterizovaného ztrátou sluchu a selháním vaječníků (Jenkinson et al, 2013). Při hledání funkce lidské ClpXP by mohly pomoci znalosti o specifické expresi podjednotek hClpX a hClpP v některých lidských tkáních, zejména zvýšené expresi v kosterních svalech a v srdci (Bross et al, 1995; Corydon et al, 2000).

Podjednotky ClpX byly nalezeny v mitochondriích všech zkoumaných skupin eukaryot, ClpP se však nepodařilo nalézt v mitochondriích kvasinek. Proteáza ClpXP tedy zřejmě není univerzálním komplexem eukaryotických mitochondrií (Nolden et al, 2005; van Dyck et al, 1998).

3.2 Lon Proteáza

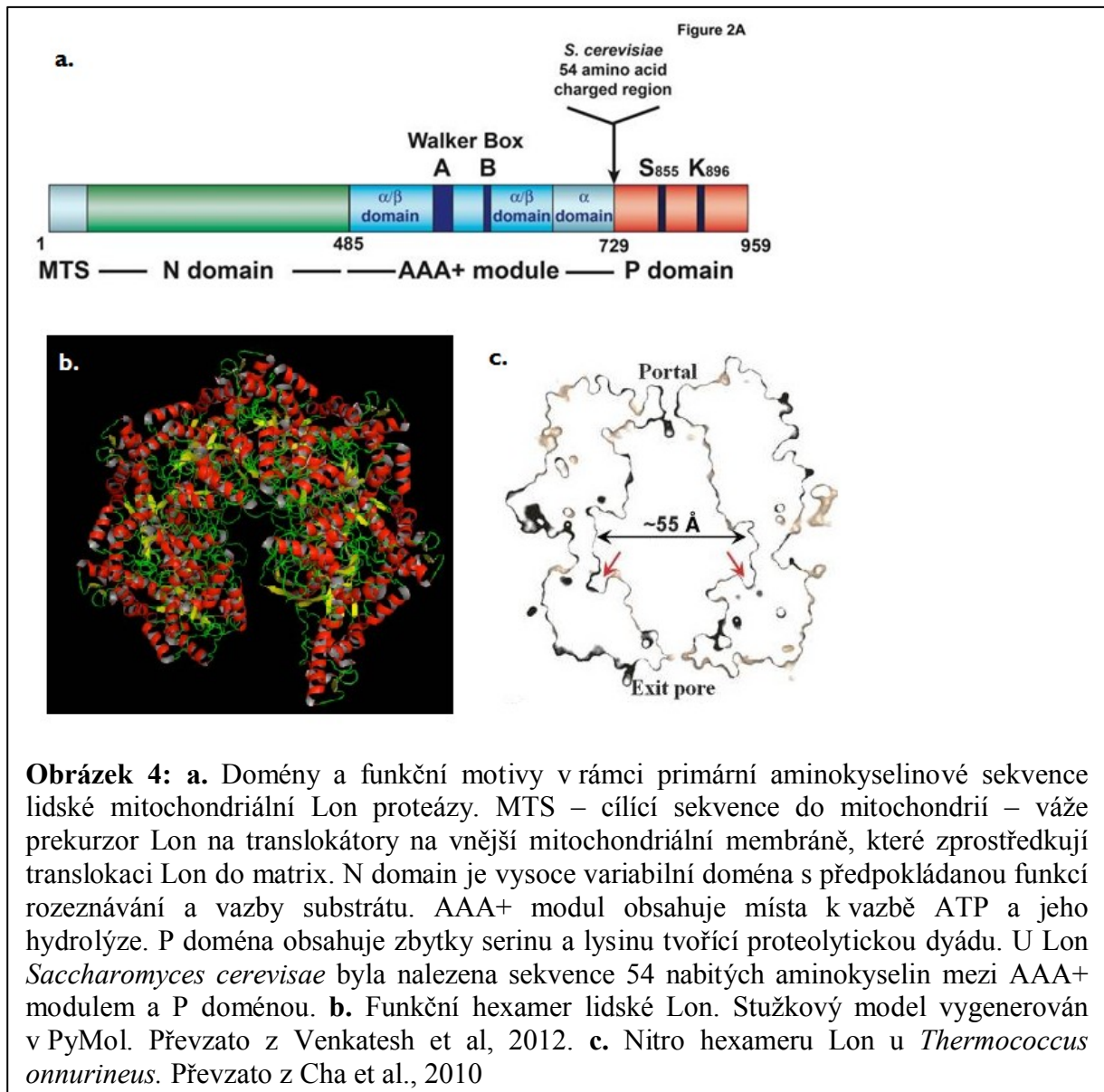
Proteáza Lon se podobně jako ClpXP AAA+ proteáza nachází v mitochondriální matrix (Suzuki et al, 1994; Wang et al, 1994). Na rozdíl od ClpXP se AAA+ i proteázová doména nachází na jediném polypeptidu (Hanson & Whiteheart, 2005). Proteáza Lon má stejnojmenný homolog u bakterií (například 43% homologie lidské Lon s Lon *Bacillus subtilis*) a homolog Pim1 u kvasinek. Je členem vysoce konzervované rodiny Lon proteáz nacházejících se ve všech velkých taxonech od archeí přes eubakterie, houby až po savčí mitochondrie a peroxizomy (Koppen & Langer, 2007; Venkatesh et al, 2012).

3.2.1 Doménová struktura

Struktura proteázy Lon není složitá, nicméně zde existují určité obměny v rámci různých taxonů. Tři základní domény v rámci jednoho polypeptidu Lon vidíme na *Obrázku 4*. Jedná se o N doménu na N konci, ATPázový AAA+ modul a proteolytickou P doménu. N doména rozeznává a váže substrát, zároveň se jedná o nejvariabilnější část Lon proteázy v rámci rodiny Lon. AAA+ modul slouží jako obvykle k hydrolýze ATP (Venkatesh et al, 2012). P doména má proteolytickou funkci a je v oblasti svého aktivního místa evolučně konzervovaná. Jedná se o serinovou proteázu, mutační a srovnávací studie na eubakteriálních a archeálních Lon však ukázaly, že proteolytickou funkci nezprostředkovává nejobvyklejší katalytická triáda Ser-His-Asp. Místo ní se na P doméně nachází serin-lysinová dyáda (Botos et al, 2004; Cha et al, 2010; Rotanova et al, 2004). Kvasinkové homology Pim1 navíc obsahují

⁴ Zhao et al. ve své studii rovněž uvádí, že spolu s nárůstem exprese ClpP nepozorovali paralelní nárůst exprese ClpX. To by bylo poněkud v rozporu s předchozími studiemi, které poukazovaly na nezbytnou asociaci ClpP s ClpX pro vykonávání proteolytické funkce.

zvláštní vysoce nabitou sekvenci zhruba 50 aminokyselin na rozhraní AAA+ modulu a P domény (Venkatesh et al, 2012).



3.2.2 Genetika, translace, translokace do matrix, maturace a asemblace

Lidská Lon proteáza je kódována jaderně lokalizovaným genem. Produktem translace je prekurzorový polypeptid 963 aminokyselin dlouhý, o molekulární hmotnosti 106 kDa (Wang et al, 1993). Na jeho N konci se nachází cílicí sekvence, která slouží k translokaci do matrix mitochondrie. Její předpokládaná délka je 65 aminokyselin, těchto prvních 65 aminokyselin od N konce obsahuje znaky typické pro cílicí sekvenci do mitochondrií – obsahuje hodně argininových zbytků a má schopnost tvorby amfipatického helixu. Imunoprecipitace maturovaných Lon proteinů poskytla proteázy o molekulární hmotnosti 100 kDa, o 6 kDa nižší než hmotnost prekurzoru Lon. To naznačuje, že cílicí sekvence lidské Lon je po translokaci prekurzoru do matrix mitochondrií odštěpena (Wang et al, 1994). Proces

proteolytické maturace byl studován u Pim1 proteázy, ve dvou-krokovém procesu je odštěpena cílicí sekvence a poté dalších 61 aminokyselin na C konci (Wagner et al, 1997).

Jednotlivé bakteriální Lon proteiny se v mitochondriích skládají jako podjednotky do funkčních hexamerů, které vytváří zvláštní prostředí pro proteolytická místa podjednotek oddělené od okolní mitochondriální matrix. Řadí se tak mezi komorové proteázy, podobně jako ostatní AAA+ proteázy (Duman & Lowe, 2010; Venkatesh et al, 2012). Proteinové jednotky kvasinkového PIM1 homologu asociují do funkčních částečně asymetrických otevřených heptamerních prstenců (Stahlberg et al, 1999). Na základě srovnávacích studií sekvencí lidských Lon s kvasinkovými Pim1 a bakteriálními Lon homology se lze domnívat, že lidské Lon tvoří strukturně funkční hexamery, podobně jako jejich bakteriální homology. (viz Obr. 4b.) Další studie jsou však potřeba pro potvrzení těchto teoreticky založených domněnek (Venkatesh et al, 2012).

3.2.3 Aktivita

Studie bakteriální Lon ukázaly, že proteáza je schopná štěpit velmi krátké peptidy bez přítomnosti ATP (ale za přítomnosti iontů Mg^{2+} , Ca^{2+} , nebo Mn^{2+}), navázání ATP nicméně peptidázovou aktivitu výrazně stimuluje (Waxman & Goldberg, 1985). Vazba ATP a jeho hydrolýza je pak nezbytná, aby mohlo proběhnout štěpení peptidových vazeb proteinových substrátů. Mechanismus ATP-dependentní proteolýzy Lon tedy pravděpodobně odpovídá obecnému mechanismu známému u AAA+ proteáz (Venkatesh et al, 2012). Krystalografická analýza archeální Lon proteázy *Thermococcus onnurineus* nicméně naznačuje existenci významných rozdílů ve srovnání s některými AAA+ proteázami, například z rodiny Clp. Na apikální straně hexamerního komplexu se nachází vstup do jeho nitra, do komory hexameru, v rámci níž pak neexistuje žádné zvláštní oddělení mezi ATPázovou (chaperonovou) a proteolytickou částí. (viz Obr. 4c.) Autoři argumentují, že tento model lze vztáhnout na Lon proteázy obecně, a že by mohl vysvětlovat štěpení nativních proteinů Lon proteázou bez jejich předchozího unfoldingu (Cha et al, 2010), jak jej pozorovala Ondrovicová et al, 2005

Fenotypy spojené s delecí kvasinkového homologu Lon proteázy Pim1 zahrnují nefunkční mitochondriální genom, nižší ATP-dependentní proteolýzu (Suzuki et al, 1994), neschopnost využívat nefermentovatelný substrát jako zdroj uhlíku (Van Dyck et al, 1994) a akumulaci elektrondenzních inkluzních tělísek v mitochondriální matrix (Bayot et al, 2010). RNAi knockdown Lon v kulturách buněk *Drosophila sp.* vede k nárůstu oxidovaných proteinů v mitochondriích (Matsushima et al, 2010), v lidských fibroblastech bylo pozorováno, že absence Lon vede ke značnému poškození mitochondriálních funkcí, k závislosti postižených buněk na anaerobním metabolismu a často (ačkoli ne univerzálně) i k apoptóze (Bota et al, 2005). Všechny tyto fenotypy naznačují významnou roli Lon proteáz v biogenezi mitochondrií. Proteázy rodiny Lon rozeznávají špatně složené nebo poškozené proteiny, zahajují jejich kompletní proteolýzu, a tak zabraňují jejich akumulaci a jejich škodlivým účinkům na mitochondriální procesy (Koppen & Langer, 2007).

3.2.4 Rozmanité funkce Lon proteázy a její patologie

Proteomické přístupy na modelu *Saccharomyces cerevisiae* umožnily identifikovat množství oxidativně poškozených proteinů jako substráty Pim1, kvasinkového homologu Lon, včetně proteinů s antioxidantními vlastnostmi a enzymů mitochondriálního metabolismu, zejména podjednotek pyruvát dehydrogenázového komplexu a dýchacího řetězce (Bayot et al, 2010). Lon proteázy se tedy účastní systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů, a to zejména za stresových podmínek. Byla pozorována klíčová role proteázy Pim1 při degradaci polypeptidů modifikovaných ROS (reaktivními kyslíkovými molekulami) (Bender et al, 2010). K indukci exprese lidské Lon dochází za stresových podmínek teplotního šoku, vyhladovění (serum starvation) a zvýšené koncentrace zmíněných ROS (Ngo & Davies, 2009).

