

Marta Kołodziejczak✉

Magdalena Opalińska

Małgorzata Czarna

Hanna Jańska

Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

✉Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. F. Joliot-Curie 14 A, 50-383 Wrocław; tel.: (71) 3756297, e-mail: marta.kolodziejczak@uwr.edu.pl

Artykuł otrzymano: 28 maja 2016 r.

Artykuł zaakceptowano: 10 czerwca 2016 r.

Słowa kluczowe: proteazy mitochondrialne, proteazy AAA, FTSH, Lon, ClpXP, kontrola jakości białek mitochondrialnych

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są finansowane są ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na realizację projektu własnego N N301 307137 – przyznanego dla MK; grantu FUGA 2015/16/S/NZ3/00364 – przyznanego dla M.O oraz grantu OPUS 2012/07/B/NZ2/01794 – przyznanego dla M.Cz.

STRESZCZENIE

Fundamentalna rola mitochondriów w procesach wytwarzania energii oraz integracji wielu istotnych szlaków metabolicznych i sygnałowych sprawia, że są one kluczowe dla funkcjonowania komórki. Optymalne działanie mitochondriów zależy od jakościowego i ilościowego składu białkowego tego organellum – proteomu. Aby utrzymać odpowiednią homeostazę proteomu, w mitochondriach wykształcił się system kontroli jakości i ilości białek, który obejmuje mechanizmy działające na poziomach: molekularnym, organellarnym i komórkowym. Kluczowym elementem tego systemu jest grupa proteaz zależnych od ATP. W jej skład wchodzi enzymy macierzy mitochondrialnej – Lon/PIM1 i ClpXP oraz zlokalizowane w błonie wewnętrznej proteazy AAA. Degradują one niesfałdowane, uszkodzone i niezasocjowane białka. Enzymy te zaangażowane są również w złożone mechanizmy regulacyjne determinujące m.in. translację mitochondrialną, procesy fuzji oraz odpowiedź na stres. Brak zależnych od ATP proteaz prowadzi do dysfunkcji mitochondriów i rozwoju wielu poważnych chorób u ludzi. Niniejsza praca podsumowuje obecny stan wiedzy dotyczący zależnych od ATP proteolitycznych systemów kontroli jakości w mitochondriach różnych organizmów.

WPROWADZENIE

Mitochondria odgrywają fundamentalną rolę w funkcjonowaniu komórki eukariotycznej. Organelle te, nie tylko stanowią główne źródło energii niezbędnej do przeprowadzania procesów komórkowych, ale są też miejscem wielu kluczowych dla życia komórki szlaków metabolicznych [1-4]. Funkcjonowanie mitochondriów zależy od jakościowego i ilościowego składu białkowego tego organellum (proteomu). Proteom mitochondrialny ulega ciągłym zmianom w zależności od stadium rozwoju organizmu oraz warunków środowiskowych. Mitochondria są organellami półautonomicznymi. Ogromna większość białek mitochondrialnych jest kodowana przez genom jądrowy, syntetyzowana w cytosolu i potranslacyjnie importowana do organellum. Natomiast, genom mitochondrialny koduje około 1% białek, które są syntetyzowane dzięki mitochondrialnemu systemowi translacji [5]. Jedną z ważniejszych funkcji mitochondriów, wytwarzanie ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS, ang. *oxidative phosphorylation*) zależy od aktywności złożonych kompleksów błonowych, których składowe kodowane są przez oba genomy. Biogeneza kompleksów OXPHOS wymaga zatem ścisłej koordynacji ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego [6]. Ponadto, podczas fosforylacji oksydacyjnej dochodzi do powstawania reaktywnych form tlenu (RFT), których akumulacja może prowadzić do peroksydacji lipidów oraz utleniania białek. Aby zapobiec szkodliwej akumulacji białek uszkodzonych, niesfałdowanych czy też niewykorzystanych w biogenezie kompleksów OXPHOS oraz aby utrzymać optymalny skład proteomu, w mitochondriach wykształcił się system kontroli jakości białek (MQC, ang. mitochondrial quality control) [3,4,7,8]. System ten obejmuje mechanizmy działające na poziomach: molekularnym, organellarnym i komórkowym. Niniejsza praca charakteryzuje grupę proteaz zależnych od ATP jako kluczowego elementu systemu kontroli jakości białek mitochondrialnych na poziomie molekularnym, podkreślając również ich zaangażowanie w kontrolę jakości na pozostałych poziomach, m.in. poprzez udział w mitochondrialnej fuzji lub aktywacji ścieżek sygnałowych indukowanych stresem.

