

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů



Josef Pelc

Export biomolekul z mitochondrií

Export of biomolecules from mitochondria

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za odborné konzultace a cenné rady při zpracování této práce. Zároveň bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za podporu.

Prohlášení

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

V Praze, 10. 5. 2016

.....

Abstrakt

Mitochondrie je buněčná organela, která vznikla z endosymbiotické bakterie. Díky svému původu si zachovala některé unikátní vlastnosti a metabolické dráhy. Mitochondrie nebo její redukované formy jsou přítomny s jedinou známou výjimkou ve všech eukaryotických organismech. Převážná část mitochondriální DNA byla přesunuta do jádra. Přesto však je mitochondrie schopná kódovat několik proteinů, které jsou součástí elektron-transportního řetězce a ATP syntázy. Tyto proteiny jsou z matrix mitochondrie transportovány do vnitřní mitochondriální membrány. Špatně složené proteiny vnitřní mitochondriální membrány jsou degradovány mitochondriálními proteázami a dochází k uvolňování peptidů. Matrix mitochondrie je místem vzniku Fe-S klastrů. Dosud neznámá molekula, která je produktem této dráhy, se dostává do cytosolu a účastní se skládání cytosolických a jaderných Fe-S proteinů. Další transportní dráha zajišťuje výměnu lipidů mezi endoplazmatickým retikulem a mitochondrií. Obě mitochondriální membrány mají různé lipidové složení. Pro udržení jejich vlastností je vyžadován transport lipidů mezi oběma mitochondriálními membránami. Tato dráha je využívána i pro syntézu specifických lipidů na vnitřní mitochondriální membráně.

Klíčová slova

Transportní dráha, elektron-transportní řetězec, Oxa1, ATP syntáza, *m*-AAA proteáza, *i*-AAA proteáza, Fe-S klastry, ISC, CIA, ERMES, MICOS, mitochondrie

Abstract

Mitochondrion is cellular organelle evolved from the endosymbiotic bacteria. Because of its bacterial origin mitochondrion has a number of unique properties and metabolic pathways. Mitochondria or its reduced forms are present in all eukaryotic organisms except a single exception. During the course of evolution most of mitochondrial DNA was transferred to the nucleus. Despite this, mitochondria still encode several proteins that are part of the electron transport chain and the ATP synthase. These proteins are transported from the mitochondrial matrix into the inner mitochondrial membrane. Misfolded proteins of the inner membrane are degraded by mitochondrial proteases, which leads to the release of generated peptides. Fe-S clusters are assembled in the mitochondrial matrix. Still unknown molecule, which is product of ISC pathway is transported into cytosol and participates in the assembly of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. Other transport pathway ensures the exchange of lipids between the endoplasmic reticulum and mitochondria. Both mitochondrial membranes have different lipid composition. To maintain their properties specific lipid transport is required between the two mitochondrial membranes. This transport pathway is also used for the lipid synthesis in the inner mitochondrial membrane.

Keywords

Transport pathway, electron transport chain, Oxa1, ATP synthase, *m*-AAA protease, *i*-AAA protease, Fe-S clusters, ISC, CIA, ERMES, MICOS, mitochondria

Seznam používaných zkratk

AAA	ATPases Associated with diverse cellular Activities	ATPázy spojené s různými buněčnými aktivitami
ABC transportéry	ATP-binding cassette transporters	transportéry s ATP-vážíací kazetou
CIA	cytosolic iron-sulfur cluster assembly	skládání Fe-S proteinů v cytosolu
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ERMES	endoplasmic reticulum -mitochondria encounter structure	endoplazmatické retikulum-mitochondrie kontaktní struktura
IMP	Inner membrane peptidase	peptidáza vnitřní mitochondriální membrány
ISC	iron-sulfur cluster	Fe-S klastr
MAM	mitochondria-associated membranes	membrána spojená s mitochondrií
MICOS	mitochondrial contact site	mitochondriální kontaktní místa
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NIF	nitrogen fixation	fixace dusíku
TIM	translocase of the inner membrane	transportní komplex vnitřní mitochondriální membrány
TOM	translocase of the outer membrane	transportní komplex vnější mitochondriální membrány

Obsah

1	Úvod	1
2	Transport proteinů z matrix mitochondrie do její vnitřní membrány.....	2
2.1	Oxa1	2
2.1.1	Inzerce proteinu Cox2	3
2.1.2	Skládání podjednotek ATP syntázy.....	5
2.2	Mdm38	7
2.3	Mba1	7
3	Export peptidů z mitochondrie	7
3.1	Yme1	9
3.2	Mdl1	10
4	Fe-S klastry uvnitř a vně mitochondrie	10
4.1	Tvorba Fe-S klastů v matrix mitochondrie	11
4.2	ISC exportní dráha.....	13
4.2.1	Atm1	13
4.2.2	Erv1.....	14
4.3	Skládání Fe-S proteinů v cytosolu	14
5	Transport a výměna lipidů v mitochondrii	16
5.1	Výměna fosfolipidů mezi ER a mitochondrií	16
5.1.1	Regulace komplexu ERMES.....	17
5.2	Výměna lipidů mezi mitochondriálními membránami.....	17
5.2.1	MICOS komplex	17
5.2.2	Proteiny Ups.....	18
5.2.2.1	Ups1	19
5.2.2.2	Ups2.....	19
6	Závěr	21
7	Seznam použité literatury.....	22

1 Úvod

Mitochondrie je buněčná organela téměř všech eukaryotických organismů, která vznikla přeměnou endosymbiotické bakterie. Během evoluce se většina původních mitochondriálních genů buď ztratila, nebo byla přesunuta do jádra. Ze svého původce si mitochondrie zachovaly mimo jiné i vlastní DNA a proteosyntetický aparát (Perlman et al., 1973). V mitochondrii se odehrávají nejdůležitější metabolické děje od syntézy ATP (adonesintrifosfátu), biogenezi Fe-S klastrů až po regulaci buněčné smrti. Mitochondrie se skládá ze dvou membrán s rozdílným složením a vlastnostmi. Celkově tak mitochondrie má čtyři subkompartmenty: vnější membránu, mezimembránový prostor, vnitřní membránu a matrix. Přes mitochondriální membrány dochází k neustálému transportu a výměně nejen metabolitů ale i větších látek - biomolekul.

Velká část mitochondriálních proteinů je kódována jadernými geny, které jsou translatovány v cytosolu a následně přeneseny do mitochondrie. Transportní dráhy těchto proteinů směrem dovnitř mitochondrie, včetně jejich transportních komplexů TIM (translokáza vnitřní membrány) a TOM (translokáza vnější membrány), jsou dnes poměrně dobře popsány. Mitochondrie sama však kóduje několik proteinů, převážně hydrofobního charakteru, jejichž translace probíhá na mitochondriálních ribozomech. Jedná se o proteiny, které jsou součástí komplexů umístěných na vnitřní mitochondriální membráně, kde jsou uplatněny v systému elektron-transportního řetězce a v komplexu tvořícím energii pro celou buňku - ATP syntázy.

Mitochondrie si zachovala od svého bakteriálního předka schopnost tvorby Fe-S klastrů. Dosud neznámá síru obsahující molekula, která je produktem této dráhy je využita v dalších procesech, zahrnující tvorbu cytosolických a jaderných Fe-S proteinů. Cytosolické Fe-S proteiny se účastní regulace železa v buňce, modifikace tRNA a dokonce ovlivňují i translaci. Další procesy probíhající v jádře, jako je replikace a oprava DNA, regulace délky telomer a segregace chromosomů, mají na starost jaderné Fe-S proteiny (Gari et al., 2012; Netz et al., 2012).

Mitochondrie se účastní dynamických procesů v buňce, je schopná se spojovat anebo dávat vznik novým mitochondriím dělením. Tyto události jsou spojené s chováním celé buňky, která je pečlivě reguluje. Mitochondriální dynamika závisí na obsahu proteinů a lipidů v mitochondriálních membránách. Většina lipidů je vyráběna v další buněčné organelle – endoplazmatickém retikulu. Proces výměny lipidů mezi těmito organelami vyžaduje souhru

mnoha proteinů umístěných nejen v mitochondriální membráně, ale také v membráně endoplazmatického retikula.

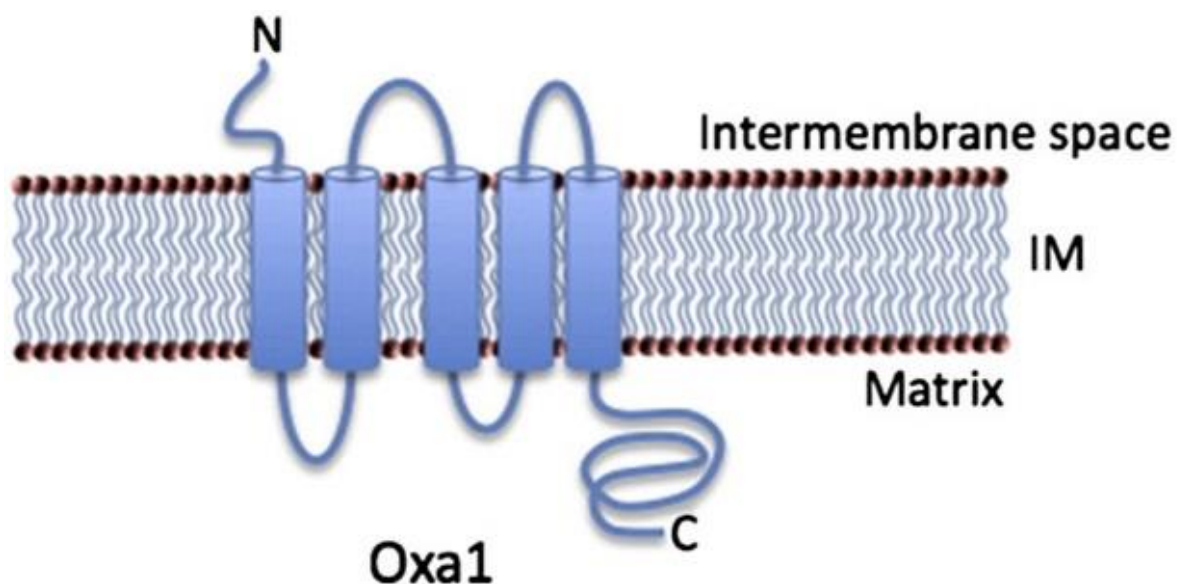
2 Transport proteinů z matrix mitochondrie do její vnitřní membrány

V případě modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae* existuje osm proteinů kódovaných mitochondriální DNA. Jedná se o proteiny, které jsou součástí elektron-transportního řetězce: Cox1, Cox2, Cox3 (podjednotky cytochrome *c* oxidázy), cytochrome *b* (součást *bc₁* komplexu) a dále podjednotky Fo-ATPázy: Atp6, Atp8 a Atp9. Posledním mitochondriálně kódovaným proteinem je Var1, podjednotka mitochondriálních ribozomů (Grivell et al., 1999; Herrmann et al., 1997; Tzagoloff and Myers, 1986).