Lon má schopnost vazby na DNA. Tato schopnost je zachována od bakteriálních Lon až po mitochondriální Lon proteázu člověka. Přesto však byla DNA vazebná doména zatím identifikována jen u bakterií (Matsushima & Kaguni, 2012). U lidské Lon byla pozorována vazba na promotory na obou vláknech mitochondriální DNA, s preferencí vůči sekvencím bohatým na GT, s guaninovými bázemi blízko sebe. Sekvence s alespoň čtyřmi takovými prostorově blízkými guaniny mají tendenci tvořit G-kvadruplexy, čtyřvláknové sekvence s uspořádáním guaninů ve čtveřicích, a vyskytují se na mitochondriální DNA každých přibližně 150 nukleotidů (Fu & Markovitz, 1998; Chen et al, 2008). Lon se váže na takováto na guanin bohatá místa, a to i mimo promotory. Specifická asociace Lon s místy tvořícími kvadruplexy na jednovláknové mitochondriální DNA by mohla fungovat jako prostředek, jak přimět Lon, aby na konkrétních místech degradovala proteiny podílející se na transkripci a replikaci DNA. Vazba Lon by také mohla sloužit k zavedení kontrolních bodů během replikace a transkripce, nebo přímo inhibovat/aktivovat replikaci a transkripci (Venkatesh et al, 2012). Mezi substráty Lon patří také důležitý mitochondriální transkripční faktor A – TFAM. Studie na mitochondriích octomilek ukázala, že RNAi knockdown proteázy Lon vede k nárůstu koncentrace TFAM, a tedy i poměru TFAM:mtDNA, což následně vyústí v inhibici transkripce. Zvýšená exprese Lon naopak vedla ke snížení koncentrace TFAM. Autoři proto vyvozují, že Lon přes degradaci TFAM ovlivňuje rovnováhu TFAM:mtDNA, a takto zprostředkovaně reguluje transkripci mitochondriální DNA (Matsushima et al, 2010).

Vedle úlohy Lon v systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů a asociace s mtDNA a TFAM byly identifikovány další substráty Lon, které poukazují na její regulační funkci v mnoha buněčných dějích.

Za hypoxických podmínek se Lon účastní výměny Cox4-1 varianty podjednotky Cox4 komplexu IV dýchacího řetězce (Cytochrom c oxidázy) za Cox4-2 variantu, (Stiburek & Zeman, 2010) která je lépe optimalizována pro přenos elektronů v hypoxických buňkách (Fukuda et al, 2007). Bylo pozorováno, že i mutanty Lon s deaktivovanou proteolytickou P doménou jsou schopny se podílet na skládání proteinových komplexů včetně komplexu IV (Hori et al, 2002; Rep et al, 1996). To by naznačovalo

nezávislou chaperonovou aktivitu ATP-vazebných domén Lon, která by mohla být teoreticky využita i k inkorporaci Cox4-2 podjednotky do komplexu IV během hypoxie (Venkatesh et al, 2012).

V buňkách nadledvin a v gonádách je Lon zodpovědná za rychlý obrat proteinu StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) a tak může nepřímo regulovat syntézu steroidních hormonů, neboť StAR ve specializovaných steroidy produkujících mitochondriích zmíněných buněčných typů dodává cholesterol do dráhy syntézy steroidů (Granot et al, 2007).

Zvýšená koncentrace hemů v jaterních mitochondriích stimuluje Lon k degradaci enzymu ALAS-1 (alpha aminolevulinic acid synthase 1 – „Syntáza kyseliny alfa aminolevulinové 1“), který katalyzuje regulovaný krok syntézy hemů a tak zřejmě přispívá k regulaci biosyntézy hemů v mitochondriích (Tian et al, 2011).

V jaterních buňkách krys byl pozorován pokles exprese Lon a akumulace oxidovaných proteinů s rostoucím věkem (Bakala et al, 2003). Dlouhodobě zvýšená exprese Lon u houby *Podospora anserina* vedla ke zvýšené rezistenci vůči oxidačnímu stresu a k prodloužení života u tohoto organismu. Takový fenotyp můžeme vysvětlit významnou úlohou Lon v ochraně proti oxidačnímu stresu, a díky tomu ve zpomalení degradativních procesů uvnitř mitochondrie, lze si však také představit přímou účast Lon proteázy na inhibici apoptózy. Protiapoptotická funkce Lon proteázy by se tak dostala do kontrastu s pravděpodobnou proapoptotickou (Fischer et al, 2013) úlohou ClpXP proteázy, diskutovanou výše (viz část 3.1.5). Obě matrixové AAA+ proteázy by se takto mohly protichůdným způsobem podílet na regulaci apoptózy.

Vzhledem k důležité roli Lon v systému kontroly kvality proteinů a v dalších procesech není překvapivé, že její nefunkčnost je spojena se zásadními defekty postižených mitochondrií u rozmanitých organismů (popis některých fenotypů viz výše). Agregace špatně složených proteinů a související nárůst produkce ROS, tedy procesy, kterým pomáhá předcházet mimo jiných faktorů i správná funkce Lon proteázy, vedou k mnohým mitochondriálním onemocněním. Mutace v genech vedoucí k častějšímu výskytu špatně složených proteinů a následnému onemocnění v mnohých případech vedou ke zvýšení exprese Lon, což bylo pozorováno například u syndromů MELAS, MERRF a u Friedrichovy ataxie. Naopak u mitochondrií pacientů s HSP byl pozorován přibližně 50% pokles exprese Lon proteázy (Venkatesh et al, 2012). Další výzkum je nutný k lepšímu pochopení souvislosti mezi mitochondriálními onemocněními a funkcí, respektive dysfunkcí lidské Lon proteázy.

3.3 m-AAA a i-AAA proteázy

Třetí skupinou AAA+ ATP-dependentních proteáz jsou m-AAA a i-AAA proteázy, obě lokalizované ve vnitřní mitochondriální membráně, m-AAA proteáza vyčnívá svými aktivními místy do matrix (odtud m v názvu), i-AAA proteáza do mezimembránového prostoru (intermembrane space, odtud i) (Janska et al, 2013). V rámci AAA+ rodiny proteinů spadají m-AAA a i-AAA proteázy do podskupiny AAA proteinů (Iyer et al, 2004), proto zde na obě proteázy bude odkazováno jako na „AAA proteázy“.

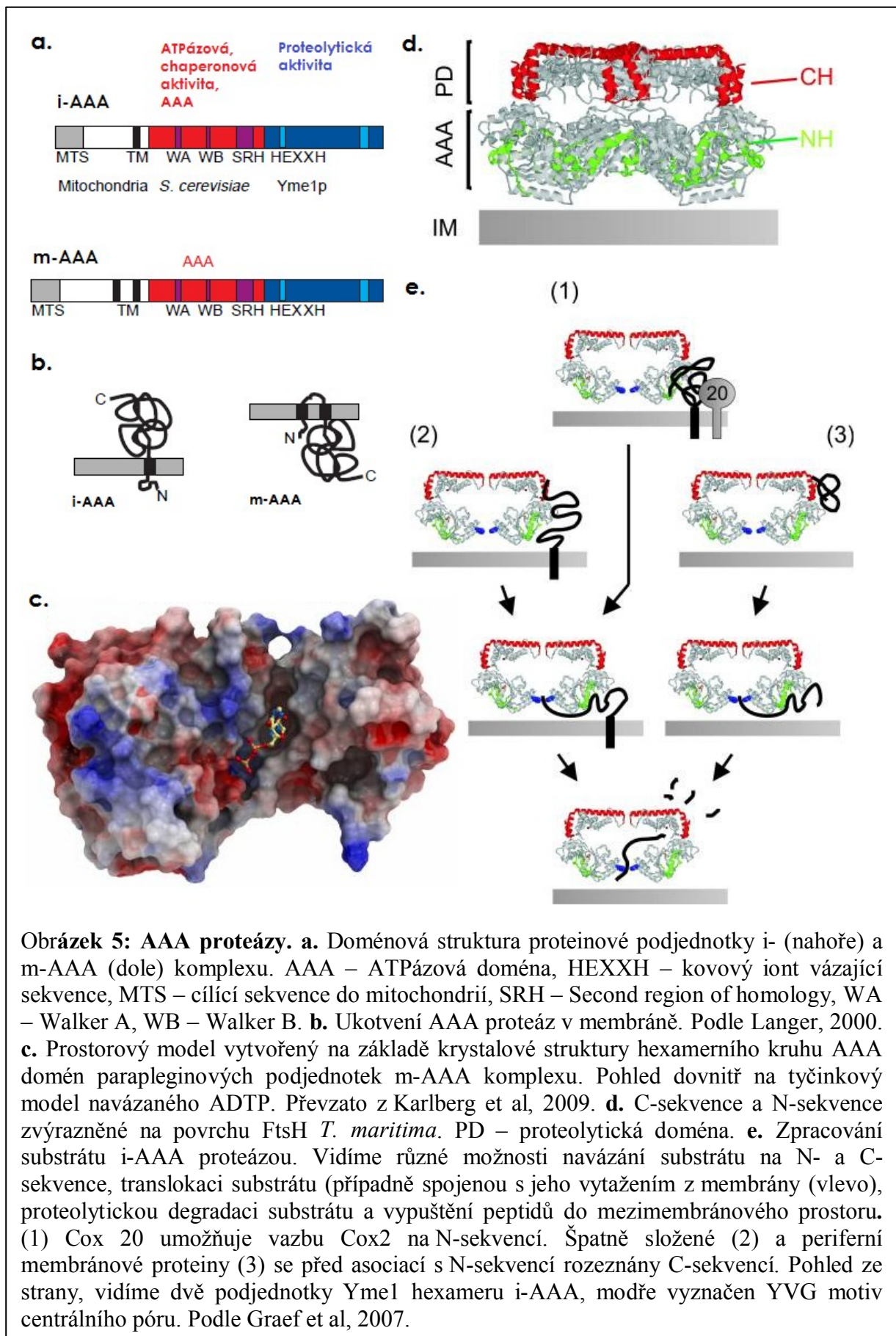
AAA proteázy jsou tvořeny velkými oligomerní komplexy o molekulové hmotnosti přibližně 1 MDa (Arlt et al, 1996; Janska et al, 2013; Leonhard et al, 1996), složenými z podjednotek o molekulové hmotnosti ~80 kDa (Langer, 2000). Všechny podjednotky různých typů m-AAA a i-AAA komplexů jsou navzájem homologní členy rodiny AAA/FtsH, v rámci které sdílejí její členové od bakteriálních FtsH proteáz, přes AAA proteázy kvasinek až po AAA proteázy lidských mitochondrií více než 40% homologii (Janska et al, 2013). Vzhledem k blízké evoluční příbuznosti podjednotek m-AAA a i-AAA komplexů, i k překrývajícím se funkcím budou obě AAA proteázy pojednány společně.