PROTEAZY ZALÉŻNE OD ATP – CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

W związku z endosymbiotycznym pochodzeniem mitochondriów, zidentyfikowane u organizmów eukariotycznych proteazy zależne od ATP są ortologami odpowiednich enzymów bakteryjnych. Należą one do trzech rodzin: zlokalizowanych w macierzy mitochondrialnej proteaz Lon i Clp oraz związanych z mitochondrialną błoną wewnętrzną proteaz FTSH (Tab. 1). Proteaza Lon wzięła swoją nazwę od fenotypu jaki wykazywały mutanty *lon* *Escherichia coli* tworzące

Tabela 1. Proteazy zależne od ATP zidentyfikowane w mitochondriach drożdży, ssaków i roślin. Podwójna lokalizacja białek: M/CH - mitochondria/chloroplasty; M/P - mitochondria/peroksysony.

Organizm	Mitochondrialne proteazy zależne od ATP			
Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lon/PIM1	ClpXP	Proteazy AAA/FTSH	
			i-AAA	m-AAA
	PIM1	ClpX	Yta11 (Yme1)	Yta10 Yta12
Zwierzęta	Lon	ClpXP	YME1L1	AFG3L1 AFG3L2 SPG7
Człowiek	LON	CLPXP	YME1L1	AFG3L2 SPG7 (paraplegina)
Rośliny <i>Arabidopsis thaliana</i>	Lon1 (M/P)	ClpX1-3	ATFTSH4	ATFTSH3
	Lon4 (M/CH)	ClpB4 ClpP2	ATFTSH11 (M/CH)	ATFTSH10

długie (ang. *long*) niepodzielone filamenty [9]. Enzym ten u drożdży nosi nazwę PIM1 (ang. *proteolysis in mitochondria*). Historia odkrycia proteazy typu Clp sięga lat 80. XX wieku, kiedy zidentyfikowano w *E. coli* proteazę ClpAP, złożoną z podjednostki ATPazowej ClpA oraz proteolitycznej ClpP [10]. Dalsze badania wykazały, że ClpP może współdziałać również z innym białkiem ClpX tworząc ClpXP, o innej niż ClpAP specyficzności substratowej [10]. Udokumentowano, że w mitochondriach występuje typ ClpXP, z wyjątkiem drożdży gdzie zidentyfikowano jedynie podjednostkę ClpX [11]. W roku 1975 pojawiła się natomiast pierwsza wzmianka o białku FtsH (ang. *Filamentous temperature sensitive H*) i była związana z uzyskaniem w wyniku chemicznej mutagenyzy mutantów *E. coli* wrażliwych na wysoką temperaturę, wykazujących zaburzenia procesów podziału komórki i wzrostu [12]. Mitochondrialne enzymy FTSH są często określane jako proteazy AAA.