2.1 Oxa1

Vkládání proteinů kódovaných mitochondriálním genomem do vnitřní mitochondriální membrány zajišťuje jaderně kódovaný protein Oxa1 (Bauer et al., 1994). Oxa1 je součástí proteinové rodiny, do které patří bakteriální inzertáza YidC nebo systém Alb3 v chloroplastech (Luirink et al., 2001). Tento protein obsahuje pět transmembránových segmentů, které jsou zásadní pro inzerční funkci Oxa1 (Jiang et al., 2003). Oxa1 je translatován v cytosolu jako prekurzor pOxa1 obsahující N-koncovou signální sekvenci, která jej nasměruje do matrix mitochondrie. Zde dochází k odštěpení N-koncové signální sekvence enzymem MPP (mitochondriální procesující peptidáza). Následně je všech pět transmembránových segmentů Oxa1 vloženo do vnitřní mitochondriální membrány za pomoci membránového potenciálu tak, že po vložení směřuje N-koncová doména do mezimembránového prostoru a C-koncová doména do matrix (Obr. 1). Tento proces vkládání pOxa1 je umožněn činností mitochondriálních Hsp70 (Herrmann et al., 1994). Kladně nabitá C-koncová doména zaujímající α -helikální strukturu je důležitá hlavně proto, že umožňuje navázání Oxa1 k velké podjednotce mitochondriálního ribozomu, a to v místě, kde nově nasyntetizované polypeptidové řetězce opouštějí ribozom (Jia et al., 2003; Kohler et al., 2009; Szyrach et al., 2003). Napojení Oxa1 na ribozomy má význam nejen v inzerci mitochondriálních proteinů do vnitřní mitochondriální membrány, ale také v procesu skládání celého komplexu cytochrom *c* oxidázy (Keil et al., 2012). Ukázalo se, že komplex Oxa1 tvoří ve vnitřní mitochondriální membráně strukturu póru hydrofilního charakteru, jehož aktivita závisí na přítomnosti příslušného substrátu a na membránovém potenciálu (Krüger et al., 2012). Oxa1 hraje důležitou roli i v transportu N-konců jaderně kódovaných proteinů

transportovaných do matrix mitochondrie skrze komplex TIM a také se účastní biogeneze proteinů, které směřují přímo do vnitřní membrány, jako je například ADP/ATP přenašečový protein Aac2 (Hell et al., 1998; Herrmann et al., 1997; Hildenbeutel et al., 2012). Způsob transportu mitochondriálně kódovaných proteinů je nejvíce zkoumán na proteinu Cox2.



Obrázek 1: Schéma topologie membránového proteinu *Oxa1*. *Oxa1* obsahuje pět transmembránových segmentů zakotvených ve vnitřní membráně (IM). Tento znak je sdílen všemi členy proteinové rodiny inzertáz *YidC/Alb3/Oxa1*. Záporně nabitý N-konec je exponovaný do mezimembránového prostoru. Kladně nabitý C-konec směřuje do matrix mitochondrie, kde se váže k ribozomální podjednotce. Převzato a upraveno od (Wang and Dalbey, 2011).

2.1.1 Inzerce proteinu Cox2

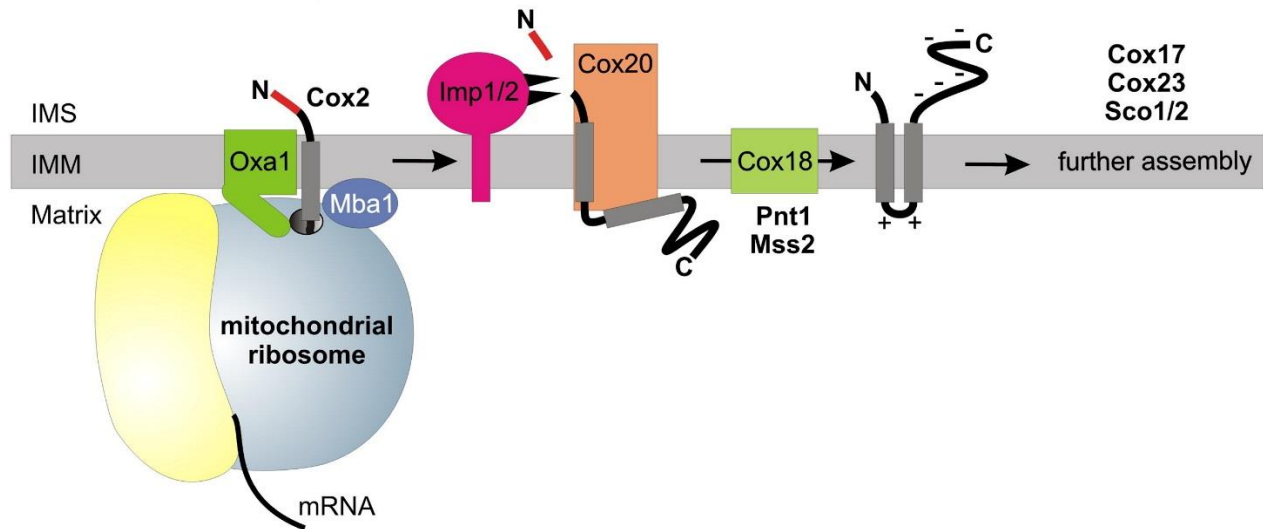
Cytochrome *c* oxidáza neboli komplex IV je součástí dýchacího řetězce, systému ležícím na vnitřní mitochondriální membráně, který slouží k přenášení elektronů a vytváření protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně, čehož je následně využito v procesu ATP syntézy. Jedna z jedenácti podjednotek komplexu cytochrome *c* oxidázy je protein Cox2 (Taanman and Capaldi, 1992). Cox2 obsahuje dva transmembránové segmenty. K tomu, aby protein Cox2 zaujal správnou pozici a tvar je zapotřebí spolupráce několika dalších jaderně kódovaných proteinů, které řídí topogenezi Cox2 od jeho translace až po orientaci jeho koncových částí (Obr. 2).

Mitochondriální translace Cox2 je závislá na produkci jaderně kódovaného proteinu Pet111 (Poutre and Fox, 1987). Tento kladně nabitý protein se nachází na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány, kde slouží jako specifický translační aktivátor mRNA. Protein interaguje s 5'-nepřekládaným koncem COX2 mRNA. Aktivita Pet111 navíc ovlivňuje míru exprese Cox2 (Green-Willms et al., 2001).

Velká podjednotka mitochondriálního ribozomu asociuje s proteinem Oxa1 a dalším proteinem vnitřní mitochondriální membrány Mba1, které spolu váží ribozom, což umožňuje spojit procesy translace a inserce proteinu do vnitřní mitochondriální membrány (Ott et al., 2006; Preuss et al., 2001). Nově syntetizovaný Cox2 vlastní N-koncovou signální sekvenci. Ta je ko-translačně vkládána pomocí Oxa1 do vnitřní mitochondriální membrány, prochází skrze ni a vyčnívá do mezimembránového prostoru (He and Fox, 1997). Následně je tato část patnácti aminokyselin odštěpena komplexem IMP (peptidáza vnitřní mitochondriální membrány) zahrnující enzymy Imp1, Imp2 a Som1 (Jan et al., 2000; Pratje et al., 1983). Tato post-translační úprava může proběhnout díky přítomnosti dalšího proteinu vnitřní mitochondriální membrány označovaného jako Cox20. Cox20 interaguje s prekurzorem proteinu Cox2 vloženým do vnitřní mitochondriální membrány a zpřístupní jej komplexu IMP (Hell et al., 2000). Cox20 navíc stabilizuje a chrání nesložený Cox2 před degradací proteázami a podílí se na translokaci jeho C-konce (Elliott et al., 2012).

Transport C-konce Cox2 probíhá post-translačně poté, co je pomocí Oxa1 vložen N-konec. Jeho vložení zajišťuje protein Cox18 (zástupnou funkci má v organismu *Neurospora crassa* protein Oxa2 (Funes et al., 2004)). Tento protein se podobá proteinu Oxa1, nachází se také ve vnitřní mitochondriální membráně a obsahuje čtyři transmembránové segmenty. Postrádá však C-koncovou doménu, která má v případě Oxa1 ribozom-vázající funkci (Souza et al., 2000). Spolu s Cox18 se přenosu C-konce účastní i protein umístěný na okraji vnitřní membrány Mss2, který je schopen rozpoznat C-konec Cox2 v matrix a upravuje jeho strukturu tak, aby bylo možné jej přenést do mezimembránového prostoru (Broadley et al., 2001). Celý proces usnadňuje Pnt1, který však není pro samotnou translokaci nezbytný. Na rozdíl od přenosu N-konce, zde hraje významnou roli membránový potenciál (He and Fox, 1997). Po přenesení obou konců Cox2 do mezimembránového prostoru dochází ještě k navázání dvou měďnatých iontů do vazebného místa Cu_A uvnitř Cox2. Cu²⁺ ionty jsou přeneseny z cytoplazmy pomocí proteinů Cox17, Cox23

a Sco1/2 (Barros et al., 2004; Horng et al., 2004; Moira Glerum et al., 1996). Takto upravený Cox2 je schopen vázat se na další podjednotky cytochrom *c* oxidázy a tvořit funkční enzym.



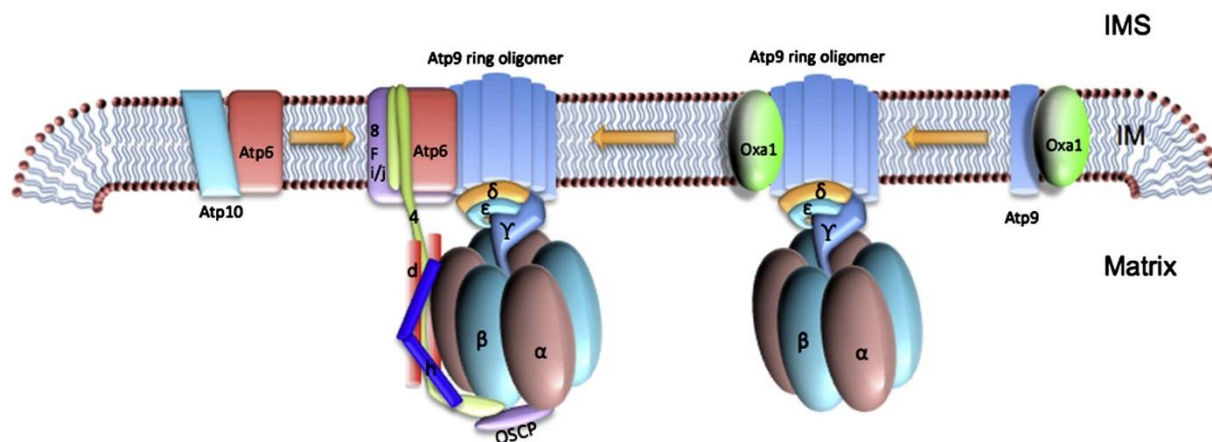
Obrázek 2: Schéma inzerce a složení proteinu Cox2 ve vnitřní mitochondriální membráně. N-koncová presekvence nově translatovaného Cox2 je přenesena pomocí Oxa1 do mezimembránového prostoru. Dojde k odštěpení presekvence za spoluúčasti Cox20 a peptidázy Imp1/2. Záporně nabitý C-konec je transportován skrze vnitřní membránu proteinem Cox18 a pomocných proteinů Pnt1 a Mss2. Následuje složení proteinu do maturované podoby, která se účastní skládání celého cytochromu *c*. Převzato a upraveno od (Ott and Herrmann, 2010).