3.3.1 Isoenzymy podjednotek AAA proteáz

Do AAA/FtsH rodiny patří mnoho isoenzymů, které mohou následně tvořit komplexy v různých kombinacích. Většina bakterií obsahuje pouze jeden gen pro AAA/FtsH protein, tři geny byly nalezeny u kvasinek a lidí, a až 12 v genomu *Arabidopsis thaliana* (Janska et al, 2013). Lidská i-AAA je tvořena homooligomery sestávajícími z podjednotek YME1L (blízký homolog Yme1, Yeast mitochondrial escape protein 1, který tvoří homooligomery i-AAA u kvasinek) (Leonhard et al, 1996; Stiburek et al, 2012). Lidská m-AAA může být tvořena rovněž homooligomery podjednotek Afg312 (ATPase family gene 3-like), nebo heterooligomery složenými z Afg312 a parapleginu, u myši byla nalezena ještě Afg311, která může tvořit heterooligomery s parapleginem, s Afg312, anebo stejně jako Afg312 homooligomery (Yta10 a Yta12 tvoří heterooligomery u kvasinek) (Arlt et al, 1996; Koppen et al, 2007). Funkční význam rozmanitosti těchto isoenzymů je nejasný, pravděpodobně však slouží k optimalizaci funkce m-AAA v podmínkách různých tkání, kde fungují s mírně rozdílnými specifitami vůči substrátům. Tomu napovídá pozorovaný tkáňově specifický výskyt různých komplexů m-AAA u myši, stejně jako tkáňově specifický fenotyp myšního mutanta postrádajícího Afg312 (Koppen et al, 2007; Martinelli et al, 2009). Komplementační studie pak ukázala, že procesování lidské OPA1 (Optic Atrophy 1) GTPázy uměle exprimované v kvasinkách bylo obnoveno s větší efektivitou, pokud byl ke komplementaci mutace použit savčí homooligomerní komplex než komplex heterooligomerní obsahující paraplegin (Duvezin-Caubet et al, 2007). To by naznačovalo funkční specifika komplexů m-AAA v závislosti na podjednotkovém složení.

3.3.2 Lokalizace a struktura AAA proteáz

Proteázy m-AAA a i-AAA jsou kódovány v jaderném genomu, a lokalizovány ve vnitřní mitochondriální membráně (*viz Obr. 5b.*). Proteáza m-AAA je zakotvena v membráně přes dvě hydrofobní transmembránové sekvence, s N i C koncem v matrix mitochondrií, i-AAA proteáza přechází přes membránu jen jednou, s N koncem v mitochondriální matrix a C koncem v mezimembránovém prostoru (Langer, 2000). Směrem od N konce k C konci (*viz Obr. 5a.*) se za transmembránovou sekvencí nachází obvyklé podjednotky AAA+ ATP dependentních proteáz, s aktivním proteolytickým i ATPázovým místem na jednom polypeptidovém řetězci (Langer, 2000). Zhruba 230 aminokyselin dlouhý AAA modul klasicky obsahuje Walker A a Walker B motivy, podílející se na vazbě a hydrolýze ATP, na C konci AAA sekvence se však navíc nachází vysoce



konzervovaná sekvence zvaná SRH (Second Region of Homology, „druhý region homologie“). V SRH sekvenci nalezneme dva argininové zbytky, které zasahují do aktivního místa AAA modulu sousední podjednotky stimulující tak hydrolyzu ATP. (Hanson & Whiteheart, 2005; Iyer et al, 2004; Tatsuta & Langer, 2009) Indukované mutace argininů za jiné aminokyseliny vedly ke ztrátě ATPázové aktivity u FtsH proteáz bakterií (mutace R315L) (Karata et al, 1999) a u kvasinkových m-AAA proteáz (mutace R447A, R450A na Yta10 podjednotce) (Korbel et al, 2004). Argininové zbytky na SRH a funkční asociace podjednotek do oligomerů, kterou tyto argininy zprostředkují, jsou tedy nutné k vykonávání ATPázové aktivity (Koppen & Langer, 2007).

Postupujeme-li dále k C konci, nacházíme metalopeptidázovou doménu M41. Zkoumání krystalové struktury bakteriální FtsH ukázalo, že M41 obsahuje konsenzuální katalytickou HEXXH sekvenci (IUPAC), jejíž okrajové histidiny vážou ionty zinku (Bieniossek et al, 2006). Mutace glutamátového zbytku v HEXXH sekvenci myších podjednotek m-AAA (E567Q u Afg311, E574Q u Afg312, E575Q u parapleginu) vedly ke ztrátě proteolytické aktivity (Koppen et al, 2007). Ztráta proteolytické aktivity následkem mutace glutamátu (E559Q na podjednotce Yta-10 a E614Q na podjednotce Yta12) byla pozorována rovněž u m-AAA kvasinek (Arlt et al, 1996). Úplná ztráta proteolytické aktivity m-AAA komplexu však byla pozorována jen tehdy, pokud všechny podjednotky nesly diskutovanou mutaci, naproti tomu si heterooligomery obsahující nemutované podjednotky zbytkovou proteolytickou aktivitu zachovaly (Arlt et al, 1998; Koppen et al, 2007). Tyto studie tedy naznačují, že – na rozdíl od AAA domén – proteolytické domény při vykonávání své funkce nespolupracují, nebo alespoň není jejich spolupráce nezbytně nutná pro (částečně) zachování proteolytické funkce komplexu. Asociace podjednotek do m-AAA oligomeru je nicméně pro proteolytickou činnost nezbytná (Arlt et al, 1996). Jak bylo již pojednáno výše, m-AAA a i-AAA jsou funkční oligomery. Práce zkoumající strukturu FtsH komplexů bakterií, AAA domény lidského parapleginu (*jedné z isoenzymových podjednotek – lidských m-AAA komplexů – viz Obr. 5c.*) a nedávno publikované studie struktury m-AAA u kvasinek vypovídají o AAA/FtsH komplexech jako o hexamerech, ve kterých jsou proteolytické a ATPázové (chaperonové) podjednotky uspořádány do dvou kruhů nad sebou (Bieniossek et al, 2009; Bieniossek et al, 2006; Karlberg et al, 2009; Lee et al, 2011; Suno et al, 2006).

3.3.3 Aktivity AAA proteáz

Proteázy m-AAA a i-AAA obecně rozeznávají špatně foldované proteiny či neasemblované podjednotky jako substráty, další faktory však zřejmě zajišťující specifitu proteáz (Koppen & Langer, 2007). Podstata této specifity není blíže prozkoumána. Pro rozeznání substrátu m-AAA/i-AAA proteázou a zahájení proteolýzy stačí pouze ~20 aminokyselin dlouhý N nebo C konec vyčnívající nad membránu, do prostoru, kde se nachází proteolytický hexamer dané proteázy. Proteiny exponující unfoldované domény na obě strany membrány, tedy do matrixu i mezimembránového prostoru mitochondrií, byly kompletně proteolyzovány i při inaktivaci jakékoli jedné z obou proteáz. V soulasu s tím proteázy m-AAA a i-AAA vykazují překryv specifity v rozeznávání substrátu

(Leonhard et al, 2000). Pokusy na kvasinkových i-AAA ukazují, že k rozeznání substrátu dochází pomocí helixů lokalizovaných směrem k C konci na proteolytické doméně a N-koncově od AAA domény (v tomto kontextu dále jen C-sequvence, N-sequvence), tyto helixy se v rámci jedné podjednotky hexameru nachází poblíž sebe a tvoří mřížovitou strukturu na povrchu vnější strany hexamerního válce m-AAA (viz Obr. 5d.,e.). K rozeznání jakéhokoli substrátu je nezbytná N-sequvence, C-sequvence se naopak podílí jen na rozeznávání některých substrátů, v takovém případě pak dochází k vazbě substrátu nejprve na C-sequvenci, a až poté na N-sequvenci. S vazbou substrátu zřejmě pomáhají i různé adaptorové proteiny, jedním kandidátem na takovou roli je Cox 20, při jehož absenci se na rozeznání substrátu Cox2 i-AAA proteázou a následně na vazbě Cox2 na proteázu podílela C-sequvence spolu s N-sequvencí, zatímco za přítomnosti Cox 20 se procesu účastnila pouze N-sequvence. (Graef et al, 2007).

Po rozeznání substrátu pomocí N-sequvence dojde k ATP-dependentní translokaci substrátu přes centrální pór hexameru, který je tvořen kruhem AAA domén (Koppen & Langer, 2007). Při translokaci přes centrální pór hrají klíčovou roli smyčky obsahující konzervovaný motiv YVG (aromatická aminokyselina-hydrofobní aminokyselina-glycin), tyto smyčky vyčnívají do centra póru, a v rámci nich zejména tyrosin (Y) v YVG motivu. (Graef & Langer, 2006) ATPázová aktivita AAA proteáz je využívána pro unfoldování substrátů a jejich translokaci do proteolytické komory, podobně jako u matrixových proteáz z rodin Clp a Lon, navíc je však zřejmě potřebná i pro vytažení membránových proteinů z vnitřní mitochondriální membrány. Mezi podjednotkami kvasinkových i lidských m-AAA byla pozorována koordinace při hydrolýze ATP, která je zřejmě nutná pro energeticky náročné vytažení proteinu z vnitřní mitochondriální membrány (Tatsuta & Langer, 2009). Polypeptidový řetězec, který je úspěšně translokován do proteolytické komory, je následně proteolyticky štěpen. Není přitom známo, jak proteáza pozná, zda má daný polypeptid pouze procesovat (tedy odštěpovat z něj část za účelem změny jeho vlastností, například kvůli umožnění jeho maturace), či zda ho má podrobit úplné degradaci (Tatsuta & Langer, 2009). V případě úplné degradace proteinu vznikají oligopeptidy o molekulové hmotnosti do 3kDa, většinou o délce 10 až 20 aminokyselinových zbytků (Janska et al, 2013). Produkty mitochondriálních proteáz mohou být dále kompletně degradovány na peptidy v rámci mitochondrií prostřednictvím oligopeptidáz (Young et al, 2001), nicméně u m-AAA a i-AAA proteáz byl pozorován export peptidů z mitochondrií. Peptidy generované m-AAA proteázou se nejprve ocitají v matrix mitochondrií, odkud jsou transportovány ABC transportérem Mdl1 do mezimembránového prostoru. Peptidy produkované i-AAA se dostávají do mezimembránového prostoru přímo. Produkty obou proteáz následně putují do cytosolu pomocí komplexu TOM (Translocase of the Outer Membrane) (Langer et al, 2001). Zpracování proteinu AAA proteázou popsané v předchozích odstavcích shrnuje *Obrázek 5e*.

Představa m-AAA/i-AAA komplexů jako funkčních hexamerů popsaná výše je přesvědčivá, nicméně nevysvětluje zjištěnou molekulovou hmotnost m-AAA a i-AAA komplexů o hodnotě přibližně 1MDa

(viz výše) – respektive u lidských m-AAA v rozmezí 900 – 2000 kDa (Janska et al, 2013) a u lidských i-AAA v rozmezí 600 – 1100 kDa (Stiburek et al, 2012).

Tato molekulová hmotnost totiž neodpovídá součtu hmotností šesti podjednotek hexamerního komplexu, neboť – jak bylo již zmíněno výše – molekulová hmotnost jedné podjednotky je odhadována na ~80 kDa (Langer, 2000). Hexamerní komplexy tedy musí in vivo asociovat buď s dalšími hexamery m-AAA, respektive i-AAA, nebo s dalšími proteiny/komplexy proteinů (Janska et al, 2013).

3.3.4 Asociace AAA komplexů s dalšími proteiny

V souhlasu s druhou zmíněnou představou byly v superkomplexech s m-AAA identifikovány prohibitinové komplexy, sestávající z proteinů Phb1 a Phb2 (Steglich et al, 1999), u bakterií pak byla prokázána asociace jejich homologů HflK a HflC s FtsH komplexem (Kihara et al, 1996).

Phb1 a Phb2 jsou vysoce homologické proteiny s 50% identitou a 60% podobností aminokyselinové sekvence o hmotnostech 32 a 34 kDa, které asociují do oligomerních komplexů (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009; Nijtmans et al, 2000). Jejich předpokládaná struktura má zřejmě podobu palisádového prstence vystavěného z ~16 heterodimerů – dvojic Phb1 a Phb2 podjednotek, o průměru ~25 nm. Homodimerní asociace nebyly pozorovány (Back et al, 2002; Tatsuta et al, 2005). Výzkum protein-proteinových interakcí naznačuje funkci prohibitinových komplexů ve stabilizaci různých mitochondriálních polypeptidů, například podjednotek komplexů dýchacího řetězce (Nijtmans et al, 2000). Ztráta Phb1 nebo Phb2 vedla ke zvýšení intenzity proteolýzy neasemblovaných proteinů vnitřní mitochondriální membrány zprostředkované kvasinkovými m-AAA komplexy, což poukazuje na negativní regulaci proteolytické aktivity komplexu ze strany prohibitinů. (Steglich et al, 1999) Je možné, že regulace probíhá skrze znesnadnění přístup substrátu k m-AAA hexameru, a/nebo skrze ovlivnění jeho lipidického okolí (Koppen & Langer, 2007). S jinou představou přišli Nijtmans et al, 2000. Podle nich prohibitiny kooperují spolu s m-AAA proteázami na foldingu polypeptidů, a pokud nelze polypeptid správně složit, je předán proteáze m-AAA, která zahájí jeho destrukci. Zvýšení proteolytické činnosti m-AAA za nepřítomnosti prohibitinů by pak vyplývalo z absence chaperonové činnosti prohibitinového komplexu a následné nutnosti proteolyzovat větší množství špatně foldovaných, respektive neasemblovaných proteinů.