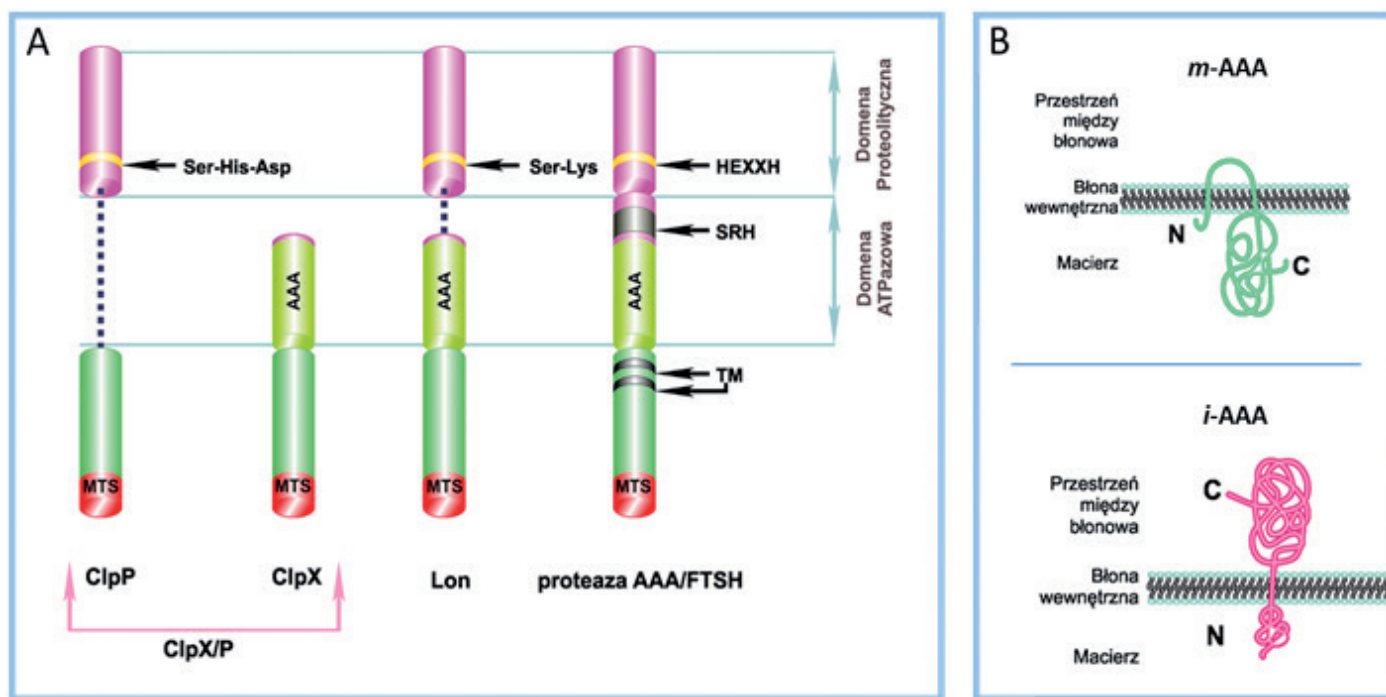
U większości eukariontów, szczególnie u roślin, doszło do multiplikacji genów kodujących omawiane enzymy (Tab. 1). Przykładowo, w genomie *Arabidopsis thaliana* identyfikuje się aż 12 genów kodujących białka typu FTSH, z których trzy posiadają lokalizację wyłącznie mitochondrialną (ATFTSH3,10,4), jedno kierowane jest do mitochondriów oraz chloroplastów (ATFTSH11) (Tab. 1), a pozostałe to enzymy chloroplastowe [13]. Podobną sytuację obserwuje się w przypadku proteaz Lon, gdzie spośród czterech białek, proteazami mitochondrialnymi są Lon1 i Lon 4 (Tab. 1), z tym że obie wykazują podwójną lokalizację – oprócz mitochondriów pierwsza z nich kierowana jest również do peroksysonów, a druga do chloroplastów [14]. Jeszcze większą liczbę białek identyfikuje się u *Arabidopsis* w przypadku rodziny proteaz Clp [13,15]. Mianowicie stwierdzono obecność 9 podjednostek ATPazowych, 6 posiadających aktywność proteolityczną oraz 4 nieaktywnie katalityczne formy ClpP zwane ClpR. Spośród tych białek lokalizację mitochondrialną wykazują: 4 białka o aktywności opiekuńczej ClpB4 i ClpX1-3 oraz jedna proteolityczna podjednostka ClpP2 (Tab. 1). W odróżnieniu od tak licznej reprezentacji białek ClpP u *Arabidopsis*, niższe eukarionty, w tym *Saccharomyces cerevisiae*, wcale nie posiadają aktywnego proteolitycznie białka tej rodziny. U tych organizmów stwierdzono

no jedynie obecność podjednostki ClpX [15].

Mitochondrialne proteazy zależne od ATP wchodzą w skład superrodziny białek AAA+ (ang. *ATPases Associated with diverse cellular Activities*), co oznacza, że w swojej budowie zawierają domenę AAA+ z charakterystycznymi motywami Walker A oraz Walker B, które umożliwiają odpowiednio wiązanie i hydrolizę ATP [13,16]