2.1.2 Skládání podjednotek ATP syntázy

ATP syntáza (též označována jako komplex V elektron-transportního řetězce) je komplex proteinů tvořící z ADP a P_i makroergní molekuly ATP. ATP syntáza se nachází ve vnitřní membráně mitochondrie, v bakteriální cytoplazmatické membráně a je přítomna i ve vnitřní membráně chloroplastu. Komplex je rozdělen na dvě části F_1 a F_0 . F_0 část je zanořena ve vnitřní mitochondriální membráně a sloužící jako „rotor“, kterým pohybují H^+ ionty procházející membránou po směru gradientu z mezimembránového prostoru do matrix mitochondrie. Druhá část F_1 („stator“) se nachází vně membrány uvnitř matrix a je místem samotné syntézy ATP.

Komplex ATP syntázy se skládá ze 17 různých proteinových podjednotek. Zatímco součástí F_1 jsou pouze jaderně kódované proteinové podjednotky, F_0 obsahuje proteiny kódované

oběma genomy, jaderným i mitochondriálním. F_0 část ATP syntázy kvasinek se skládá celkem z šesti podjednotek, z nichž tři jsou kódovány mitochondriální DNA. Jedná se o proteinové podjednotky Atp9, Atp6 a Atp8 (Nagley, 1988). Exprese genů ATP6 a ATP8 je závislá na přítomnosti α a β podjednotky F_1 části, zatímco translace proteinu Atp9 vyžaduje pro stabilizaci své mRNA protein vnitřní mitochondriální membrány protein Atp25 (Rak and Tzagoloff, 2009; Zeng et al., 2008). Atp9 obsahuje dva transmembránové segmenty s N- i C- koncem směřujícím do mezimembránového prostoru. Atp9 tvoří uvnitř vnitřní mitochondriální membrány oligomerní prsteneček složený z deseti až dvanácti podjednotek, zde se opět uplatňuje protein Atp25. Nově vzniklý oligomer Atp9 se spojuje nejprve s F_1 částí ATP syntázy. Dále se komplex F_1 -Atp9 upraví přidáním proteinové podjednotky Atp8. Na závěr se připojí podjednotka Atp6, jejíž správné složení do komplexu zajišťuje vnitřní membránový protein Atp10 (Tzagoloff et al., 2004). Opět zde hraje významnou roli protein Oxa1, který interaguje post-translačně s nově syntetizovaným Atp9, zajišťuje jeho navázání k F_1 části a v poslední řadě umožňuje interakci Atp6 s Atp9 prstencem (Obr. 3). Oxa1 tak v tomto případě působí jako chaperon, který provází podjednotky F_0 ATP syntázy a umožňuje její sestavení (Jia et al., 2007).



Obrázek 3: Komplex ATP syntázy – zobrazení podjednotek a proces jejich skládání. Oxa1 asociuje s proteinem Atp9. Dojde k oligomerizaci Atp9 do struktury tvořící prsteneček. Poté se připojí podjednotka Atp6 doprovázená proteinem Atp10. Převzato od (Wang and Dalbey, 2011)

2.2 Mdm38

Protein Mdm38 se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a jeho část vyčnívá do matrix. Podílí se na vkládání mitochondriálně kódovaných proteinů, které nejsou transportovány do vnitřní membrány pomocí Oxa1. Podobně však jako Oxa1 i Mdm38 je schopen vázat se na mitochondriální ribozomy, konkrétně na protein velké ribozomální podjednotky Mrp49. Toto spojení usnadňuje následnou inzerci nově nasyntetizovaných proteinů. Přesný princip vkládání proteinů přes Mdm38 není zcela objasněn, zatím jsou známy jeho dva substráty, mitochondriálně kódované proteiny, Atp6 a cytochrom *b*. Doposud neznámou roli v této transportní cestě hraje i protein Ylh47, který je homologní k Mdm38. Oba proteiny jsou paralogy lidského proteinu Letm1, jež způsobuje Wolf-Hirschhornův syndrom (Frazier et al., 2006; Nowikovsky et al., 2004).

2.3 Mba1

Třetím proteinem schopným vázat se na mitochondriální ribozomy a účastnit se tak transportu proteinů je Mba1. Tento protein vnitřní mitochondriální membrány směřuje do matrix mitochondrie, kde se spojuje s C-koncem proteinu Oxa1 a s velkou podjednotkou mitochondriálního ribozomu (Bauerschmitt et al., 2010; Ott et al., 2006). Toto spojení translačního aparátu a transportního proteinu minimalizuje prostor, ve kterém jsou hydrofobní mitochondriálně kódované proteiny vystaveny prostředí matrix mitochondrie. Bylo zjištěno, že společným transportovaným substrátem pro Mba1 a Oxa1 jsou Cox1, Cox2, Cox3 a cytochrom *b*. Podobně jako Oxa1 i Mba1 se účastní transportu jaderně kódovaných proteinů (Preuss et al., 2001). Mba1 tvoří komplex s Mdm38, který pravděpodobně usnadňuje navázání mRNA-specifických translačních aktivátorů na ribozomy (Bauerschmitt et al., 2010).

3 Export peptidů z mitochondrie

Jako všechny proteiny, i ty mitochondriální mají omezenou životnost. Degradaci proteinů vnitřní mitochondriální membrány zajišťují proteiny z rodiny AAA-proteáz. „AAA“ označuje ATPázy spojené s různou buněčnou aktivitou, jedná se tedy o enzymy, které dokáží za spotřeby ATP recyklovat špatně složené proteiny nebo proteiny určené k degradaci (Confalonieri and Duguet, 1995). Proteázy se nacházejí i v mitochondrii, ačkoli převážná většina těchto enzymů plní funkci v cytosolu.

Poškozené nebo špatně složené proteiny jsou degradovány ATP hydrolyzujícími peptidázami, jako prevence před poškozením mitochondrie. Hromadění nesložených proteinů nastává v případě špatné souhry jaderné a mitochondriální genové exprese nebo při mitochondriálním oxidativním stresu. AAA doména proteáz obsahuje ATP vazebné motivy označené jako Walker motif A a B (Beyer, 1997). Pro svou funkci vyžadují nejenom ATP, ale také přítomnost dvojmocných iontů kovu, převážně Zn^{2+} (Rawlings and Barrett, 1995). Ve vnitřní mitochondriální membráně byly zaznamenány dva takovéto proteolytické komplexy: *m*-AAA proteáza (katalytické místo vystavené směrem do matrix) a *i*-AAA proteáza (katalytické místo vystavené směrem do mezimembránového prostoru). *m*-AAA proteáza je hetero-oligomerní komplex uvnitř vnitřní mitochondriální membrány tvořený stejným počtem podjednotek ATP-dependentních metalopeptidáz Yta10 (Afg3p) a Yta12 (Rca1p). Vlastní složení komplexu vyžaduje přítomnost ATP (Arlt et al., 1996). Druhý komplex *i*-AAA je tvořen ATP-dependentní metalopeptidázou Yme1 (Yta11), homologní k Yta10 a Yta12. Složení homo-oligomerního komplexu *i*-AAA nevyžaduje na rozdíl od *m*-AAA proteázy přítomnost nukleotidů. Oba typy proteáz kontrolují kvalitu proteinů kódovaných v matrix mitochondrie. Substrátem pro *i*-AAA je Cox2, zatímco zbylé mitochondriální proteiny zúčastněné v elektron-transportním řetězci a v F_1F_0 ATP syntáze (Cox1, Cox3, cytochrom *b*, Atp6, Atp8 a Atp9) jsou substrátem pro *m*-AAA proteázu (Langer, 2000; Nakai et al., 1995; Weber et al., 1996). Kromě proteolytické aktivity *m*-AAA proteáza ovlivňuje i proces sestřihu transkriptů mitochondriálních genů a vykazuje chaperonovou aktivitu v post-translačním skládání komplexu elektron-transportního řetězce a ATP syntázy (Arlt et al., 1996; Arlt et al., 1998). Homologem k těmto kvasinkovým mitochondriálním proteázám je lidský mitochondriální protein paraplegin, jehož mutace zapříčiňují dědičnou spastickou paraplegii (Casari et al., 1998).

AAA-proteázy dokáží štěpit proteiny až na samotné volné aminokyseliny, přesto však zůstává asi třetina produktů proteolýzy ve formě peptidových řetězců dlouhých až 20 aminokyselin (Young et al., 2001). Další zpracování těchto oligopeptidů na jednotlivé aminokyseliny zajišťuje dvojice proteinů mezimembránového prostoru oligopeptidáza Cym1 (Mop112) a endopeptidáza Prd1 (též označovaný jako saccharolyzin). Tyto enzymy štěpí produkty *i*-AAA proteázy i peptidy získané předchozím štěpením v matrix mitochondrie. Jejich substrátem jsou také peptidy získané po odštěpení presekvence z jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů (Kambacheld et al., 2005). Peptidy o délce 6-20 aminokyselin se

z mitochondrie dostávají dvojím způsobem. Produkty proteolytického procesu *m*-AAA proteázy jsou z matrix mitochondrie aktivně transportovány ABC proteinem Mdl1. *i*-AAA proteáza štěpí peptidy přímo do prostředí mezimembránového prostoru. Přes vnější membránu se peptidy v obou případech dostávají skrz poriny (Por1 a Por2) nebo využívají translokázy vnější mitochondriální membrány (TOM) (Young et al., 2001). Procesy proteolýzy proteinů a uvolňování peptidů z mitochondrie jsou na sobě nezávislé. Uvolňování peptidů z degradovaných proteinů, převážně z matrix a vnitřní mitochondriální membrány, probíhá neustále (Augustin et al., 2005). Experimenty s buňkami, které neobsahovaly funkční protein Yme1, ukázaly sníženou funkčnost komplexů elektron-transportního řetězce a F₁F₀ ATP syntázy. V souvislosti s tím byla naznačena možnost, že by uvolňované peptidy z degradovaných mitochondriálních proteinů, mohly mít vně organely signální funkci a podílet se na obnovení funkčnosti těchto poškozených systémů (Arnold et al., 2006).