Vysoká molekulová hmotnost lidských m-AAA komplexů by rovněž mohla poukazovat na jejich asociaci s lidskými prohibitiny – homology kvasinkových prohibitinů Phb1 a Phb2 do podobných superkomplexů, jako je tomu u kvasinek, ačkoli přímá pozorování chybí.

U kvasinkových i-AAA byla pozorována asociace do superkomplexů spolu s proteiny Mgr 1 a Mgr 3, které tvoří adaptorový komplex a navádí k i-AAA substráty. Savčí homology těchto proteinů nebyly nalezeny (Dunn et al, 2006; Dunn et al, 2008; Janska et al, 2013).

3.3.5 Tři skupiny substrátů AAA proteáz

Z popisu struktury a mechanismu AAA proteáz vyplývá, že se jedná o sofistikované vnitrobuněčné stroje, schopné translokace integrálních membránových proteinů, unfoldování proteinů, jejich procesujícího štěpení, stejně jako jejich kompletní proteolýzy, a to i v úzké spolupráci s dalšími proteinovými komplexy. Studie účasti AAA proteáz na skládání komplexu F_1F_0 -ATP syntázy u kvasinek by mohly dokonce naznačovat, že AAA proteázy vykonávají i na proteolýze nezávislou chaperonovou funkci při skládání proteinových komplexů (Arlt et al, 1996; Francis & Thorsness, 2011). Ve vnitřní mitochondriální membráně se nachází komplexy dýchacího řetězce produkující ROS (reaktivní kyslíkové molekuly), které následně poškozují membránové proteiny. Tato skutečnost činí z AAA proteáz ústřední aktéry v systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů, AAA proteázy se však podílejí i na řadě dalších procesů v mitochondriích (Tatsuta & Langer, 2009).

Mnoho substrátů mitochondriálních AAA proteáz bylo identifikováno v kvasinkách, nicméně výsledky lze s jistou důvěrou zobecnit díky značné evoluční konzervaci funkce AAA proteáz – komplementační studie na kvasinkách ukázaly, že komplexy složené ze savčích homologů kvasinkových podjednotek úspěšně substituovaly základní funkce kvasinkových m-AAA a i-AAA proteáz (Koppen et al, 2007; Shah et al, 2000). Substráty lze rozdělit do tří funkčních kategorií (Tatsuta & Langer, 2009), a tak získat určitý třídící klíč k rozmanitým funkcím mitochondriálních AAA proteáz.

První skupinu substrátů tvoří membránové proteiny, které jsou špatně foldované, poškozené (zejména oxidativně), případně nejsou správně asemblované do proteinových komplexů, například proto, že jsou přítomné v nefyziologicky zvýšených množstvích, a nenachází tak dostatek potřebných partnerů k asemblaci do komplexu. Právě tyto proteiny jsou předmětem systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů, a podléhají proteolytické degradaci. Důležité postavení mezi nimi mají proteiny dýchacího řetězce, které tvoří velké komplexy složené z jaderně a mitochondriálně kódovaných podjednotek. Pokud některé z podjednotek těchto respiračních komplexů nenachází partnera (například v důsledku porušené koordinace exprese obou genomů), nebo se nesprávně asemblují do komplexu, bývají odbourány AAA proteázami (Tatsuta & Langer, 2009).

Jako substráty podléhající systému kontroly kvality mitochondriálních proteinů prostřednictvím kvasinkové m-AAA byly identifikovány Atp6 a Atp9 podjednotky F_1F_0 ATP syntázy, Cox3 podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce (Arlt et al, 1996), Atp7 (Korbel et al, 2004) a Atp8 podjednotky F_1F_0 ATP syntázy, Cob protein a Cox 1 podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce (Guzelin et al, 1996). V případě i-AAA proteázy pak byla identifikována Cox2 podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce (Nakai et al, 1995), Atp3 podjednotka F_1F_0 -ATP syntázy (Weber et al, 1995), Nde1 podjednotka komplexu I dýchacího řetězce (Augustin et al, 2005), prohibitiny Phb1 a Phb2 (Kambacheld et al, 2005; Nolden et al, 2005b) a proteiny Ups1 a Ups2, které regulují akumulaci kardiolipinu a fosfatidyletanolaminu (Potting et al); jako substráty lidských i-AAA pak byly odhaleny

podjednotky Ndufb6 komplexu I, ND1 komplexu I a Cox4 komplexu IV dýchacího řetězce (Stiburek et al, 2012).

U druhé skupiny substrátů nedochází k jejich úplné degradaci, ale k procesujícímu štěpení (Tatsuta & Langer, 2009). Kvasinková i savčí m-AAA zprostředkovává maturaci MrpL32 (Mitochondrial ribosomal protein L32) podjednotky mitochondriálního ribozomu, a to tak, že po importu MrpL32 do mitochondrie štěpí jeho N-koncovou cílicí sekvenci. Maturace je podmínkou k tomu, aby se MrpL32 mohlo složit spolu s dalšími podjednotkami do funkčního ribozomu (Nolden et al, 2005). Skrze maturaci MrpL32 se tak m-AAA nepřímo podílí na procesech vedoucích k expresi mitochondriálního genomu, který kóduje klíčové podjednotky komplexů dýchacího řetězce. Nefungující translace těchto podjednotek tak z velké části vysvětluje ztrátu schopnosti respirace u m-AAA deficientních mitochondrií (Koppen & Langer, 2007). Afg311 a Afg312 podjednotky m-AAA po importu do mitochondrie autokatalyticky zprostředkovávají svou vlastní maturaci a po importu parapleginu odštěpují jeho N-koncovou cílicí sekvenci (Koppen et al, 2009). Savčí m-AAA a i-AAA procesují také OPA1, dynaminu podobnou GTPázu, která se podílí na regulaci morfologie savčích mitochondrií a chrání buňky před apoptózou tím, že brání uvolnění cytochromu c jako proapoptotického signálu. (Duvezin-Caubet et al, 2007; Frezza et al, 2006; Griparic et al, 2007).

Třetí skupinu substrátů AAA proteázy pouze dislokují z membrány a zprostředkují ji tak dalším enzymům (Tatsuta & Langer, 2009). Zástupcem této skupiny substrátů je Ccp1 (Cytochrom c peroxidáza 1, enzym chránící před reaktivními molekulami kyslíku), která vychytává reaktivní kyslíkové molekuly. Jaderně kódovaný prekurzor Ccp1 je po translaci importován do vnitřní mitochondriální membrány. Dislokace prekurzoru z membrány zprostředkovaná kvasinkovou m-AAA proteázou umožní procesující štěpení Ccp1 pomocí procesující peptidázy Pcp1 a maturovaná forma Ccp1 se může uvolnit do mezimembránového prostoru (Tatsuta et al, 2007). Do této třídy substrátů by mohl spadat i savčí protein polynukleotid fosforyláza (Tatsuta & Langer, 2009).

3.3.6 Role m-AAA v dědičné spastické paraplegii a dalších onemocněních

Vzhledem důležitým funkcím, které AAA proteázy plní, lze předpokládat, že jejich deficiencie povede k různým onemocněním.

AFG3L2 gen na chromozómu 18, kódující Afg312 podjednotku – isoenzym lidské m-AAA, byl nedávno spojen s autozomálně dominantní formou spinocerebelární ataxie (SCA) (Di Bella et al, 2010). Spinocerebelární ataxie jsou heterogenní skupinou onemocnění klinicky charakterizovanou progresivní ztrátou správného držení těla, ataxií končetin (neschopností koordinace jejich pohybů) a poruchou artikulace, způsobenými degenerací mozečku a jeho dostředivých a odstředivých nervových spojení (Taroni & DiDonato, 2004 podle Martinelli & Rugarli, 2010).

Mutace v genu SPG7 pro paraplegin byla zase identifikována jako jedna z příčin autozomálně recesivní formy onemocnění HSP (dědičné spastické paraplegie) (Casari et al, 1998). Dědičnou spastickou paraplegii charakterizuje rostoucí křečovitost dolních končetin (v důsledku retrogradní

degenerace axonů motorických neuronů mozkové kůry), ztráta vibračního smyslu (vibratory sense) a močopudnost (urinary urgency) (Koppen & Langer, 2007; Martinelli & Rugarli, 2010). HSP je heterogenní onemocnění (identifikováno více než 25 lokusů) (Soderblom & Blackstone, 2006), mutace na SPG7 genu lokalizovaném na chromozomu 16 (Casari et al, 1998) je příčinou ~4% recesivních případů HSP (Elleuch et al, 2006).

Patogeneze HSP zatím nebyla objasněna, ale výzkum na myších modelech poskytuje možné scénáře. Myši postrádající paraplegin (SPG7^{-/-}) jsou charakterizovány axonopatií, která se projevuje bobtnáním axonů naplňovaných neurofilamenty a organelami, zejména abnormálními mitochondriemi, což naznačuje poruchu anterográdního axonálního transportu. U staré SPG7^{-/-} myši pak bylo pozorováno narušení retrográdního axonálního transportu. (Ferreirinha et al, 2004) Zdá se, že axonopatie je tedy způsobena poruchami v axonálním transportu. To by bylo v souladu se skutečností, že poruchy axonálního transportu jsou spojeny s patogenezí mnoha dalších typů HSP (Soderblom & Blackstone, 2006).

Zkoumání ultrastruktury mitochondrií SPG7^{-/-} myši odhalilo bobtnající mitochondrie s abnormální strukturou a rozměry v koncových částech axonů už u myši 4,5 měsíců starých. Výskyt abnormálních mitochondrií v koncových částech axonů koreloval s prostorovou distribucí axonopatických neuronů. U SPG7^{-/-} myši bylo pozorováno ~15% snížení produkce ATP, ačkoli až od 23 měsíců věku (Ferreirinha et al, 2004). Navíc, fibroblasty pacientů postižených HSP měly redukovanou aktivitu komplexu I dýchacího řetězce, zvýšenou senzitivitu k oxidačnímu stresu a sníženou schopnost syntézy ATP (Atorino et al, 2003). Deficience parapleginu tedy vede na jedné straně k abnormální morfologii mitochondrií, na straně druhé rovněž k poruchám respirace, relativně mírným zřejmě díky částečné nahraditelnosti heterooligomerních komplexů m-AAA homooligomerními Afg3l2 komplexy. Tyto mírné poruchy však mohou mít závažné důsledky v situacích, kdy je potřeba adaptovat se na vyšší energetické nároky. Je možné, že abnormální morfologie a rozměry mitochondrií vedou k snížené průchodnosti na trasách axonálního transportu, a situaci nepomáhá ani nižší energetická výkonnost mitochondrií, která nestačí k pohybu po ucpané trase, dochází tak k dalšímu ucpávání a stupňování tohoto procesu pak vyústí v axonopatické projevy (Martinelli & Rugarli, 2010).