(Ryc. 1A). U niektórych białek z tej rodziny obecny jest dodatkowo motyw nazwany wtórnym regionem homologii (SRH, ang. *second region of homology*), co decyduje o ich przynależności do grupy proteaz AAA/FTSH. Charakterystyczną wspólną cechą proteaz z rodziny AAA+ jest ich podwójna aktywność, białka opiekuńczego (ATPazowa) i proteolityczna, wynikająca z obecności odpowiednio domeny AAA+ oraz proteolitycznej [7,17]. Proteazy typu Lon i ClpP są proteazami serynowymi. Lon należy do rodziny S16 proteaz serynowych z centrum katalitycznym w postaci diady Ser-Lys, natomiast proteaza ClpP posiadająca katalityczną triadę złożoną z His-Asp-Ser klasyfikuje się do rodziny S14. Proteazy AAA/FTSH posiadają oprócz domeny ATPazowej, domenę proteolityczną z unikalnym motywem HEXXH charakterystycznym dla zależnych od cynku metaloproteaz z rodziny termolizyn M41 (Ryc. 1A). W przypadku proteaz Lon i FTSH domena katalityczna oraz domena AAA+ znajdują się w obrębie tego samego łańcucha polipeptydowego, inaczej niż u ClpXP, gdzie domeny te umiejscowione są w dwóch różnych łańcuchach polipeptydowych, należących do dwóch różnych białek współtworzących enzym [7] (Ryc. 1A). Proteazy ClpXP i Lon to enzymy zlokalizowane w macierzy mitochondrialnej, natomiast proteazy AAA/FTSH związane są z błoną wewnętrzną poprzez domeny transbłonowe, których ilość determinuje topologię tych białek w błonie (Ryc. 1B). Proteazy *i*-AAA posiadają jeden rejon transbłonowy i eksponują swoje centrum katalityczne do przestrzeni międzybłonowej, podczas gdy katalityczna część proteaz *m*-AAA, zawierających dwa rejony transbłonowe, zorientowana jest w stronę macierzy mitochondrialnej [17].

Mitochondrialne proteazy zależne od ATP są enzymami oligomerycznymi, co oznacza, że zorganizowane są w duże kompleksy złożone z identycznych podjednostek (homooligomery: Lon, *i*-AAA, *m*-AAA) lub białek blisko spokrewnionych (heterooligomery: *m*-AAA). Warto podkreślić szczególną różnorodność kompleksów tworzonych przez mitochondrialne proteazy *m*-AAA. Wykazano, że posiadają



Rycina 1. Schemat obrazujący strukturę domenową mitochondrialnych proteaz zależnych od ATP oraz topologię w błonie wewnętrznej proteaz AAA. A) budowa domenowa z zaznaczonymi charakterystycznymi regionami: MTS – sekwencja kierująca do mitochondriów; AAA – domena AAA+; SRH – wtórny region homologii; Ser-His-Asp, Ser-Lys, HEXXH – charakterystyczne dla poszczególnych proteaz centra katalityczne domen proteolitycznych; B) topologia błonowa mitochondrialnych proteaz AAA. Determinowana ilością domen transmembranowych topologia białka w błonie wewnętrznej decyduje o przynależności do proteaz m-AAA (centrum katalityczne skierowane do macierzy mitochondrialnej) lub i-AAA (centrum katalityczne skierowane do przestrzeni międzybłonowej).

one zdolność do zmian charakteru tworzonego kompleksu i w zależności od warunków lub rodzaju tkanki mogą ulegać homo- lub hetero-oligomeryzacji [18,19].