3.1 Yme1

Yme1 je protein vnitřní mitochondriální membrány, kterou prochází pouze jednou. N-konec tohoto proteinu je směřován do matrix, zatímco C-koncová část je exponovaná do mezimembránového prostoru (Leonhard et al., 1996). C-koncová část proteinu nese dvě místa důležitá pro funkci Yme1: (i) AAA doménu s chaperonovou aktivitou, která váže nesložené proteiny a (ii) vlastní proteolytickou doménu. Po hydrolýze ATP se změní konformace těchto domén, uvolní se substráty asociované s AAA-doménou a dojde k navázání do proteolytického místa následovanou samotnou degradací proteinů (Leonhard et al., 1999). Yme1 se však neúčastní pouze proteolytických procesů, podílí se na skládání podjednotek respiračního řetězce (Cox2) a je zapojen i do skládání proteinů v mezimembránovém prostoru. Bylo zjištěno, že skládání proteinu Ups2 v mezimembránovém prostoru je ovlivněno přítomností Yme1 (Schreiner et al., 2012). Ups2 je protein účastnící se metabolismu fosfolipidů v mitochondrii, které jsou zásadní pro stavbu membrán. Důsledkem toho jsou pozorovány změny v morfologii mitochondrie v buňkách postrádajících funkční Yme1 (Campbell and Thorsness, 1998). Předpokládá se, že Yme1 může hrát roli i v translokaci proteinů z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru. (Rainey et al., 2006). Jednalo by se tak o transportní systém nepodobný těm dosud známým.

3.2 Mdl1

Mdl1 se řadí mezi ATP binding cassette (ABC) transportéry, také označované jako ABC pumpy. Tato třída transmembránových proteinů je schopná aktivně přenášet látky přes membránu za spotřeby ATP. ABC transportéry obsahují dvě membránové domény a dvě domény vážící nukleotidy. Zatímco membránové domény jsou určeny k vytvoření póru, který slouží k přenosu substrátů, nukleotid vážící domény jsou schopné rozpoznat, navázat a hydrolyzovat zdroj energie ATP.

Protože má Mdl1 pouze jednu membránovou doménu a jednu nukleotid vazebnou doménu je označován jako „poloviční ABC protein“. Mdl1 sdílí podobnosti s dalšími členy rodiny ABC transportérů, lidskými proteiny Tap1 a Tap2, které transportují peptidy z cytoplasmy do endoplazmatického retikula (Dean et al., 1994). Mdl1 je protein vnitřní mitochondriální membrány, ve které se vyskytuje ve dvou stavech. Monomer proteinu Mdl1 se váže na membránovou část složeného komplexu F_1F_0 -ATP syntázy, v této fázi je Mdl1 neaktivní. Po oddělení od komplexu ATP syntázy dojde k oligomerizaci za přítomnosti ATP a vznikne aktivní homodimerní forma proteinu. Toto schéma naznačuje významné spojení exportu peptidů z matrix mitochondrie s komplexem produkujícím zdroj energie ATP syntázou (Galluhn and Langer, 2004). Dále se předpokládá možná role proteinu Mdl1 v regulaci buněčné resistance na oxidativní stres (Chloupková et al., 2003).

4 Fe-S klastry uvnitř a vně mitochondrie

Fe-S proteiny jsou charakterizovány obsahem komplexů železa a anorganické síry. Kofaktory těchto proteinů jsou Fe-S klastry vyskytující se ve více strukturních podobách, nejčastěji jako $[2Fe-2S]$ a $[4Fe-4S]$. Nejdůležitější vlastností těchto klastrů je rozsáhlý redukční potenciál v rozmezí od -700 mV do +400 mV. Toho je využito v mnoha systémech, kde dochází k přenosu elektronů. V chloroplastech jsou například přítomny ve fotosystému I (protein ferredoxin) (Wollman et al., 1999). V mitochondriálním elektron-transportním řetězci se nachází až dvanáct různých Fe-S klastrů (Schultz and Chan, 2001). Fe-S klastry jsou dále zapojeny do vázání substrátu a aktivaci dehydrogenáz a jsou využívány jako takzvané „molekulární přepínače“ pro genovou regulaci na úrovni translace i transkripce (Narahari et al., 2000). Fe-S klastry jsou využívány také jako regulační senzory při odpovědi na oxidativní stres a vnitrobuněčnou hladinu železa díky své citlivosti na molekuly H_2O_2 , NO a O^{2-} (Kiley and

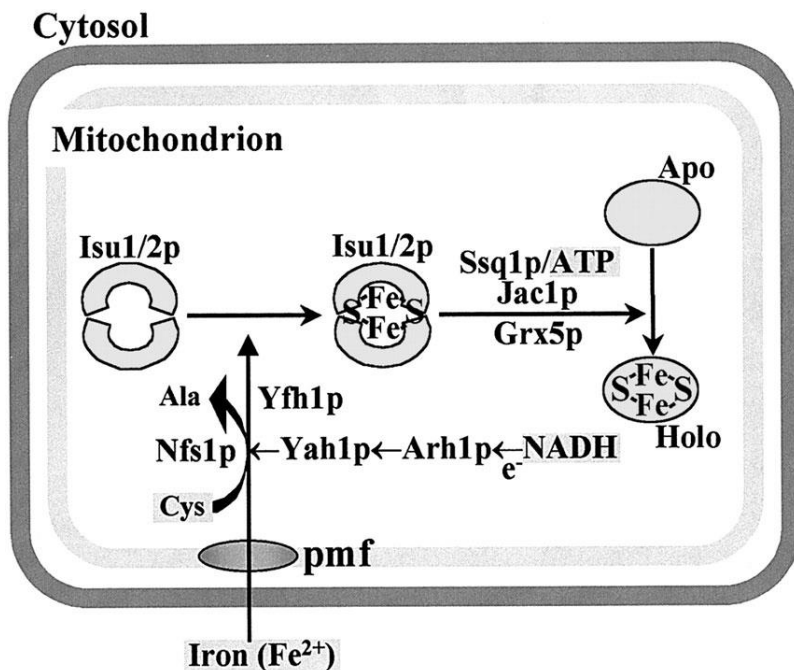
Beinert, 2003). Pro kvasinky je dokonce tvorba Fe-S proteinů jedinou známou esenciální mitochondriální funkcí. Proces skládání a dozrávání Fe-S proteinů neprobíhá samovolně, ale vyžaduje přítomnost dalších proteinů (Schilke et al., 1999). Dosud byly identifikovány tři různé systémy schopné tvořit Fe-S proteiny. Prvním systémem je NIF (nitrogen fixation) dráha skládající Fe-S protein nitrogenázu, která má významnou funkci v bakteriích schopných fixovat dusíku. Druhá dráha se účastní tvorby většiny Fe-S proteinů v buňce a je označována jako ISC (iron-sulfur cluster) (Zheng et al., 1998). Tuto dráhu tvoří dohromady asi deset proteinů. Poslední systém tvořící Fe-S klastry se nazývá SUF (sulfur-utilization factor), ten je aktivní v buňkách postrádajících ISC systém, kdy je buňka sužována oxidativním stresem (Takahashi and Tokumoto, 2002). Mitochondriální systém skládání Fe-S klastrů odpovídá bakteriální dráze ISC (Schilke et al., 1999). ISC dráhu eukaryotických organismů tvoří celkem sedmnáct známých proteinů, které jsou kódovány v jádře. K tomu, aby se v mitochondrii mohly začít tvořit Fe-S klastry, respektive Fe-S proteiny, je nutné transportovat Fe^{2+} ionty z cytosolu do matrix mitochondrie. Tento transport pohání protonmotivní síla a je usnadněn přenašeči vnitřní mitochondriální membrány Mrs3 a Mrs4 (Mühlenhoff et al., 2003a).

4.1 Tvorba Fe-S klastrů v matrix mitochondrie

Biogeneze Fe-S proteinů začíná procesem desulfurace cysteinu komplexem Nfs1-Isd11 (Obr. 4) (Adam et al., 2006; Kispal et al., 1999). Z cysteinu se uvolňuje síra a vzniká alanin. Aby síra byla schopná vázat ionty železa, musí se redukovat ze stavu S^0 na S^{2-} . Elektrony potřebné k této redukci jsou dodány z elektron-transportního řetězce tvořeného NADH, proteinem Arh1 (ferredoxin reduktáza) a proteinem Yah1 (ferredoxin mitochondriální matrix) (Barros and Nobrega, 1999; Manzella et al., 1998). Fe^{2+} a S^{2-} se spolu váží na proteinový komplex Isu1/Isu2, které slouží jako lešení pro nové [2Fe- 2S] klastry (Garland et al., 1999; Gerber et al., 2003). Železné ionty se na Isu1 naváží díky přímé interakci s proteinem Yfh1 (Gerber et al., 2003). Yfh1 je schopen na sebe vázat ionty železa, potřebné nejen pro syntézu Fe-S proteinů, ale také pro syntézu hemu. Pokud nejsou Fe^{2+} použity v některé z drah, dochází k jejich oxidaci a uskladnění v rozpustné formě uvnitř proteinu (Park et al., 2003). Lidským ortologem Yfh1 je frataxin, jehož porucha způsobuje dědičné neurodegenerativní onemocnění nazývané Friedreichova ataxie (Campuzano et al., 1996).

Fe-S klastr je poté přenesen z komplexu Isu1/2 a navázán na apoprotein pomocí chaperonů. Prvním z nich je chaperon patřící do rodiny Hsp70 - Ssq1, tento protein vlastní N-koncovou

ATPázovou doménu a C-koncovou doménu umožňující vazbu substrátů. Ssq1 spolupracuje s nukleotid výměnným faktorem Mge1, který uvolňuje ADP poté, co chaperon pro svou vazebnou aktivitu hydrolyzuje ATP (Schmidt et al., 2001). ATPázová aktivita Ssq1 je však poměrně slabá, z tohoto důvodu se zapojuje další chaperon Jac1. Chaperon Jac1 z rodiny Hsp40 (DnaJ) je specializovaný J-protein, obsahující konzervovanou J-doménu pomocí níž se váže k Ssq1 a reguluje jeho aktivitu (Kim et al., 2001). Kromě skládání a dozrávání proteinů obsahující Fe-S klastry, se Ssq1 podílí na dozrávání proteinu Yfh1. Transportní roli v přenosu Fe-S klastrů z Isu1 na apoproteiny má mitochondriální monothiol glutaredoxin Grx5 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002). Grx5 je schopen vázat [2Fe-2S] klastry a zároveň tvořit komplex s chaperonem Ssq1. Tyto vazebné interakce umožňují přesunutí Fe-S klastru z Isu1, přes Grx5 až k cílovému apoproteinu. Tak se Grx5 zapojuje v dozrávání [2Fe-2S] a [4Fe-4S] proteinů (Uzarska et al., 2013). Dále se apoproteiny s Fe-S klastry mohou složit do proteinů přítomných v komplexech mitochondriálního řetězce. Spojení Fe-S klastrů a podjednotek komplexu I vnitřní mitochondriální membrány zajišťuje u kvasinky *Yarrowia lipolytica* mitochondriální NTPáza Ind1 (Bych et al., 2008). Další složkou ISC dráhy je komplex proteinů Isa1 a Isa2 účastníci se skládání [4Fe-4S] klastrů, které jsou vkládány do apoproteinů pomocí Iba57 (Mühlenhoff et al., 2011). Takto vzniká holoakonitáza a proteiny potřebné pro syntézu biotinu a kyseliny lipové (Gelling et al., 2008).