Kauzální proces vedoucí od nefunkčnosti m-AAA komplexů obsahujících paraplegin k výše zmíněným fenotypům však zatím nebyl objasněn. Situaci komplikuje skutečnost, že většina substrátů m-AAA proteáz byla identifikována u kvasinek, jediným jednoznačně prokázaným substrátem savčí m-AAA tak zůstává MrpL32, abnormální procesování tohoto substrátu se však s neurodegenerativními procesy spojit nepodařilo (Martinelli & Rugarli, 2010; Nolden et al, 2005b). Abnormální velikost a morfologie postižených mitochondrií by mohla být způsobena akumulací nezpracovaných substrátů m-AAA proteázy, tato akumulace však rovněž nebyla experimentálně prokázána. V tomto kontextu je zajímavá identifikace GTPázy OPA1 jako substrátu procesovaného m-AAA komplexem (viz část 3.3.2). OPA1 se totiž podílí na procesech mitochondriální „fusion“ (splývání mitochondrií) a spoluurčuje morfologii krist, a tak by právě poruchy procesování tohoto proteinu v důsledku absence

parapleginové podjednotky m-AAA komplexu mohly souviset s abnormální morfologií postižených mitochondrií (Cervený et al, 2007; Frezza et al, 2006; Martinelli & Rugarli, 2010). Další výzkum bude nutný k potvrzení podobných domněnek a bližšímu objasnění diskutovaných mitochondriálních dějů.

Tkáňově specifický fenotyp HSP rovněž nebyl dostatečně vysvětlen. Nabízí se několik možných vysvětlení, která se přitom nemusí vzájemně vylučovat. Tkáňově specifické zastoupení různých podjednotek m-AAA komplexů u myši poukazuje na měnící se relativní význam parapleginu (a tedy i jeho absence) v proteolytickém systému mitochondrií v závislosti na dané tkáni, respektive buněčném typu (Koppen et al, 2007; Martinelli et al, 2009). Toto zjištění může souviset s důležitější skutečností, totiž s mírně odlišnou funkcí (substrátovou specificitou) homooligomerních a heterooligomerních (obsahujících paraplegin) m-AAA komplexů. Vzhledem k variabilitě ve složení mitochondriálního proteomu v různých myších tkáních (Mootha et al, 2003) lze také uvažovat proměnlivou citlivost mitochondrií ke ztrátě parapleginu (Koppen & Langer, 2007). Konečně se nabízí mechanistické zdůvodnění specificity HSP: Nejvíce postižené buněčné typy, motorické neurony mozkové kůry a Purkyněho buňky, se vyznačují nejdelšími axony v případě motorických neuronů, respektive nejvíce spletítm dendritickým větvením v případě Purkyněho buněk (Martinelli & Rugarli, 2010). Poruchy v axonálním transportu se tedy u těchto buněčných typů logicky projevují relativně nejvíce.

Další výzkum tkáňově specifické distribuce isoenzymů a specifických projevů deficiencie isoenzymů v různých lidských tkáních by mohl vnést do této problematiky více světla.

4 Procesující peptidázy

Do této skupiny řadíme ty komponenty proteolytického systému mitochondrií, které štěpí cílicí sekvence mitochondriálních proteinů kódovaných v jádře, na rozdíl od AAA+ proteáz však nevyžadují k této činnosti ATP (Koppen & Langer, 2007). Cílicí sekvence se mohou skládat ze dvou částí. Univerzálně přítomná je sekvence na N konci, kterou štěpí procesující peptidázy v matrix. U proteinů lokalizovaných do vnitřní membrány pak ještě následuje hydrofobní cílicí sekvence, kterou štěpí procesující peptidázy lokalizované ve vnitřní membráně mitochondrií (Teixeira & Glaser, 2013).

Procesující peptidázy můžeme tedy třídit podle výskytu v různých subkompartmentech mitochondrie, máme pak procesující peptidázy mitochondriální matrix – MPP a MIP, peptidázu IMP a proteázy z rhomboidové rodiny nalezneme ve vnitřní mitochondriální membráně a Atp23 zase v mezimembránovém prostoru (Koppen & Langer, 2007). Enzymy této skupiny často štěpí své substráty v návaznosti na jiné proteázy a podílí se tak na maturaci společně s nimi (Koppen & Langer, 2007). V následujících odstavcích bude stručně shrnuta úloha a funkční souvislosti činnosti jednotlivých procesujících peptidáz.

4.1 MPP

MPP specificky štěpí několik set substrátů – prekurzorů mitochondriálních proteinů (Teixeira & Glaser, 2013). MPP tvoří heterodimery, sestávající ze dvou podjednotek α -MPP a β -MPP (jejich

homology u kvasinek Mas1 a Mas2), obě podjednotky mají molekulovou hmotnost cca 50 kDa (dohromady tedy cca 100 kDa na jeden MPP dimer) (Koppen & Langer, 2007; Ou et al, 1989). β -MPP obsahuje katalytické metalopeptidázové místo s převráceným vazebným motivem pro zinek: HXXEHX₇₄₋₇₆E (IUPAC) (Paces et al, 1993; Teixeira & Glaser, 2013).

Analýza substrátů rostlinné MPP ukázala, že přibližně 80% z nich obsahuje arginin na pozici -2 nebo -3 od N konce maturovaného proteinu), zbylé substráty pak konzervovaný arginin neobsahovaly (Zhang et al, 2001). Další skupina substrátů (nenalezená u rostlin) obsahuje arginin na pozici -10 od N konce maturovaného proteinu (Teixeira & Glaser, 2013). Rozeznání substrátu MPP peptidázou záleží také na aminokyselinových zbytcích dále od štěpeného místa (Rudhe et al, 2004; Tanudji et al, 1999), a na strukturních elementech v rámci cílí sekvence (Waltner & Weiner, 1995).

4.2 MIP a Icp55

U substrátů štěpených MPP proteázou poblíž argininu na pozici -10 od N konce maturovaného proteinu dochází k následnému štěpení další mitochondriální proteázou MIP o osm zbytků dále směrem k C konci (Isaya et al, 1992a; Koppen & Langer, 2007). Arginin se tak nachází na pozici -2 od místa štěpení MPP peptidázou, stejně jako substráty, které MIP peptidázou následně štěpeny nejsou. MIP funguje v monomerní formě o molekulární hmotnosti ~75 kDa, její proteolytické místo obsahuje konzervovaný klasický HEXXH (IUPAC) motiv vázající zinek. Protein vykazuje široké pH optimum (6,6 – 8,9) (Isaya et al, 1992b; Kalousek et al, 1992).

V rámci oktapeptidu odštěpovaného MIP peptidázou se na pozici -8 od N konce maturovaného proteinu nachází objemný hydrofobní zbytek (Phe, Leu nebo Ile), na pozici -5 se nachází serin, threonin nebo glycin (Hendrick et al, 1989). Následující osud odštěpených oktapeptidů je podobný dalším peptidům vzniklým procesujícím nebo degradativním štěpením: Buď jsou exportovány z mitochondrie, nebo degradovány v rámci mitochondrií pomocí oligopeptidáz (Young et al, 2001). Odstranění oktapeptidů je nutné mimo jiné proto, že inhibují činnost MIP (Isaya et al, 1992a).

Substráty MPP s argininem na pozici -3 od N konce maturovaného proteinu jsou zase dále štěpeny peptidázou Icp55, která odštěpuje jeden aminokyselinový zbytek (Vogtle et al, 2009). I arginin této skupiny substrátů se tedy nachází na pozici -2 od místa štěpení MPP peptidázou, jako tomu bylo u výše zmíněných skupin substrátů.

Icp55 je periferní membránový protein ukotvený ve vnitřní membráně mitochondrií ze strany matrix (Vogtle et al, 2009), byl však lokalizovaný rovněž v jádře (Naamati et al, 2009). Naprostou většinu substrátů štěpí za fenylalaninem, leucinem nebo tyrosinem, na N konci maturovaného proteinu se ocitá serin, alanin nebo threonin (Vogtle et al, 2009). Mechanismus rozeznání substrátu a následného exopeptidázového štěpení peptidové vazby není objasněn. Navíc byl Icp55 v současnosti charakterizován pouze u kvasinek (Teixeira & Glaser, 2013).

Společným znakem dvou-krokového procesování je, že MPP peptidáza štěpením substrátů s argininem na -3, respektive -10 pozici produkuje nestabilní intermediáty, jejichž „zastřížení“ o jeden (Icp55),

respektive o 8 (MIP) aminokyselinových zbytků stabilizuje tyto intermediáty, z kterých se tak stávají plně maturované proteiny (Vogtle et al, 2011; Vogtle et al, 2009).

4.3 IMP

IMP (Inner Membrane Protease, „Proteáza vnitřní membrány“) je heterooligomerní komplex, skládá se ze dvou katalytických podjednotek Imp1 a Imp2, a nekatalytické podjednotky Som1. Katalytické podjednotky jsou integrovány do vnitřní mitochondriální membrány. Aktivní místa podjednotek obsahují serin-leucinovou dyádu a nachází se v mezimembránovém prostoru (Chen et al, 1999; Jan et al, 2000; Nunnari et al, 1993). Prekurzorové proteiny procesované IMP se nachází z velké části v mezimembránovém prostoru, svou hydrofobní cílicí (sorting) sekvencí jsou ale zakotvené ve vnitřní mitochondriální membráně. Na konci této sekvence jsou štěpeny IMP proteázou, která tak uvolňuje maturované proteiny do mezimembránového prostoru mitochondrií (Teixeira & Glaser, 2013).

Dosud bylo identifikováno pouze několik substrátů kvasinkové IMP, podjednotky Imp1 a Imp2 se ve své specificitě nepřekrývaly (Nunnari et al, 1993; Teixeira & Glaser, 2013). Jako možný substrát lidského IMP komplexu se ukazuje pro-apoptotický protein DIABLO: IMP ho pravděpodobně aktivuje procesujícím štěpením a tak se účastní apoptotické dráhy (Burri et al, 2005).

4.4 Rhomboidové proteázy

Rhomboidové proteázy (kvasinková Pcp1, lidská PARL - Presenilins-Associated Rhomboid-Like protein) jsou integrální membránové proteiny, které katalyzují – pomocí aktivního místa obsahujícího serin-histidinovou dyádu – štěpení substrátů uprostřed nebo na kraji jejich transmembránových domén, a činí tak přímo uvnitř lipidové dvojvrstvy (Koppen & Langer, 2007; Teixeira & Glaser, 2013).

U kvasinkové rhomboidové proteázy byly nalezeny dva substráty – Ccp1 (cytochrom c peroxidáza – její dvou-krokové štěpení je popsáno v části 3.3.2) a Mgm1 (Herlan et al, 2003; Tatsuta et al, 2007). Mgm1 také podléhá dvou-krokovému štěpení, N-koncová sekvence je štěpena nejdříve MPP peptidázou, vzniká tak dlouhá izoforma Mgm1, a následně Pcp1 štěpí tuto dlouhou izoformu ještě jednou, vzniká tak krátká izoforma. Splývání mitochondrií („fusion“) závisí na činnosti krátké izoformy, skrze její maturaci tak může Pcp1 nepřímo ovlivňovat dynamiku mitochondrií (Herlan et al, 2003). Pravděpodobným substrátem savčí PARL je OPA1, savčí homolog kvasinkové Mgm1 zmíněný již v kapitole o m-AAA proteázách (viz část 3.3). OPA1 chrání proti apoptóze, při absenci PARL však není schopen tuto funkci správně vykonávat (Cipolat et al, 2006). PARL dále za zprostředkování Bcl-2 proteinu Hax procesuje další mitochondriální proteázu HtrA2, která v mezimembránovém prostoru brání pro-apoptotické akumulaci Bax proteinů (Chao et al, 2008). PARL tedy hraje důležitou roli v mechanismech ochrany před apoptózou.

4.5 Atp23

Atp23 je metaloproteáza lokalizovaná v mezimembránovém prostoru kvasinkových mitochondrií. Atp23 odštěpuje 10 aminokyselin dlouhou cílicí sekvenci Atp6 podjednotky komplexu F_1F_0 -ATP syntázy. Atp23 však funguje rovněž jako chaperon během skládání F_1F_0 -ATP syntázy a pravděpodobně právě ztráta této funkce, nikoli ztráta funkce procesující, vedla u mutantů s deletovaným ATP23 genem k neschopnosti růst na nefermentovatelných substrátech (Michon et al, 1988; Osman et al, 2007). Bylo rovněž zjištěno, že Atp23 – podobně jako i-AAA proteáza – proteolyticky degraduje Ups1 protein, který se podílí na metabolismu fosfolipidů (Potting et al, 2010). Aktivita savčího homologu Atp23 nebyla dosud charakterizována (Teixeira & Glaser, 2013).