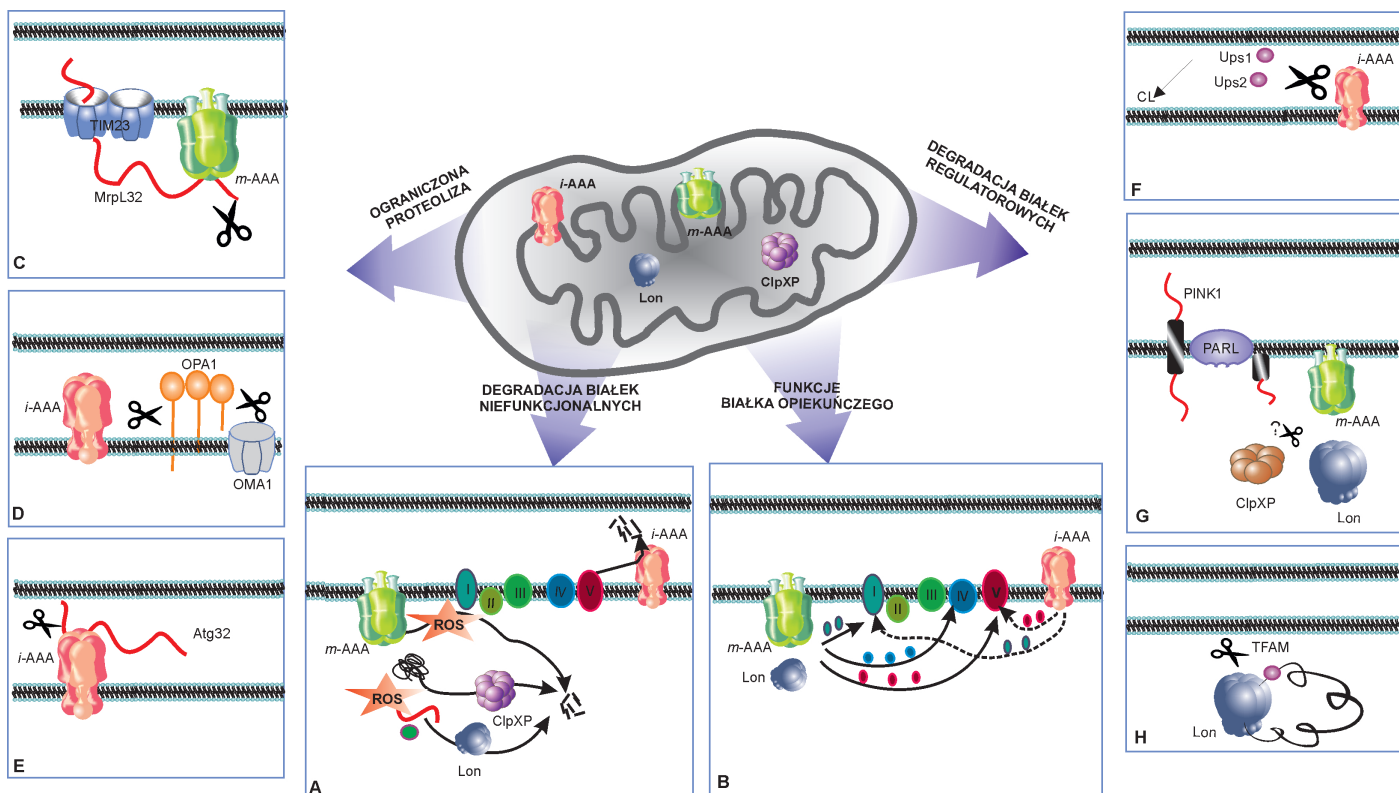
Informacje dotyczące struktury molekularnej oraz mechanizmu działania proteaz zależnych od ATP pochodzą głównie z badań nad proteazami bakteryjnymi [20,21]. Wskazują one na heksameryczną budowę kompleksów Lon i proteaz AAA, w których część ATPazowa przybiera kształt pierścienia, natomiast proteolityczna przypomina baryłkę. W przypadku proteazy ClpXP podjednostki opiekuńcze (ClpX) formują również heksameryczny pierścień, natomiast peptydaza (ClpP) tworzy strukturę 14-podjednostkową złożoną z dwóch heptamerycznych pierścieni [10]. Centrum katalityczne omawianych enzymów ukryte jest we wnętrzu kompleksu, do którego prowadzi ciasny tunel uniemożliwiający przedostanie się do komory katalitycznej białek w formie natywnej. Dlatego też substraty muszą być najpierw rozfałdowane przez domenę ATPazową i przetransportowane do części w której zachodzi właściwa degradacja [16,22]. Innymi słowy, do degradacji wymagane jest ATP, jednakże energia pochodząca z jego hydrolizy nie jest wykorzystywana do cięcia proteolitycznego, ale do rozfałdowania substratu i jego translokacji. Badania wskazują również, że wiązanie ATP, bez jego hydrolizy, wymagane jest do utrzymania integralności kompleksów proteaz AAA oraz, w przypadku ClpX, do funkcjonalnego połączenia obu multimerycznych struktur w jeden kompleks [10]. Mitochondrialne proteazy zależne od ATP działają w sposób procesywny, degradując białka do krótkich peptydów uwalnianych na zewnątrz przez pory komory katalitycznej [21,22].

FUNKCJE MOLEKULARNE PROTEAZ ZALEŻNYCH OD ATP

DEGRADACJA BIAŁEK NIEFUNKCJONALNYCH

Degradacja białek niefunkcyjnych – niesfałdowanych, uszkodzonych (np. utlenionych) lub obecnych w nadmiarze – to jedna z głównych funkcji molekularnych proteaz mitochondrialnych zależnych od ATP [11,16,17] (Ryc. 2A). Enzymy te trawią białka niefunkcyjne do peptydów, które następnie są rozkładane do pojedynczych aminokwasów z udziałem mitochondrialnych oligopeptydaz [23,24]. Produkty działania proteaz zależnych od ATP mogą być również eksportowane poza organellum doprowadzając w konsekwencji do aktywacji ekspresji genów jądrowych kodujących m.in. składowe systemu mitochondrialnej kontroli jakości białek. Taki mechanizm nosi nazwę odpowiedzi mtUPR (ang. *mitochondrial Unfolded Protein Response*) i jest opisany w dalszej części pracy.