Obrázek 4: Proces biogeneze Fe-S klastrů v mitochondrii. Komplex proteinů *Isu1/2* slouží jako lešení pro skládání Fe-S klastrů. *Nfs1* poskytuje S^0 skrze proces desulfurace cysteinu. Transport elektronů zajišťuje dvojice proteinů *Arh1*, *Yah1*. Interakcí železo-vazebného proteinu *Yfh1* s *Isu1/Nfs1*, dojde k samotnému vzniku Fe-S klastrů. Ty jsou za pomoci dalších proteinů přeneseny z *Isu1* do apoproteinů. Převzato od (Mühlenhoff et al., 2003b)

4.2 ISC exportní dráha

Skládání cytosolických a jaderných Fe-S proteinů v buňce zprostředkovává tzv. CIA (cytosolic iron-sulfur cluster assembly) dráha, jež závisí na fungování mitochondriální ISC dráhy a následného exportu.

4.2.1 Atm1

Hlavní složku ISC exportního systému tvoří protein vnitřní mitochondriální membrány *Atm1*. Tento protein patří do rodiny ABC transportérů. Tvoří dimerní strukturu a obsahuje dvanáct transmembránových segmentů a dvě nukleotid-vážíci domény exponované do matrix. Delece *Atm1* má za následek poškození cytochromů, nahromadění volného železa v mitochondrii a zvýšenou hladinu disulfidu glutathionu, a tím způsobený oxidativní stres (Kispal et al., 1999; Leighton and Schatz, 1995). Ačkoli je exportní funkce *Atm1* ve skládání extramitochondriálních Fe-S proteinů známá již delší dobu, stále se nepodařilo určit přesné složení jeho substrátu (Kispal et al., 1999). Bylo ověřeno, že se pomocí *Atm1* exportuje z matrix mitochondrie molekula

obsahující síru (X-S). Nedávná studie prokázala, že danými substráty Atm1 transportéru by mohly být dimer glutathionu (GSSG) a glutathion trisulfid (GS-S⁰-SG), polysulfidy obsahující molekuly nutné pro skladbu Fe-S klastrů (Schaedler et al., 2014). Mutace v lidském homologu tohoto transportéru označeného ABCB7 způsobuje X-vázanou sideroblastickou anémií a mozečkovou ataxii (Allikmets et al., 1999).

4.2.2 Erv1

Druhou složkou ISC exportního systému je protein mezimembránového prostoru Erv1, jehož C-koncová doména vykazuje sulfhydryl oxidázovou aktivitu (Lange et al., 2001; Lee et al., 2000). Erv1 udržuje importní protein mezimembránového prostoru Mia40 v oxidovaném stavu, a tím katalyzuje tvorbu disulfidických můstků, které jsou důležité při interakcích Mia40 s jeho substráty (Mesecke et al., 2005). Erv1 je esenciální pro tvorbu Fe-S proteinů v cytosolu, avšak jeho role jako sulfhydryl oxidázy nebyla v tomto procesu dosud potvrzena.

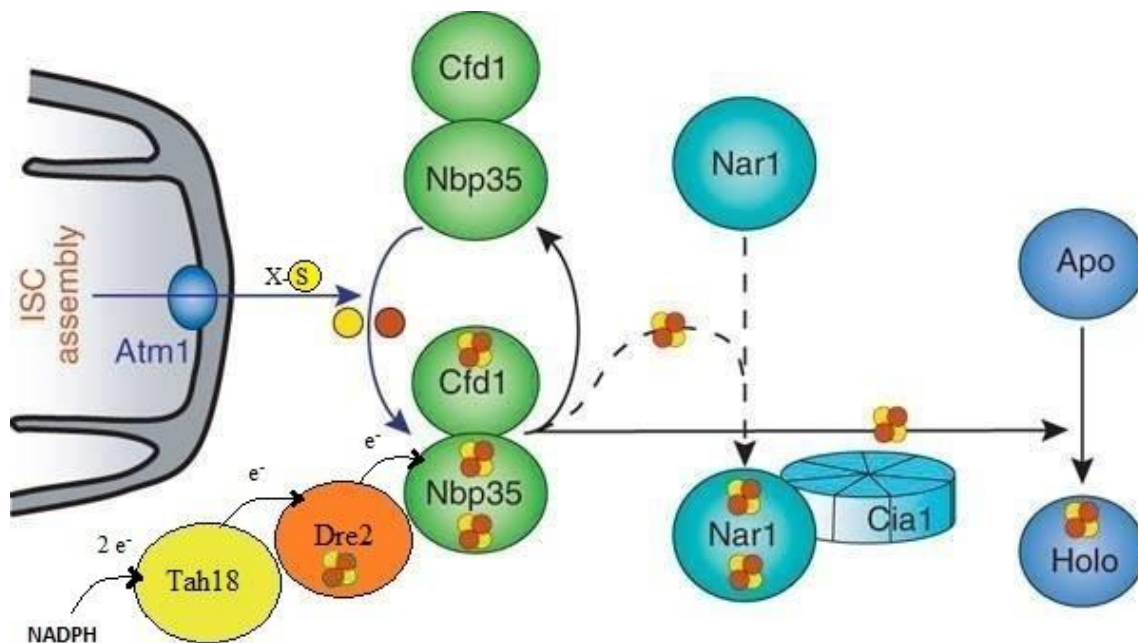
V poslední řadě se v uvolňování X-S molekuly z matrix uplatňuje tripeptid glutathion (GSH), který se váže do kladně nabitého místa uvnitř Atm1 a tam plní dosud neznámou funkci v procesu biogeneze jaderných a cytosolických Fe-S proteinů (Sipos et al., 2002; Srinivasan et al., 2007).

4.3 Skládání Fe-S proteinů v cytosolu

CIA dráha je principiálně podobná té mitochondriální (bakteriální) (Obr. 5). Na rozdíl od ISC dráhy nemá CIA dráha vlastní zdroj S⁰ případně S². Proto skládání Fe-S proteinů v cytosolu vyžaduje funkční ISC dráhu a ISC exportní dráhu.

NTPáza Cfd1 tvoří heterotetramerní komplex s další NTPázou Nbp35, který slouží jako lešení pro skládání [4Fe-4S] klastrů. Komplex je schopen navázat až tři takovéto molekuly. Skládání Fe-S klastrů na komplexu Cfd1-Nbp35 vyžaduje funkční mitochondriální proteiny Nfs1 a Atm1, jejichž produkt, molekula X-S, je pro CIA dráhu zásadní (Netz et al., 2007). Stejně jako v ISC dráze i zde je potřeba zdroj elektronů. Prvotním zdrojem dvou elektronů je NADPH. Elektrony jsou přeneseny NADPH-dependentní diflavin reduktázou Tah18, obsahující dva kofaktory FAD (flavinadenindinukleotid) a FMN (flavinmononukleotid), na Fe-S klastry proteinu Dre2 (Netz et al., 2010). Dre2 obsahuje jak [2Fe-2S] tak [4Fe-4S], avšak jsou pevně vázané na Dre2 a jako takové nejsou transportovány do apoproteinů (Netz et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Elektrony jsou pravděpodobně využity v redukcí síry v molekule X-S na S²⁻, podobně jako je tomu v případě ISC.



Obrázek 5: CIA dráha (skládání cytosolických a jaderných Fe-S klastrů. Fe-S klastry jsou skládány na komplexu Cfd1-Nbp35. Odtud jsou přesouvány pomocí Nar1 a Cia1 do apoproteinů. K tvorbě Fe-S klastrů jsou potřeba elektrony, které dodává elektron-transportní řetězec složený z proteinů Tah18 a Dre2. Převzato a upraveno od (Netz et al., 2007).

Přenesení volně navázaného Fe-S klastru z komplexu Cfd1-Nbp35 do cílového apoproteinu provádí dvojice proteinu Nar1 a Cia1. C-koncová doména Nar1 vykazuje sekvenční podobnost s [Fe]-hydrogenázami bakterií a archaeí (Horner et al., 2002). Avšak tato enzymatická funkce se u většiny eukaryot nevyskytuje. N-konec proteinu Nar1 nese doménu podobnou feredoxinu (ferredoxin-like domain), která je schopná vázat dva Fe-S klastry. Nar1 je vyžadován pro dozrávání cytosolických a jaderných Fe-S proteinů, navíc se uplatňuje i ve svém vlastním dozrávání (Balk et al., 2004). Cia1 je posledním známým proteinem CIA dráhy. Jedná se o protein, ve kterém se opakuje tzv. WD40 motiv. Cia1 interaguje s Nar1, avšak netvoří s ním stabilní komplex. Podílí se na přenosu Fe-S klastrů pouze do proteinů, které nejsou součástí CIA dráhy. Cia1 se například podílí na vkládání Fe-S klastrů do proteinu Rli1, který se účastní

biogeneze ribozomů. Z tohoto důvodu dochází v buňkách zbavených Cia1 k hromadění ribozomálních podjednotek v jádře (Balk et al., 2005).

5 Transport a výměna lipidů v mitochondrii

Mitochondrie jsou dynamické organely. Neustále mění svůj tvar a strukturu. To umožňuje rozvést produkty mitochondriálního metabolismu po celé buňce. Tuto tvarovou nestálost má na svědomí lipidové a proteinové složení mitochondriálních membrán. Vnější a vnitřní mitochondriální membrány se od sebe odlišují nejen svým složením ale i vlastnostmi (Sperka-Gottlieb et al., 1988). Pro správnou funkci mitochondrie je nutné udržování všech složek jejích membrán v přesném poměru. Nejhojněji jsou v mitochondriálních membránách zastoupeny fosfolipidy, které jsou stejně jako převážná většina lipidů v buňce syntetizovány v endoplazmatickém retikulu (ER) a posléze transportovány do mitochondrie. Avšak některé z fosfolipidů je mitochondrie schopna sama tvořit z prekursorů, dodaných taktéž z ER.

5.1 Výměna fosfolipidů mezi ER a mitochondrii

Část membrány ER označovaná jako mitochondria-associated membrane (MAM), je místo, kde dochází ke kontaktu membrány ER a vnější mitochondriální membrány (Achleitner et al., 1999). Zde se také nachází nejvyšší koncentrace enzymů podílejících se na syntéze fosfolipidů. Samotné fyzické přiblížení obou organel zajišťuje soubor proteinů tvořících ER-mitochondria encounter structure (ERMES). Tento komplex obsahuje čtyři proteiny obou organel: Mdm34 a Mdm10 (integrální proteiny vnější mitochondriální membrán); Mmm1 (membrána ER) a Mdm12 (cytosolický protein) (Kornmann et al., 2009). ERMES hraje roli nejen ve výměně fosfolipidů, ale podílí se také na importu proteinů do mitochondrie (SAM komplex) a pravděpodobně také na regulaci replikace mtDNA. Proteiny Mdm34, Mmm1 a Mdm12 obsahují SMP (synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding protein) doménu, která je homologní k TULIP ((tubular lipid-binding)-like protein) doméně proteinů vázajících lipidy (Kopec et al., 2010).