5. Oligopeptidázy

Krátké peptidy – produkty proteolytického štěpení mitochondriálních AAA proteáz a odštěpování cílicích sekvencí procesujícími peptidázami – mohou být dále kompletně degradovány na peptidy v rámci mitochondrií (Kambacheld et al, 2005; Young et al, 2001). Studie naznačují, že akumulace mitochondriálních peptidů – zřejmě díky jejich amfipatickým vlastnostem - vede k tvorbě pórů ve vnitřní membráně, důsledkem čehož dochází k poruše membrány, rozpráhnutí oxidační fosforylace (uncoupling) a rozptýlení membránového potenciálu (Nicolay et al, 1994). Vzhledem k exportu části peptidů z mitochondrií pomocí ABC transportéru Mdl1 se někteří autoři domnívají, že peptidy by mohly sloužit k signalizaci za účelem koordinace exprese jaderného a mitochondriálního genomu (Arnold et al, 2006; Young et al, 2001). Štěpení peptidů v mitochondriích je tedy patrně důležitý proces s možnými ochrannými i regulačními důsledky. Mají jej na starosti enzymy ze skupiny oligopeptidáz – tato skupina je dosud nejméně charakterizovanou složkou mitochondriálního proteolytického systému.

V mezimembránovém prostoru kvasinkových mitochondrií byly lokalizovány metalopeptidázy PreP a PrD1 (a u člověka její lidský homolog neurolysin) (Kambacheld et al, 2005; Koppen & Langer, 2007). Štěpí nejen peptidy vzniklé v mezimembránovém prostoru, ale také peptidy původem z matrix transportované do mezimembránového prostoru Mdl1 transportérem (Kambacheld et al, 2005). U *Saccharomyces cerevisiae* byla PreP lokalizována v mitochondriální matrix (Alikhani et al). Mutantní kvasinky postrádající PreP nebyly schopny růst na nefermentovatelných substrátech. Z toho lze vyvozovat, že funkce PreP úzce souvisí s udržováním respirační kompetence buňky (Kambacheld et al, 2005). U člověka byl v matrix mitochondrií lokalizován homolog PreP zvaný hPreP (Falkevall et al, 2006). Proteomické studie naznačují, že hPreP je univerzálně přítomný v lidských mitochondriích všech hlavních buněčných typů (Burkard et al, 2011). Vedle štěpení produktů proteolytického systému štěpí také amyloid β peptid ($A\beta$), jehož akumulace vede k rozvoji Alzheimerovy choroby (Falkevall et al, 2006). Oligopeptidáza hPreP se tak zřejmě účastní likvidace $A\beta$ peptidů v mitochondriích a tedy

ochrany před Alzheimerovou chorobou. V souhlasu s tím bylo pozorováno výrazné snížení aktivity hPreP v hypotalamu pacientů s Alzheimerovou chorobou (Teixeira & Glaser, 2013).

V matrix mitochondrií kvasinek byla identifikována další oligopeptidáza, cysteinová peptidáza Lap3, která se nachází rovněž v cytosolu, známá jako bleomycin hydroláza. Její úloha v mitochondriální matrix zatím nebyla charakterizována (Koppen & Langer, 2007).

6. Ostatní proteázy

V rámci mitochondriálního proteolytického systému existují další proteázy, které nelze zařadit do tří výše uvedených skupin.

Proteáza OmA1 byla nalezena ve vnitřní mitochondriální membráně kvasinek, její katalytické místo se nachází v mitochondriální matrix, degradace substrátu však byla pozorována na obou stranách vnitřní membrány. Je schopná bez spotřeby ATP degradovat špatně foldované proteiny, její funkce se tedy podobá m-AAA proteáze a zřejmě funguje za podmínek omezené aktivity m-AAA proteázy (Kaser et al, 2003). OmA1 při rozpřáhnutí oxidační fosforylace (uncoupling) proteolyticky štěpí OPA1, dynaminu podobnou GTPázu chránící buňky proti apoptóze a zajišťující mitochondriální „fusion“ (splývání mitochondrií) (Cervený et al, 2007; Frezza et al, 2006), která již byla diskutována v souvislosti s m-AAA a PARL proteiny (viz část 3.3.2 a 4.4). RNAi knockdown OmA1 proteázy vedl k zastavení OmA1 proteázou zprostředkované proteolýzy OPA1 proteinu, a následkem toho k udržení kompetence mitochondrie k mitochondriální „fusion“ a k oddálení nástupu apoptózy. (Head et al, 2009; McBride & Soubannier, 2010)

Serinová proteáza HtrA2 funguje jako trimer v mezimembránovém prostoru savčích mitochondrií (Hegde et al, 2002; Li et al, 2002). HtrA2 obsahuje jednak proteolytickou doménu, a rovněž regulační PDZ doménu, která se, pokud není blokována jiným peptidem, váže na proteolytickou doménu a blokuje tak činnost proteázy (Martins et al, 2003). Bylo pozorováno, že HtrA2 je pod vlivem apoptotického stimulu uvolněna z mitochondrií a váže pomocí další ze svých domén molekuly inhibitorů apoptózy (IAP), kterým tak zabráňuje interagovat s kaspázami a dále inhibovat apoptózu (Hegde et al, 2002; Suzuki et al, 2001). Svou proteolytickou činností HtrA2 rovněž podporuje apoptózu (Verhagen et al, 2002). V rozporu s proapoptotickou funkcí je zjištění, že delece HtrA2 u myši nevedla ke zpomalení apoptózy, ale k selektivní neurodegeneraci, naznačuje tak úlohu HtrA2 v ochraně neuronů (Martins et al, 2004). Dále, u myších lymfocytů bylo pozorováno, že HtrA2 v mitochondriálním mezimembránovém prostoru brání akumulaci proapoptotických Bax proteinů (Chao et al, 2008). Lze si tak představit, že HtrA2 vykonává v buňce dvě protichůdné úlohy: Uvnitř mitochondrií brání HtrA2 proteáza ve spolupráci s rhomboidovou proteázou PARL (viz část 4.4) nástupu apoptózy, po uvolnění do cytosolu na základě apoptotického stimulu naopak apoptózu propaguje.

Možná souvislost HtrA2 a Parkinsonovy choroby zůstává předmětem sporů. Některé studie naznačují funkční spojitost mezi proteázou HtrA2 a kinázou PINK (PTEN-Induced Putative Kinase), jejíž deficiencie je zodpovědná za autozomálně recesivní formu Parkinsonovy choroby, jiné studie takovou spojitost popírají. Bližší diskuzi problému podává Martinelli & Rugarli, 2010.

Další studie budou nutné, mají-li být doplněny a vysvětleny dosavadní rozporuplné výsledky objasněna úloha HtrA2 proteázy a jejího vztah k rozvoji Parkinsonovy choroby.

7. Závěr

Od prvních prací, které prokázali existenci homologů bakteriálních proteáz uvnitř mitochondrií, výzkum mitochondriálních proteáz značně pokročil. Rýsuje se představa mitochondriální proteolýzy jako systému ve středu biogeneze mitochondrií, tedy jako systému podílejícího se na všech zásadních mitochondriálních dějích, ať už prostřednictvím kontroly kvality proteinů (Koppen & Langer, 2007; Tatsuta & Langer, 2008), procesováním proteinových prekurzorů (Teixeira & Glaser, 2013), či účasti na proapoptotických či protiapoptotických procesech v případě HtrA2 a PARL proteáz (Chao et al, 2008).

Ukazuje se, že mitochondriální proteolytický systém plní své rozmanité funkce prostřednictvím dělby práce mezi jednotlivé skupiny enzymů. Schematická představa základní role proteolytického systému v mitochondrii je následující: Mitochondriální proteiny kódované v jádře a translokované do mitochondrie se stávají substráty procesujících peptidáz, které z nich odštěpí cílové sekvence. Následně se maturované proteiny pokusí zaujmout správnou terciární strukturu, a případně asemblovat do proteinových komplexů. Pokud se jim to nepodaří, nebo dojde-li k jejich poškození (například oxidativnímu), jsou rozeznány AAA+ proteázami, které je nejdříve unfoldují prostřednictvím svých ATP dependentních domén a posléze degradují na krátké peptidy. Peptidy vzniklé tímto procesujícím štěpením i produkty proteolytické degradace jsou následně buď exportovány z mitochondrie a metabolizovány mimo ni, nebo jsou degradovány na jednotlivé aminokyseliny přímo v mitochondriích, pomocí mitochondriálních oligopeptidáz. Vzhledem k tomu, že tyto peptidy by mohly sloužit ke komunikaci mezi jaderným a mitochondriálním genomem (Arnold et al, 2006), oligopeptidázy by prostřednictvím jejich degradace mohly tuto komunikaci regulovat.

Stále více studií ale ukazuje, že spektrum funkcí mitochondriálních proteáz je podstatně širší, než by předpokládalo výše uvedené (notně zjednodušené) schéma. Například lidská AAA+ proteáza Lon zdaleka neplní jen svou úlohu v systému kontroly kvality proteinů, jak by vyplývalo z předchozího odstavce. Váže se také na mitochondriální DNA a reguluje její transkripci (Matsushima et al, 2010), přes proteolýzu StAR proteinu reguluje syntézu steroidů (Granot et al, 2007), dále reguluje syntézu hemů (Tian et al, 2011) a zřejmě souvisí i s procesy stárnutí (Matsushima & Kaguni, 2012). Procesivní štěpení zase není výhradní funkcí procesujících peptidáz, podílí se na něm rovněž AAA proteázy, jako v případě procesování OPA1 (Duvezin-Caubet et al, 2007), nebo MrpL32 (Nolden et al, 2005).

Některé funkce AAA+ a dalších proteáz dokonce nesouvisí s proteolýzou. Tak se například Lon podílí prostřednictvím své chaperonové (AAA) domény na skládání komplexu IV dýchacího řetězce (Hori et al, 2002), a Atp23 zase spolupracuje na složení komplexu F₁F₀-ATP syntázy (Osman et al, 2007). I tyto poznatky o rozmanitých funkcích mitochondriálních proteáz však mohou být jen pomyslnou špičkou ledovce.

O některých komponentách mitochondriálního proteolytického systému (zejména pak o enzymech ze skupiny oligopeptidáz) máme jen velmi omezené poznatky. Situace je podstatně lepší ohledně našich znalostí mitochondriálních AAA+ proteáz. I v tomto případě však zůstává problematickým aspektem stavu našeho poznání to, že mnoho obecných poznatků o mitochondriálních proteázách je odvozeno z funkce bakteriálních homologů. Takové modely sice umožňují – díky homologii mitochondriálních proteáz napříč i poměrně vzdálenými taxony – jisté obecné závěry, pomíjí však specifické vlastnosti a funkce proteáz. Substráty AAA proteáz byly většinou identifikovány v kvasinkách, v případě m-AAA proteázy pak takřka výhradně. O funkci ClpXP proteázy v mitochondriích nevíme skoro nic, máme informace téměř výhradně jen o jejích bakteriálních homologích. Je tomu tak z velké části proto, že homolog ClpP proteinové podjednotky u kvasinek nalezený nebyl. Úkolem pro výzkum příštích let bude tedy prokázat poznatky extrapolované z kvasinkových (a někdy dokonce z bakteriálních) modelů přímo na savčích modelech, ať už na modelech myších, nebo na kulturách lidských buněk, pomocí knock-outových studií, RNA interference a dalších metod.