Výměna fosfolipidů mezi endoplazmatickým retikulem a mitochondrii probíhá v obou směrech. Mitochondrie sama je schopna syntetizovat dva fosfolipidy: kardiolipin a fosfatidyletanolamin (Kuchler et al., 1986). Samotný transport lipidů může mít mnoho forem, avšak žádný z nich, zdá se, není spojen se systémem váčků, kterým jsou transportovány mnohé proteiny sekreční dráhy. Prvním způsobem přenosu lipidů je samovolný transport, jehož rychlost

skrže vodné prostředí mezi membránami je obecně velmi pomalá. Dále je možná translokace v místě těsného spojení membrán (srážkou membrán). Posledním způsobem je zapojení proteinů, které by přenos lipidů usnadňovaly (Daum and Paltauf, 1984; Daum et al., 1986; Roseman and Thompson, 1980). Přesný molekulární princip mechanismů transportu lipidů není dosud objasněn.

5.1.1 Regulace komplexu ERMES

Počet a velikost ERMES komplexů reguluje Ca^{2+} -vazebná GTPáza Gem1. Gem1 patří do rodiny mitochondriálních Rho (Miro) proteinů, které obsahuje dvě GTP vazebné domény a dva Ca^{2+} vazebné EF-hand motivy (Fransson et al., 2003; Frederick et al., 2004). Gem1 je zakotven ve vnější mitochondriální membráně, zatímco jeho GTP domény a EF-hand motivy jsou exponované do cytosolu. Jedna GTP doména a jeden EF-hand motiv regulují navázání Gem1 a komplexu ERMES. Zatímco druhá GTP doména ovlivňuje aktivitu komplexu (Kornmann et al., 2011). Gem1 navíc reguluje pohyblivost mitochondrie a její dělení (Koshiba et al., 2011).

5.2 Výměna lipidů mezi mitochondriálními membránami

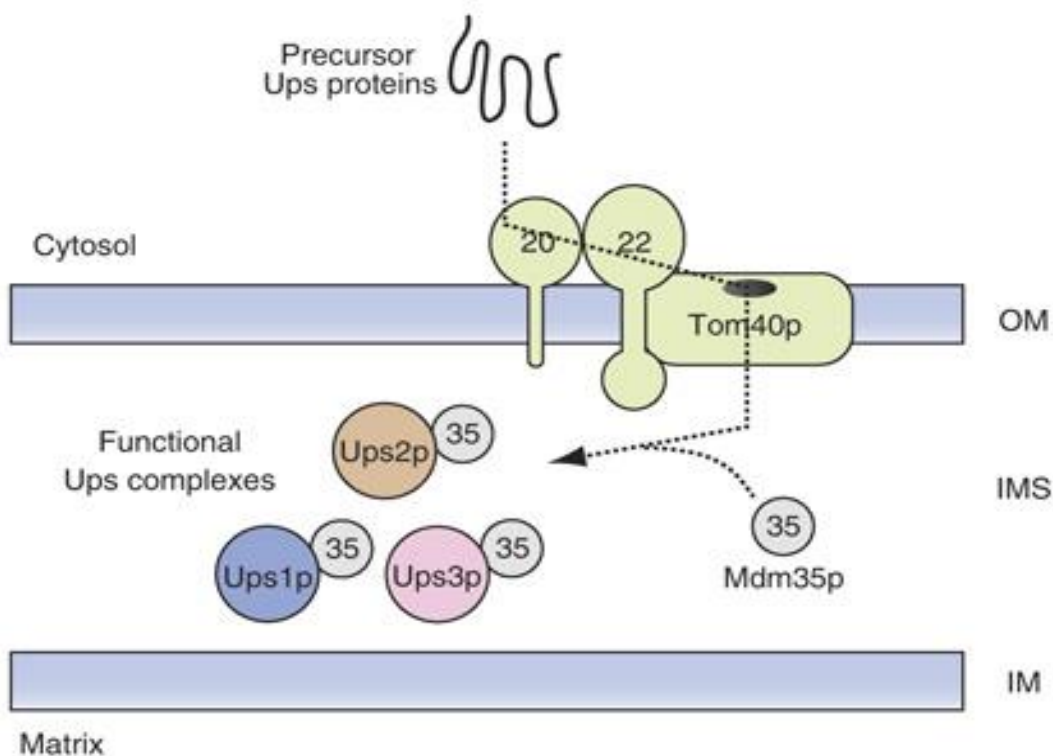
Po přijetí fosfolipidů z ER do vnější mitochondriální membrány, musí dojít k jejich přenosu mezi obě mitochondriální membrány. I zde dochází k přiblížení obou membrán a k vytvoření kontaktních míst, ve kterých probíhá samotný transport (Simbeni et al., 1991). Bylo zjištěno, že v těchto místech je vyšší koncentrace fosfatidylcholinu, fosfatidyletanolaminu a kardiolipinu (Ardail et al., 1990).

5.2.1 MICOS komplex

Proteinový komplex vázající k sobě obě mitochondriální membrány se nazývá MICOS (mitochondrial contact site). Tento komplex tvoří dohromady šest proteinů: Mic27, Mic26, Mic19, Mic12, Mic10 a Mic60, který interaguje se všemi ostatními proteiny. MICOS komplex se nachází na vnitřní mitochondriální membráně a interaguje s komplexem proteinů vnější membrány Ugo1-Fzo1 a TOB/SAM (Fritz et al., 2001; Harner et al., 2011). MICOS komplex navíc ovlivňuje strukturu mitochondrie tvorbou/stabilizací tzv. crista junction (tubulární spojení krist a vnitřní mitochondriální membrány, která je v kontaktu s vnější mitochondriální membránou) (Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009). Spojení membrán komplexem MICOS umožňuje samovolný přenos fosfolipidů.

5.2.2 Proteiny Ups

Rozdílnou distribuci lipidů mezi membránami zajišťují proteiny z proteinové rodiny Ups/PRELI schopné vázat lipidy, které se nacházejí v mezimembránovém prostoru (Dee and Moffat, 2005). Proteiny Ups hrají významnou roli v syntéze kardiolipinu a její regulaci. Tento fosfolipid je pro mitochondrii specifický a nachází se převážně ve vnitřní mitochondriální membráně, kde také probíhá jeho syntéza. Kardiolipin je nutný pro mnoho mitochondriálních funkcí: stabilizaci ADP/ATP přenašečů, stabilizaci komplexů III a IV elektron-transportního řetězce a také pro udržení membránového potenciálu (Beyer and Nuscher, 1996; Jiang et al., 2000; Pfeiffer et al., 2003). Ups proteiny tvoří komplexy s proteinem mezimembránového prostoru Mdm35. Tento protein umožňuje translokaci nově syntetizovaných proteinů Ups1 a Ups2 do mezimembránového prostoru (Obr. 6) (Tamura et al., 2010).



Obrázek 6: Import proteinů Ups1, Ups2 a Ups3 do mezimembránového prostoru. Proteiny jsou ve formě prekurzorů směřovány do vnější mitochondriální membrány skrze TOM komplex. Ups proteiny jsou rozpoznány receptory Tom20 a Tom22 a následně nasměrovány na TOM kanál (Tamura et al., 2010). Samotnou translokaci proteinů do mezimembránového prostoru provádí protein Mdm35p. Převzato a upraveno z (Tamura et al., 2010).

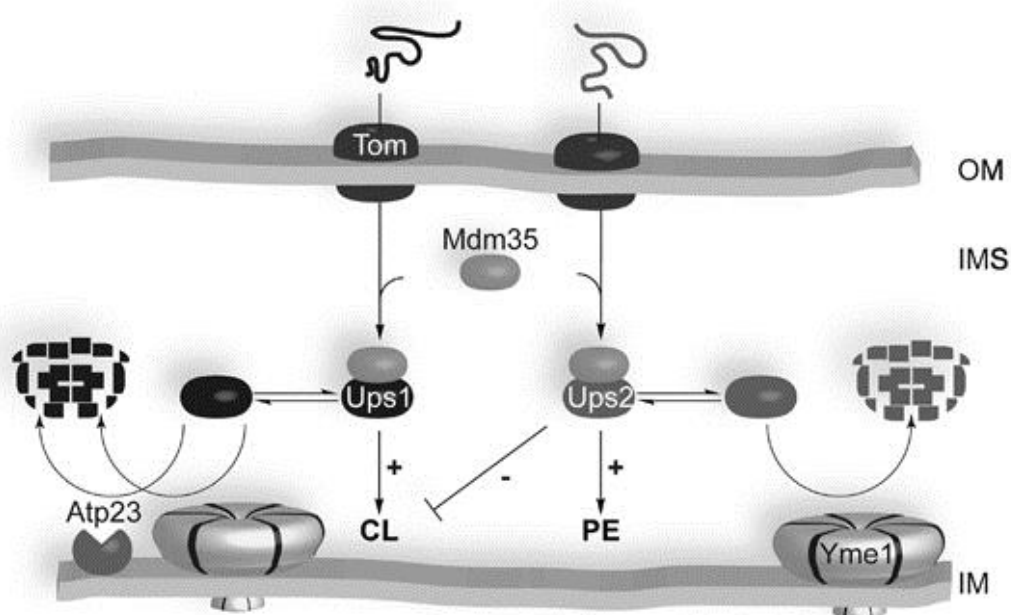
5.2.2.1 Ups1

Ups1 přenáší prekurzor kardiolipinu, kyselinu fosfatidovou (PA), v mezimembránovém prostoru. Interakce Ups1 s proteinem Mdm35 brání degradaci Ups1 proteázami Yme1 a Atp23 (Potting et al., 2010). Přenos PA komplexem Ups1-Mdm35 probíhá v obou směrech. Nejprve dojde k navázání PA na Ups1 na jedné membráně a poté ke spojení s Mdm35. Mdm35 stabilizuje Ups1 a udržuje ho v konformaci, ve které je schopen transportu. Negativně nabitě fosfolipidy, které se preferenčně váží na Ups1 (avšak samy nejsou transportovány), následně umožní spojení komplexu Ups1-Mdm35 s akceptorovou membránou. Při této interakci dojde k destabilizaci komplexu a uvolní se jak Mdm35, tak PA. Směr této transportní reakce je určen enzymatickou přeměnou PA na kardiolipin ve vnitřní mitochondriální membráně. Schopnost Ups1 se oddisociovat z vnitřní membrány je snížena při vyšší koncentraci kardiolipinu, a tím je omezen i přenos PA (Connerth, et al., 2012).