To je zásadní zejména pro aplikaci těchto poznatků v medicíně. Již nyní se ukazuje důležitá role mitochondriálních proteáz v řadě závažných dědičných onemocnění. Mnoho otázek však zůstává nezodpovězeno. Mutace v genu SPG7 pro podjednotku paraplegin m-AAA je jako příčina jedné z forem dědičné spastické paraplegie (HSP) známa již delší dobu (Casari et al, 1998). Tkáňově specifický fenotyp této choroby není však stále zcela vysvětlen, stejně jako patologický proces retrogradní axonopatie motorických neuronů mozkové kůry. Ačkoli jsou tyto axonopatie způsobeny pravděpodobně poruchami mitochondriálního transportu (Martinelli & Rugarli, 2010), není jasné, jakým způsobem vede dysfunkce m-AAA až k poruše axonálního transportu. Zjištění, že oligopeptidáza PreP štěpí amyloid beta (Falkevall et al, 2006), zase naznačuje asociaci této oligopeptidázy s Alzheimerovou chorobou, a s takovou představou souhlasí i výrazné snížení aktivity PreP pozorované v hypotalamu pacientů postižených touto chorobou (Teixeira & Glaser, 2013). Kontroverzní zůstává možná funkční souvislost mezi proteázou HtrA2 a Parkinsonovou chorobou, zprostředkovaná přes kinázu PINK (Martinelli & Rugarli, 2010).

Vedle známé souvislosti HSP a parapleginu, a diskutované úloze dysfunkce mitochondriálních proteáz v rozvoji Alzheimerovy a možná i Parkinsonovy choroby se však ukazuje, že i další onemocnění souvisí s mutacemi genů pro mitochondriální proteázy. Nedávná studie propojila recesivní mutaci v genu CLPP pro ClpP podjednotku ClpXP komplexu s Perraultovým syndromem (Jenkinson et al, 2013). Jiná poměrně recentní studie zase ukázala na mutaci v Afg3l2 podjednotce jako na příčinu autozomálně dominantní formy spinocerebelární ataxie (SCA28) (Di Bella et al, 2010). A nebude

překvapivé, pokud biomedicínský výzkum v příštích letech odhalí další choroby, jejichž souvislost s dysfunkcí mitochondriálních proteáz dosud předpokládána nebyla.

Použitá literatura

- Alikhani N, Berglund AK, Engmann T, Spanning E, Vogtle FN, Pavlov P, Meisinger C, Langer T, Glaser E Targeting capacity and conservation of PreP homologues localization in mitochondria of different species. *J Mol Biol* **410**(3): 400-410
- Arlt H, Steglich G, Perryman R, Guiard B, Neupert W, Langer T (1998) The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J* **17**(16): 4837-4847
- Arlt H, Tauer R, Feldmann H, Neupert W, Langer T (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* **85**(6): 875-885
- Arnold I, Wagner-Ecker M, Ansorge W, Langer T (2006) Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signalling pathway in respiring cells lacking i-AAA protease and the ABC-transporter Mdl1. *Gene* **367**: 74-88
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N (2009) Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab* **20**(8): 394-401
- Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G (2003) Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* **163**(4): 777-787
- Augustin S, Nolden M, Muller S, Hardt O, Arnold I, Langer T (2005) Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J Biol Chem* **280**(4): 2691-2699
- Back JW, Sanz MA, De Jong L, De Koning LJ, Nijtmans LG, De Koster CG, Grivell LA, Van Der Spek H, Muijsers AO (2002) A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein Sci* **11**(10): 2471-2478
- Bakala H, Delaval E, Hamelin M, Bismuth J, Borot-Laloi C, Corman B, Friguet B (2003) Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem* **270**(10): 2295-2302
- Baker TA, Sauer RT (2006) ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends Biochem Sci* **31**(12): 647-653
- Bayot A, Gareil M, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P, Friguet B, Bulteau AL (2010) Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. *J Biol Chem* **285**(15): 11445-11457
- Bender T, Leidhold C, Ruppert T, Franken S, Voos W (2010) The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* **10**(7): 1426-1443
- Beuron F, Maurizi MR, Belnap DM, Kocsis E, Booy FP, Kessel M, Steven AC (1998) At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J Struct Biol* **123**(3): 248-259
- Bieniossek C, Niederhauser B, Baumann UM (2009) The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21579-21584
- Bieniossek C, Schalch T, Bumann M, Meister M, Meier R, Baumann U (2006) The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3066-3071

Bota DA, Ngo JK, Davies KJ (2005) Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic Biol Med* **38**(5): 665-677

Botos I, Melnikov EE, Cherry S, Tropea JE, Khalatova AG, Rasulova F, Dauter Z, Maurizi MR, Rotanova TV, Wlodawer A, Gustchina A (2004) The catalytic domain of Escherichia coli Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J Biol Chem* **279**(9): 8140-8148

Bross P, Andresen BS, Knudsen I, Kruse TA, Gregersen N (1995) Human ClpP protease: cDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal assignment of the gene. *FEBS Lett* **377**(2): 249-252

Burkard TR, Planyavsky M, Kaupe I, Breitwieser FP, Burckstummer T, Bennett KL, Superti-Furga G, Colinge J (2011) Initial characterization of the human central proteome. *BMC Syst Biol* **5**: 17

Burri L, Strahm Y, Hawkins CJ, Gentle IE, Puryer MA, Verhagen A, Callus B, Vaux D, Lithgow T (2005) Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* **16**(6): 2926-2933

Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Cocozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio A (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**(6): 973-983

Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H (2007) Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol* **17**(11): 563-569

Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamo L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**(1): 163-175

Corydon TJ, Bross P, Holst HU, Neve S, Kristiansen K, Gregersen N, Bolund L (1998) A human homologue of Escherichia coli ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. *Biochem J* **331** (Pt 1): 309-316

Corydon TJ, Wilsbech M, Jespersgaard C, Andresen BS, Borglum AD, Pedersen S, Bolund L, Gregersen N, Bross P (2000) Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial ClpX. *Mamm Genome* **11**(10): 899-905

de Sagarra MR, Mayo I, Marco S, Rodriguez-Vilarino S, Oliva J, Carrascosa JL, Casta n JG (1999) Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of E. coli ClpP. *J Mol Biol* **292**(4): 819-825

Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, Plumari M, Battaglia G, Pastore A, Finardi A, Cagnoli C, Tempia F, Frontali M, Veneziano L, Sacco T, Boda E, Brussino A, Bonn F, Castellotti B, Baratta S, Mariotti C, Gellera C, Fracasso V, Magri S, Langer T, Plevani P, Di Donato S, Muzi-Falconi M, Taroni F (2010) Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet* **42**(4): 313-321

Duman RE, Lowe J (2010) Crystal structures of Bacillus subtilis Lon protease. *J Mol Biol* **401**(4): 653-670

Dunn CD, Lee MS, Spencer FA, Jensen RE (2006) A genomewide screen for petite-negative yeast strains yields a new subunit of the i-AAA protease complex. *Mol Biol Cell* **17**(1): 213-226

Dunn CD, Tamura Y, Sesaki H, Jensen RE (2008) Mgr3p and Mgr1p are adaptors for the mitochondrial i-AAA protease complex. *Mol Biol Cell* **19**(12): 5387-5397

Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T, Reichert AS (2007) OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* **18**(9): 3582-3590

- Elleuch N, Depienne C, Benomar A, Hernandez AM, Ferrer X, Fontaine B, Grid D, Tallaksen CM, Zemmouri R, Stevanin G, Durr A, Brice A (2006) Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia. *Neurology* **66**(5): 654-659
- Falkevall A, Alikhani N, Bhushan S, Pavlov PF, Busch K, Johnson KA, Eneqvist T, Tjernberg L, Ankarcrona M, Glaser E (2006) Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidosome, PreP. *J Biol Chem* **281**(39): 29096-29104
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Gaeta L, Casari G, Ballabio A, Rugarli EI (2004) Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest* **113**(2): 231-242
- Fischer F, Weil A, Hamann A, Osiewacz HD (2013) Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal ClpP deletion strain. *Nat Commun* **4**: 1397
- Flynn JM, Neher SB, Kim YI, Sauer RT, Baker TA (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**(3): 671-683
- Francis BR, Thorsness PE (2011) Hsp90 and mitochondrial proteases Yme1 and Yta10/12 participate in ATP synthase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* **11**(4): 587-600
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**(1): 177-189
- Fu GK, Markovitz DM (1998) The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* **37**(7): 1905-1909
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**(1): 111-122
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 63-77
- Gottesman S, Clark WP, de Crecy-Lagard V, Maurizi MR (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J Biol Chem* **268**(30): 22618-22626
- Graef M, Langer T (2006) Substrate specific consequences of central pore mutations in the i-AAA protease Yme1 on substrate engagement. *J Struct Biol* **156**(1): 101-108
- Graef M, Seewald G, Langer T (2007) Substrate recognition by AAA+ ATPases: distinct substrate binding modes in ATP-dependent protease Yme1 of the mitochondrial intermembrane space. *Mol Cell Biol* **27**(7): 2476-2485
- Granot Z, Kobiler O, Melamed-Book N, Eimerl S, Bahat A, Lu B, Braun S, Maurizi MR, Suzuki CK, Oppenheim AB, Orly J (2007) Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors. *Mol Endocrinol* **21**(9): 2164-2177
- Griparic L, Kanazawa T, van der Blik AM (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* **178**(5): 757-764
- Guzelin E, Rep M, Grivell LA (1996) Afg3p, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, IV and V. *FEBS Lett* **381**(1-2): 42-46
- Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(7): 519-529
- Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* **13**(4): 467-480

- Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Blik AM (2009) Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* **187**(7): 959-966
- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**(1): 432-438
- Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(11): 4056-4060
- Herlan M, Vogel F, Bornhvd C, Neupert W, Reichert AS (2003) Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* **278**(30): 27781-27788
- Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, Tohyama M, D MS, Ogawa S (2002) Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. *J Cell Biol* **157**(7): 1151-1160
- Cha SS, An YJ, Lee CR, Lee HS, Kim YG, Kim SJ, Kwon KK, De Donatis GM, Lee JH, Maurizi MR, Kang SG (2010) Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber. *EMBO J* **29**(20): 3520-3530
- Chao JR, Parganas E, Boyd K, Hong CY, Opferman JT, Ihle JN (2008) Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature* **452**(7183): 98-102
- Chen SH, Suzuki CK, Wu SH (2008) Thermodynamic characterization of specific interactions between the human Lon protease and G-quartet DNA. *Nucleic Acids Res* **36**(4): 1273-1287
- Chen X, Van Valkenburgh C, Fang H, Green N (1999) Signal peptides having standard and nonstandard cleavage sites can be processed by Imp1p of the mitochondrial inner membrane protease. *J Biol Chem* **274**(53): 37750-37754
- Isaya G, Kalousek F, Rosenberg LE (1992a) Amino-terminal octapeptides function as recognition signals for the mitochondrial intermediate peptidase. *J Biol Chem* **267**(11): 7904-7910
- Isaya G, Kalousek F, Rosenberg LE (1992b) Sequence analysis of rat mitochondrial intermediate peptidase: similarity to zinc metallopeptidases and to a putative yeast homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8317-8321
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**(1-2): 11-31
- Jan PS, Esser K, Pratje E, Michaelis G (2000) Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Mol Gen Genet* **263**(3): 483-491
- Janska H, Kwasniak M, Szczepanowska J (2013) Protein quality control in organelles - AAA/FtsH story. *Biochim Biophys Acta* **1833**(2): 381-387
- Jenkinson EM, Rehman AU, Walsh T, Clayton-Smith J, Lee K, Morell RJ, Drummond MC, Khan SN, Naeem MA, Rauf B, Billington N, Schultz JM, Urquhart JE, Lee MK, Berry A, Hanley NA, Mehta S, Cilliers D, Clayton PE, Kingston H, Smith MJ, Warner TT, Black GC, Trump D, Davis JR, Ahmad W, Leal SM, Riazuddin S, King MC, Friedman TB, Newman WG (2013) Perrault Syndrome Is Caused by Recessive Mutations in CLPP, Encoding a Mitochondrial ATP-Dependent Chambered Protease. *Am J Hum Genet* **92**(4): 605-613

- Joshi SA, Baker TA, Sauer RT (2003) C-terminal domain mutations in ClpX uncouple substrate binding from an engagement step required for unfolding. *Mol Microbiol* **48**(1): 67-76
- Kalousek F, Isaya G, Rosenberg LE (1992) Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J* **11**(8): 2803-2809
- Kambacheld M, Augustin S, Tatsuta T, Muller S, Langer T (2005) Role of the novel metallopeptidase Mop112 and saccharolysin for the complete degradation of proteins residing in different subcompartments of mitochondria. *J Biol Chem* **280**(20): 20132-20139
- Kang SG, Dimitrova MN, Ortega J, Ginsburg A, Maurizi MR (2005) Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX. *J Biol Chem* **280**(42): 35424-35432
- Kang SG, Maurizi MR, Thompson M, Mueser T, Ahvazi B (2004) Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J Struct Biol* **148**(3): 338-352
- Kang SG, Ortega J, Singh SK, Wang N, Huang NN, Steven AC, Maurizi MR (2002) Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP. *J Biol Chem* **277**(23): 21095-21102
- Karata K, Inagawa T, Wilkinson AJ, Tatsuta T, Ogura T (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J Biol Chem* **274**(37): 26225-26232
- Karlberg T, van den Berg S, Hammarstrom M, Sagemark J, Johansson I, Holmberg-Schiavone L, Schuler H (2009) Crystal structure of the ATPase domain of the human AAA+ protein paraplegin/SPG7. *PLoS One* **4**(10): e6975
- Kaser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T (2003) Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem* **278**(47): 46414-46423
- Kenniston JA, Baker TA, Fernandez JM, Sauer RT (2003) Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* **114**(4): 511-520
- Kihara A, Akiyama Y, Ito K (1996) A protease complex in the Escherichia coli plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J* **15**(22): 6122-6131
- Koppen M, Bonn F, Ehses S, Langer T (2009) Autocatalytic processing of m-AAA protease subunits in mitochondria. *Mol Biol Cell* **20**(19): 4216-4224
- Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**(3): 221-242
- Koppen M, Metodiev MD, Casari G, Rugarli EI, Langer T (2007) Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Biol* **27**(2): 758-767
- Korbel D, Wurth S, Kaser M, Langer T (2004) Membrane protein turnover by the m-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits. *EMBO Rep* **5**(7): 698-703
- Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci* **25**(5): 247-251
- Langer T, Kaser M, Klanner C, Leonhard K (2001) AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 431-436
- Lee C, Schwartz MP, Prakash S, Iwakura M, Matouschek A (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell* **7**(3): 627-637

- Lee S, Augustin S, Tatsuta T, Gerdes F, Langer T, Tsai FT (2011) Electron cryomicroscopy structure of a membrane-anchored mitochondrial AAA protease. *J Biol Chem* **286**(6): 4404-4411
- Leonhard K, Guiard B, Pellicchia G, Tzagoloff A, Neupert W, Langer T (2000) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol Cell* **5**(4): 629-638
- Leonhard K, Herrmann JM, Stuart RA, Mannhaupt G, Neupert W, Langer T (1996) AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J* **15**(16): 4218-4229
- Li W, Srinivasula SM, Chai J, Li P, Wu JW, Zhang Z, Alnemri ES, Shi Y (2002) Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol* **9**(6): 436-441
- Margulis L, Bermudes D (1985) Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* **1**: 101-124
- Martinelli P, La Mattina V, Bernacchia A, Magnoni R, Cerri F, Cox G, Quattrini A, Casari G, Rugarli EI (2009) Genetic interaction between the m-AAA protease isoenzymes reveals novel roles in cerebellar degeneration. *Hum Mol Genet* **18**(11): 2001-2013
- Martinelli P, Rugarli EI (2010) Emerging roles of mitochondrial proteases in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* **1797**(1): 1-10
- Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Teismann P, Abuin A, Grau E, Geppert M, Livi GP, Creasy CL, Martin A, Hargreaves I, Heales SJ, Okada H, Brandner S, Schulz JB, Mak T, Downward J (2004) Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* **24**(22): 9848-9862
- Martins LM, Turk BE, Cowling V, Borg A, Jarrell ET, Cantley LC, Downward J (2003) Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* **278**(49): 49417-49427
- Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS (2010) Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(43): 18410-18415
- Matsushima Y, Kaguni LS (2012) Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim Biophys Acta* **1819**(9-10): 1080-1087
- McBride H, Soubannier V (2010) Mitochondrial function: OMA1 and OPA1, the grandmasters of mitochondrial health. *Curr Biol* **20**(6): R274-276
- Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N (2008) The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* **134**(1): 22-24
- Michon T, Galante M, Velours J (1988) NH₂-terminal sequence of the isolated yeast ATP synthase subunit 6 reveals post-translational cleavage. *Eur J Biochem* **172**(3): 621-625
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ (2007) Different fates of mitochondria: alternative ways for degradation? *Autophagy* **3**(1): 4-9
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* **115**(5): 629-640
- Naamati A, Regev-Rudzki N, Galperin S, Lill R, Pines O (2009) Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, lcp55. *J Biol Chem* **284**(44): 30200-30208

- Nakai T, Yasuhara T, Fujiki Y, Ohashi A (1995) Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* **15**(8): 4441-4452
- Ngo JK, Davies KJ (2009) Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radic Biol Med* **46**(8): 1042-1048
- Nicolay K, Laterveer FD, van Heerde WL (1994) Effects of amphipathic peptides, including presequences, on the functional integrity of rat liver mitochondrial membranes. *J Bioenerg Biomembr* **26**(3): 327-334
- Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, Muijsers AO, van der Spek H, Grivell LA (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J* **19**(11): 2444-2451
- Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T (2005b) The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **123**(2): 277-289
- Nolden M, Kisters-Woike B, Langer T, Graef M (2005) Quality Control of Proteins in the mitochondrion. In *Chaperones*, Makarow M, Braakman I (eds), Vol. 16, Topics in Current Genetics edn. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin
- Nunnari J, Fox TD, Walter P (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* **262**(5142): 1997-2004
- Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T (2007) Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. *Mol Biol Cell* **18**(2): 627-635
- Ou WJ, Ito A, Okazaki H, Omura T (1989) Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J* **8**(9): 2605-2612
- Paces V, Rosenberg LE, Fenton WA, Kalousek F (1993) The beta subunit of the mitochondrial processing peptidase from rat liver: cloning and sequencing of a cDNA and comparison with a proposed family of metallopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11): 5355-5358
- Potting C, Wilmes C, Engmann T, Osman C, Langer T Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J* **29**(17): 2888-2898
- Potting C, Wilmes C, Engmann T, Osman C, Langer T (2010) Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J* **29**(17): 2888-2898
- Rep M, van Dijk JM, Suda K, Schatz G, Grivell LA, Suzuki CK (1996) Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* **274**(5284): 103-106
- Rotanova TV, Melnikov EE, Khalatova AG, Makhovskaya OV, Botos I, Wlodawer A, Gustchina A (2004) Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur J Biochem* **271**(23-24): 4865-4871
- Rudhe C, Clifton R, Chew O, Zemam K, Richter S, Lamppa G, Whelan J, Glaser E (2004) Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol* **343**(3): 639-647
- Santagata S, Bhattacharyya D, Wang FH, Singha N, Hodtsev A, Spanopoulou E (1999) Molecular cloning and characterization of a mouse homolog of bacterial ClpX, a novel mammalian class II member of the Hsp100/Clp chaperone family. *J Biol Chem* **274**(23): 16311-16319

- Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ES, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**(1): 9-18
- Shah ZH, Hakkaart GA, Arku B, de Jong L, van der Spek H, Grivell LA, Jacobs HT (2000) The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett* **478**(3): 267-270
- Scheffler IE (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**(1): 3-31
- Smith GR, Contreras-Moreira B, Zhang X, Bates PA (2004) A link between sequence conservation and domain motion within the AAA+ family. *J Struct Biol* **146**(1-2): 189-204
- Soderblom C, Blackstone C (2006) Traffic accidents: molecular genetic insights into the pathogenesis of the hereditary spastic paraplegias. *Pharmacol Ther* **109**(1-2): 42-56
- Stahlberg H, Kutejova E, Suda K, Wolpensinger B, Lustig A, Schatz G, Engel A, Suzuki CK (1999) Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6787-6790
- Steel GJ, Harley C, Boyd A, Morgan A (2000) A screen for dominant negative mutants of SEC18 reveals a role for the AAA protein consensus sequence in ATP hydrolysis. *Mol Biol Cell* **11**(4): 1345-1356
- Steglich G, Neupert W, Langer T (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol* **19**(5): 3435-3442
- Stiburek L, Cesnekova J, Kostkova O, Fornuskova D, Vinsova K, Wenich L, Houstek J, Zeman J (2012) YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol Biol Cell* **23**(6): 1010-1023
- Stiburek L, Zeman J (2010) Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 1149-1158
- Suno R, Niwa H, Tsuchiya D, Zhang X, Yoshida M, Morikawa K (2006) Structure of the whole cytosolic region of ATP-dependent protease FtsH. *Mol Cell* **22**(5): 575-585
- Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G (1994) Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**(5156): 273-276
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**(3): 613-621
- Tanudji M, Sjoling S, Glaser E, Whelan J (1999) Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *J Biol Chem* **274**(3): 1286-1293
- Tatsuta T, Augustin S, Nolden M, Friedrichs B, Langer T (2007) m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. *EMBO J* **26**(2): 325-335
- Tatsuta T, Langer T (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* **27**(2): 306-314
- Tatsuta T, Langer T (2009) AAA proteases in mitochondria: diverse functions of membrane-bound proteolytic machines. *Res Microbiol* **160**(9): 711-717
- Tatsuta T, Model K, Langer T (2005) Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* **16**(1): 248-259

- Teixeira PF, Glaser E (2013) Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1833**(2): 360-370
- Thompson MW, Maurizi MR (1994) Activity and specificity of Escherichia coli ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J Biol Chem* **269**(27): 18201-18208
- Tian Q, Li T, Hou W, Zheng J, Schrum LW, Bonkovsky HL (2011) Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells. *J Biol Chem* **286**(30): 26424-26430
- van Dyck L, Dembowski M, Neupert W, Langer T (1998) Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett* **438**(3): 250-254
- Van Dyck L, Pearce DA, Sherman F (1994) PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **269**(1): 238-242
- Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK (2012) Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim Biophys Acta* **1823**(1): 56-66
- Verhagen AM, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL (2007) Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* **14**(2): 348-357
- Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **277**(1): 445-454
- Vogtle FN, Prinz C, Kellermann J, Lottspeich F, Pfanner N, Meisinger C (2011) Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol Biol Cell* **22**(13): 2135-2143
- Vogtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* **139**(2): 428-439
- Wagner I, van Dyck L, Savel'ev AS, Neupert W, Langer T (1997) Autocatalytic processing of the ATP-dependent PIM1 protease: crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria. *EMBO J* **16**(24): 7317-7325
- Waltner M, Weiner H (1995) Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* **270**(44): 26311-26317
- Wang N, Gottesman S, Willingham MC, Gottesman MM, Maurizi MR (1993) A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11247-11251
- Wang N, Maurizi MR, Emmert-Buck L, Gottesman MM (1994) Synthesis, processing, and localization of human Lon protease. *J Biol Chem* **269**(46): 29308-29313
- Wawrzynow A, Wojtkowiak D, Marszalek J, Banecki B, Jonsen M, Graves B, Georgopoulos C, Zylicz M (1995) The ClpX heat-shock protein of Escherichia coli, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J* **14**(9): 1867-1877
- Waxman L, Goldberg AL (1985) Protease La, the lon gene product, cleaves specific fluorogenic peptides in an ATP-dependent reaction. *J Biol Chem* **260**(22): 12022-12028

Weber ER, Rooks RS, Shafer KS, Chase JW, Thorsness PE (1995) Mutations in the mitochondrial ATP synthase gamma subunit suppress a slow-growth phenotype of yme1 yeast lacking mitochondrial DNA. *Genetics* **140**(2): 435-442

Wickner S, Gottesman S, Skowyra D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12218-12222

Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, Langer T (2001) Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* **291**(5511): 2135-2138

Zhang XP, Sjoling S, Tanudji M, Somogyi L, Andreu D, Eriksson LE, Graslund A, Whelan J, Glaser E (2001) Mutagenesis and computer modelling approach to study determinants for recognition of signal peptides by the mitochondrial processing peptidase. *Plant J* **27**(5): 427-438

Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* **21**(17): 4411-4419