5.2.2.2 Ups2

Druhým proteinem z rodiny Ups/PRELI je Ups2. Tento protein má stejně jako Ups1 regulační funkci v metabolismu kardiolipinu (Obr. 7) (Tamura et al., 2009). Experimenty s buňkami postrádajícími protein Ups2 vykazují snížený obsah fosfolipidu fosfatidylethanolaminu (PE) ve svých mitochondriálních membránách. Stejně jako Ups1 i Ups2 asociuje s Mdm35, který chrání Ups2 před degradací Yme1 proteázou (Potting et al., 2010). Na základě podobnosti s komplexem Ups1-Mdm35 se předpokládá transportní funkce komplexu Ups2-Mdm35, jehož substrátem by byl právě PE.

Další funkcí Ups1 a jeho homologu Ups2 v mitochondrii je účast v import proteinů translokázou TIM23. Bylo zjištěno, že pro tvorbu jedné z isoform proteinu Mgm1 je nutná přítomnost funkčních Ups1 a Ups2 (Osman et al., 2009; Sesaki et al., 2006). Mgm1 je dynamin-like GTPáza, která se vyskytuje v mitochondrii ve dvou isoformách: l-Mgm1 a s-Mgm1. Obě formy Mgm1 jsou esenciální pro dělení mitochondrie a řadu dalších procesů spojených s tvarováním mitochondriálních krist (Zick et al., 2009). Ups1 a jeho homology jsou tedy významnými faktory ovlivňující morfologii mitochondrie.



Obrázek 7: Regulace syntézy kardiolipinu a PE pomocí proteinů Ups1 a Ups2. Proteiny Ups1 a Ups2 se musí v mezimembránovém prostoru navázat na protein Mdm35, v opačném případě jsou degradovány proteázami Yme1 a Atp23. Ups1 pozitivně reguluje syntézu kardiolipinu, zatímco Ups2 působí na tuto dráhu negativně. Naopak syntéza PE je proteinem Ups2 podporována. Převzato a upraveno z (Potting et al., 2010)

Poslední známý Ups protein Ups3 má zatím neobjasněnou funkci a jeho nepřítomnost v buňkách nezpůsobuje výrazné změny v lipidovém složení mitochondriálních membrán (Osman et al., 2009).

Bylo zjištěno, že vlastnosti kardiolipinu a PE mohou ovlivňovat aktivaci a oligomerizaci proapoptických molekul v mitochondriálních membránách, které následně způsobují buněčnou smrt (Lucken-Ardjomande et al., 2008)

6 Závěr

Mitochondrie je jedna ze základních buněčných organel a proto jakékoli poškození mitochondriálních drah se projeví v životaschopnosti celého organismu. Mnoho lidských nemocí a dysfunkcí je zapříčiněno právě poškozením některé mitochondriální složky. Z tohoto důvodu je výzkumu mitochondrií věnována taková pozornost, avšak přítomnost dvou membrán komplikuje pozorování procesů uvnitř mitochondrie. Mnoho mitochondriálních drah včetně jejich proteinů bylo nalezeno v organismu *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocí bioinformatických a dalších metod se však daří identifikovat i lidské homology.

Mitochondrie je uvnitř buňky závislá na interakci s ostatními organelami a součástmi buňky. S tím souvisí i nutnost neustálé výměny biomolekul a metabolitů. V těchto transportech se uplatňuje celá řada proteinů. Protein Oxa1 se významně podílí na translokaci podjednotek komplexu elektron-transportního řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně. Stejný protein pomáhá i skládat komplex ATP syntázy. Degradované mitochondriální proteiny jsou naštěpeny proteázou Yme1 a uvolněny ABC transportérem Mdl1. Fe-S klastry, komplexy železa a síry obsažené v Fe-S proteinech, jsou tvořené v matrix mitochondrie proteinovou dráhou zvanou ISC. Tyto komplexy jsou vyžadovány i pro skládání jaderných a cytosolických Fe-S proteinů, jejichž prekurzor přenáší protein Atm1. V poslední řadě se věnuji popisu transportu lipidů mezi endoplazmatickým retikulem a mitochondrií a také transportu lipidů mezi samotnými mitochondriálními membránami. V této práci jsem shrnul dosavadní informace o transportních systémech v mitochondrii zaměřené na export proteinů a lipidů a jejich regulaci. Některé detaily těchto transportních drah však zůstávají stále neobjasněné.

7 Seznam použité literatury

- Adam, A. C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W. and Hell, K.** (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* 25, 174–83.
- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S. D., Perktold, A., Zellnig, G. and Daum, G.** (1999). Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* 264, 545–553.
- Allikmets, R., Raskind, W. H., Hutchinson, a, Schueck, N. D., Dean, M. and Koeller, D. M.** (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum. Mol. Genet.* 8, 743–749.
- Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F. and Louisot, P.** (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* 265, 18797-802.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. and Langer, T.** (1996). The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* 85, 875–885.
- Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W. and Langer, T.** (1998). The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J.* 17, 4837–47.
- Arnold, I., Wagner-Ecker, M., Ansorge, W. and 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.
- Augustin, S., Nolden, M., Müller, S., Hardt, O., Arnold, L. and Langer, T.** (2005). Characterization of peptides released from mitochondria: Evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J. Biol. Chem.* 280, 2691–2699.
- Balk, J., Pierik, A. J., Netz, D. J. A., Mühlenhoff, U. and Lill, R.** (2004). The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J.* 23, 2105–15.

- Balk, J., Aguilar Netz, D. J., Tepper, K., Pierik, A. J. and Lill, R.** (2005). The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10833–41.
- Barros, M. H. and Nobrega, F. G.** (1999). YAH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: A new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene* 233, 197–203.
- Barros, M. H., Johnson, A. and Tzagoloff, A.** (2004). COX23, a homologue of COX17, is required for cytochrome oxidase assembly. *J. Biol. Chem.* 279, 31943–31947.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G. and Pratje, E.** (1994). PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 245, 272–278.
- Bauerschmitt, H., Mick, D. U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P. and Herrmann, J. M.** (2010). Ribosome-binding Proteins Mdm38 and Mba1 Display Overlapping Functions for Regulation of Mitochondrial Translation. *Mol. Biol. Cell* 21, 1937–1944.
- Beyer, A.** (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* 6, 2043–58.
- Beyer, K. and Nuscher, B.** (1996). Specific cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. *Biochemistry* 35, 15784–90.
- Broadley, S. A., Demlow, C. M. and Fox, T. D.** (2001). Peripheral mitochondrial inner membrane protein, Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7663–7672.
- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Zwicker, K., Huynen, M. A., Lill, R., Brandt, U. and Balk, J.** (2008). The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J.* 27, 1736–46.
- Campbell, C. L. and Thorsness, P. E.** (1998). Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 1, 2455–2464.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al.** (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423–7.

- Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., et al.** (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93, 973–83.
- Confalonieri, F. and Duguet, M.** (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays* 17, 639–50.
- Connerth, M., Tatsuta, T., Haag, M., Klecker, T., Westermann, B. and Langer, T.** (2012). Intramitochondrial Transport of Phosphatidic Acid in Yeast by a Lipid Transfer Protein. *Science* (80-.). 338, 815–819.
- Daum, G. and Paltauf, F.** (1984). Phospholipid transfer in yeast. Isolation and partial characterization of a phospholipid transfer protein from yeast cytosol. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 794, 385–391.
- Daum, G., Heidorn, E. and Paltauf, F.** (1986). Intracellular transfer of phospholipids in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 878, 93–101.
- Dean, M., Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., Kistler, A., Shafer, B., Michaelis, S. and Strathern, J.** (1994). Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* 10, 377–383.
- Dee, C. T. and Moffat, K. G.** (2005). A novel family of mitochondrial proteins is represented by the *Drosophila* genes *slmo*, *preli*-like and *real-time*. *Dev. Genes Evol.* 215, 248–54.
- Elliott, L. E., Saracco, S. A. and Fox, T. D.** (2012). Multiple roles of the Cox20 chaperone in assembly of *saccharomyces cerevisiae* cytochrome C oxidase. *Genetics* 190, 559–567.
- Fransson, A., Ruusala, A. and Aspenström, P.** (2003). Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 6495–502.
- Frazier, A. E., Taylor, R. D., Mick, D. U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Guiard, B. and Rehling, P.** (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J. Cell Biol.* 172, 553–564.
- Frederick, R. L., McCaffery, J. M., Cunningham, K. W., Okamoto, K. and Shaw, J. M.** (2004). Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J. Cell Biol.* 167, 87–98.

- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. and Westermann, B.** (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152, 683–92.
- Funes, S., Nargang, F. E., Neupert, W. and Herrmann, J. M.** (2004). The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol. Biol. Cell* 15, 1853–61.
- Galluhn, D. and Langer, T.** (2004). Reversible assembly of the ATP-binding cassette transporter Mdl1 with the F1F0-ATP synthase in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 38338–45.
- Gari, K., León Ortiz, A. M., Borel, V., Flynn, H., Skehel, J. M. and Boulton, S. J.** (2012). MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* 337, 243-5.
- Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E. and Culotta, V. C.** (1999). *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* 294, 897–907.
- Gelling, C., Dawes, I. W., Richhardt, N., Lill, R. and Muhlenhoff, U.** (2008). Mitochondrial Iba57p Is Required for Fe/S Cluster Formation on Aconitase and Activation of Radical SAM Enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1851–1861.
- Gerber, J., Mühlenhoff, U. and Lill, R.** (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* 4, 906–11.
- Green-Willms, N. S., Butler, C. A., Dunstan, H. M. and Fox, T. D.** (2001). Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J. Biol. Chem.* 276, 6392–7.
- Grivell, L. A., Artal-Sanz, M., Hakkaart, G., De Jong, L., Nijtmans, L. G. J., Van Oosterum, K., Siep, M. and Van Der Spek, H.** (1999). Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Lett.* 452, 57-60.
- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F. and Neupert, W.** (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 30, 4356–70.

- He, S. and Fox, T. D.** (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell* 8, 1449–1460.
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R. a** (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2250–2255.
- Hell, K., Tzagoloff, A., Neupert, W. and Stuart, R. A.** (2000). Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J. Biol. Chem.* 275, 4571–4578.
- Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Craig, E. A. and Neupert, W.** (1994). Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* 127, 893–902.
- Herrmann, J. M., Neupert, W. and Stuart, R. A.** (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* 16, 2217–2226.
- Hildenbeutel, M., Theis, M., Geier, M., Haferkamp, I., Neuhaus, H. E., Herrmann, J. M. and Ott, M.** (2012). The membrane insertase Oxa1 is required for efficient import of carrier proteins into mitochondria. *J. Mol. Biol.* 423, 590–9.
- Hoppins, S., Collins, S. R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R. M., Lackner, L. L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J. S. and Nunnari, J.** (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* 195, 323–40.
- Horner, D. S., Heil, B., Happe, T. and Embley, T. M.** (2002). Iron hydrogenases – ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 27, 148–153.
- Horng, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S. and Winge, D. R.** (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 279, 35334–35340.
- Chloupková, M., LeBard, L. S. and Koeller, D. M.** (2003). MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: Evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J. Mol. Biol.* 331, 155–165.

- Jan, P. S., Esser, K., Pratje, E. and Michaelis, G.** (2000). Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Mol. Gen. Genet.* 263, 483–491.
- Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K. and Stuart, R. A.** (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: The importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* 22, 6438–6447.
- Jia, L., Dienhart, M. K. and Stuart, R. A.** (2007). Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex. *Mol. Biol. Cell* 18, 1897–908.
- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N. and Greenberg, M. L.** (2000). Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 275, 22387–22394.
- Jiang, F., Chen, M., Yi, L., de Gier, J.-W., Kuhn, A. and Dalbey, R. E.** (2003). Defining the Regions of Escherichia coli YidC That Contribute to Activity. *J. Biol. Chem.* 278, 48965–48972.
- Kambacheld, M., Augustin, S., Tatsuta, T., Müller, S. and 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, 20132–20139.
- Keil, M., Bareth, B., Woellhaf, M. W., Peleh, V., Prestele, M., Rehling, P. and Herrmann, J. M.** (2012). Oxa1-Ribosome Complexes Coordinate the Assembly of Cytochrome *c* Oxidase in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 287, 34484–34493.
- Kiley, P. J. and Beinert, H.** (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 181–185.
- Kim, R., Saxena, S., Gordon, D. M., Pain, D. and Dancis, A.** (2001). J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 17524–32.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R.** (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 18, 3981–3989.
- Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C. and Ban, N.** (2009). YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol. Cell* 34, 344–53.

- Kopec, K. O., Alva, V. and Lupas, A. N.** (2010). Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinformatics* 26, 1927–1931.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S. and Walter, P.** (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477–81.
- Kornmann, B., Osman, C. and Walter, P.** (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14151–6.
- Koshiba, T., Holman, H. A., Kubara, K., Yasukawa, K., Kawabata, S., Okamoto, K., MacFarlane, J. and Shaw, J. M.** (2011). Structure-function analysis of the yeast mitochondrial Rho GTPase, Gem1p: implications for mitochondrial inheritance. *J. Biol. Chem.* 286, 354–62.
- Krüger, V., Deckers, M., Hildenbeutel, M., Van Der Laan, M., Hellmers, M., Dreker, C., Preuss, M., Herrmann, J. M., Rehling, P., Wagner, R., et al.** (2012). The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 287, 33314–33326.
- Kuchler, K., Daum, G. and Paltauf, F.** (1986). Subcellular and submitochondrial localization of phospholipid-synthesizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 165, 901–10.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Mühlenhoff, U., Kispal, G. and Lill, R.** (2001). An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* 2, 715–20.
- Langer, T.** (2000). AAA proteases: Cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25, 247–251.
- Lee, J., Hofhaus, G. and Lisowsky, T.** (2000). Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477, 62–6.
- Leighton, J. and Schatz, G.** (1995). An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J.* 14, 188–95.
- Leonhard, K., Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Mannhaupt, G., Neupert, W. and Langer, T.** (1996). AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* 15, 4218–29.

- Leonhard, K., Stiegler, a, Neupert, W. and Langer, T.** (1999). Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* 398, 348–351.
- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S. and Martinou, J.-C.** (2008). Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. *Cell Death Differ.* 15, 929–937.
- Luirink, J., Samuelsson, T. and de Gier, J. W.** (2001). YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* 501, 1–5.
- Manzella, L., Barros, M. H. and Nobrega, F. G.** (1998). ARH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast* 14, 839–46.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J. M.** (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059–69.
- Moira Glerum, D., Shtanko, A. and Tzagoloff, A.** (1996). SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 20531–20535.
- Mühlenhoff, U., Stadler, J. A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R. J., Lill, R. and Wiesenberger, G.** (2003a). A Specific Role of the Yeast Mitochondrial Carriers Mrs3/4p in Mitochondrial Iron Acquisition under Iron-limiting Conditions. *J. Biol. Chem.* 278, 40612–40620.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. and Lill, R.** (2003b). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 22, 4815–25.
- Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J. and Lill, R.** (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 41205–41216.
- Nagley, P.** (1988). Eukaryote membrane genetics: the Fo sector of mitochondrial ATP synthase. *Trends Genet.* 4, 46–52.
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y. and 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, 4441–4452.

- Narahari, J., Ma, R., Wang, M. and Walden, W. E.** (2000). The aconitase function of iron regulatory protein 1: Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J. Biol. Chem.* 275, 16227–16234.
- Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Stümpfig, M., Mühlenhoff, U. and Lill, R.** (2007). The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat. Chem. Biol.* 3, 278–86.
- Netz, D. J. A., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlenhoff, U., Pierik, A. J. and Lill, R.** (2010). Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* 6, 758–65.
- Netz, D. J. A., Stith, C. M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H. M., Stodola, J. L., Lill, R., Burgers, P. M. J. and Pierik, A. J.** (2012). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* 8, 125–32.
- Nowikovsky, K., Froschauer, E. M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G. and Schweyen, R. J.** (2004). The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J. Biol. Chem.* 279, 30307–30315.
- Osman, C., Haag, M., Potting, C., Rodenfels, J., Dip, P. V., Wieland, F. T., Brügger, B., Westermann, B. and Langer, T.** (2009). The genetic interactome of prohibitins: Coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J. Cell Biol.* 184, 583–596.
- Ott, M. and Herrmann, J. M.** (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803, 767–775.
- Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N. and Herrmann, J. M.** (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J.* 25, 1603–10.
- Park, S., Gakh, O., O’Neill, H. A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G. C. and Isaya, G.** (2003). Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J. Biol. Chem.* 278, 31340–31351.
- Perlman, S., Abelson, H. T. and Penman, S.** (1973). Mitochondrial protein synthesis: RNA with the properties of Eukaryotic messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 350–353.

- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L. and Schagger, H.** (2003). Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873–52880.
- Potting, C., Wilmes, C., Engmann, T., Osman, C. and Langer, T.** (2010). Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J.* 29, 2888–98.
- Poutre, C. G. and Fox, T. D.** (1987). PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics* 115, 637–647.
- Pratje, E., Mannhaupt, G., Michaelis, G., Beyreutherl, K. and Beyreuther, K.** (1983). A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrially encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2, 1049–1054.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R. a, Neupert, W. and Herrmann, J. M.** (2001). Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 153, 1085–96.
- Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., et al.** (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *J. Cell Biol.* 185, 1047–63.
- Rainey, R. N., Glavin, J. D., Chen, H.-W., French, S. W., Teitell, M. A. and Koehler, C. M.** (2006). A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8488-97.
- Rak, M. and Tzagoloff, A.** (2009). F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18509–14.
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J.** (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248, 183–228.
- Rodriguez-Manzaneque, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. and Herrero, E.** (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13, 1109–1121.
- Roseman, M. A. and Thompson, T. E.** (1980). Mechanism of the spontaneous transfer of phospholipids between bilayers. *Biochemistry* 19, 439–444.

- Sesaki, H., Dunn, C. D., Iijima, M., Shepard, K. a., Yaffe, M. P., Machamer, C. E. and Jensen, R. E.** (2006). Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J. Cell Biol.* 173, 651–658.
- Schaedler, T. a, Thornton, J. D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A. J., van Veen, H. W. and Balk, J.** (2014). A Conserved Mitochondrial ATP-Binding Cassette Transporter Exports Glutathione Polysulfide for Cytosolic Metal Cofactor Assembly. *J. Biol. Chem.* 289, 23264-23274.
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H. and Craig, E.** (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10206–11.
- Schmidt, S., Strub, A., Röttgers, K., Zufall, N. and Voos, W.** (2001). The two mitochondrial heat shock proteins 70, Ssc1 and Ssq1, compete for the cochaperone Mge1. *J. Mol. Biol.* 313, 13–26.
- Schreiner, B., Westerburg, H., Forné, I., Imhof, A., Neupert, W. and Mokranjac, D.** (2012). Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 23, 4335–46.
- Schultz, B. E. and Chan, S. I.** (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 23–65.
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F. and Daum, G.** (1991). Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 266, 10047–9.
- Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R. and Kispal, G.** (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* 277, 26944–9.
- Souza, R. L., Green-willms, N. S., Fox, T. D., Tzagoloff, A. and Nobrega, F. G.** (2000). MEMBRANE TRANSPORT STRUCTURE FUNCTION AND BIOGENESIS: Cloning and Characterization of COX18 , a *Saccharomyces cerevisiae* PET Gene Required for the Assembly of Cytochrome Oxidase PET Gene Required for the Assembly of Cytochrome Oxidase *. 275, 1–6.
- Sperka-Gottlieb, C. D., Hermetter, A., Paltauf, F. and Daum, G.** (1988). Lipid topology and physical properties of the outer mitochondrial membrane of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 946, 227–234.

- Srinivasan, V., Netz, D. J. A., Webert, H., Mascarenhas, J., Pierik, A. J., Michel, H. and Lill, R.** (2007). Structure of the Yeast WD40 Domain Protein Cia1, a Component Acting Late in Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Structure* 15, 1246–1257.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W. and Herrmann, J. M.** (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22, 6448–6457.
- Taanman, J. W. and Capaldi, R. A.** (1992). Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J. Biol. Chem.* 267, 22481–22485.
- Takahashi, Y. and Tokumoto, U.** (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* 277, 28380–3.
- Tamura, Y., Endo, T., Iijima, M. and Sesaki, H.** (2009). Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J. Cell Biol.* 185, 1029–1045.
- Tamura, Y., Iijima, M. and Sesaki, H.** (2010). Mdm35p imports Ups proteins into the mitochondrial intermembrane space by functional complex formation. *EMBO J.* 29, 2875–2887.
- Tzagoloff, A. and Myers, a M.** (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 249–285.
- Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W. and Herrmann, J. M.** (2004). Atp10p assists assembly of Atp6p into the F₀ unit of the yeast mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 279, 19775–80.
- Uzarska, M. A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R. and Mühlenhoff, U.** (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1830–41.
- Wang, P. and Dalbey, R. E.** (2011). Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 866–75.
- Weber, E. R., Hanekamp, T. and Thorsness, P. E.** (1996). Biochemical and functional analysis of the YME1 gene product, an ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 7, 307–317.
- Wollman, Minai and Nechushtai** (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes1. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 21–85.

- Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J. and Langer, T.** (2001). Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291, 2135–8.
- Zeng, X., Barros, M. H., Shulman, T. and Tzagoloff, A.** (2008). ATP25, a new nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for expression and assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATPase. *Mol. Biol. Cell* 19, 1366–77.
- Zhang, Y., Lyver, E. R., Nakamaru-Ogiso, E., Yoon, H., Amutha, B., Lee, D.-W., Bi, E., Ohnishi, T., Daldal, F., Pain, D., et al.** (2008). Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5569–82.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. and Dean, D. R.** (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273, 13264–72.
- Zick, M., Duvezin-Caubet, S., Schäfer, A., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A. S.** (2009). Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett.* 583, 2237–43.