Kluczowe znaczenie w usuwaniu białek niesfałdowanych oraz utlenionych w macierzy mitochondrialnej pełni proteaza Lon (u drożdży nazywana PIM1) [25]. Wykazano znaczne zwiększenie jej syntezy podczas trwania stresu oksydacyjnego w komórkach zarówno drożdży jak i zwierząt, co przemawia za jej szczególną rolę w zabezpieczeniu mitochondriów przed jego skutkami [25-27]. Udokumentowano, że brak proteazy PIM1 doprowadza do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów złożonych z białek utlenionych [28]. Wśród substratów PIM1 zidentyfikowano dużą grupę utlenionych białek tj. Hsp60, SOD2, Pdb1, Lpd1, Atp2 oraz Ilv5 [29]. Jako preferencyjnie degradowane przez



Rycina 2. Funkcje molekularne proteaz zależnych od ATP w regulacji procesów mitochondrialnych. A) degradacja białek niefunkcyjnych macierzy mitochondrialnej oraz błony wewnętrznej; B) rola aktywności białka opiekuńczego w biogenezie kompleksów OXPHOS; C) wpływ na syntezę białek mitochondrialnych poprzez udział w obróbce białka MrpL32; D) regulacja dynamiki mitochondriów poprzez obróbkę białka OPA1 związanego z procesami fuzji i podziałów (ssaki); E) udział w procesie mitofagii poprzez obróbkę białka Atg32 (drożdże); F) udział w biogenezie kardioliipiny (CL) (drożdże); G) udział w mitofagii poprzez degradację białka PINK1 (ssaki); H) regulacja metabolizmu mtDNA poprzez degradację czynnika transkrypcyjnego TFAM (ssaki).

PIM1 wymienia się też utlenione białka zaangażowane w utrzymanie stabilności mitochondrialnego DNA, co sugeruje ochronną rolę tej proteazy przed uszkodzeniami genomu [26,30]. Wyciszenie ekspresji proteazy Lon w ssaczych liniach komórkowych również prowadzi do akumulacji białek uszkodzonych przez utlenienie [26]. Wykazano, że wśród substratów ssaczej proteazy Lon jest kluczowy enzym cyklu Krebsa – akonitaza. Stwierdzono, że oczyszczona proteaza Lon wykazuje większą aktywność w stosunku do utlenionej akonitazy, w porównaniu do jej formy natywnej [31]. Nie u wszystkich organizmów brak funkcjonalnej proteazy Lon wiąże się z akumulacją białek utlenionych. Nie zaobserwowano takiego zjawiska w przypadku roślinnych mutantów *lon1* [32], co może sugerować odmienną funkcję mitochondrialnej proteazy Lon lub alternatywnie wykształcenie przez te organizmy skuteczniejszych mechanizmów kompensacyjnych. U wyższych eukariotów, obok proteazy Lon, niefunkcjonalne białka macierzy mitochondrialnej usuwane są dzięki aktywności ClpXP [10,33]. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów mitochondrialnej ClpP2 u ryżu podczas naturalnego procesu starzenia się liści i w odpowiedzi na działanie kwasu absycynowego, hormonu przyspieszającego starzenie [34]. Ekspresja genu tej proteazy jest zwiększona również w warunkach stresu proteotoksycznego. Proteoliza zależna od proteazy ClpP pełni kluczową rolę w procesie adaptacji komórki w odpowiedzi na akumulację niepoprawnie zwiniętych białek w mitochondriach, tj. w odpowiedzi mtUPR [35].

Błona wewnętrzna wymaga szczególnej kontroli jakości jako miejsce występowania ważnych z punktu bioenergetyki wielopodjednostkowych kompleksów oksydacyjnej fosforylacji. Wspólną cechą mutantów pozbawionych proteaz zależnych od ATP jest obniżenie kompetencji oddechowych komórki w wyniku zaburzenia biogenezy kompleksów OXPHOS [36-38]. Aktywność degradująca proteaz AAA w stosunku do niezasocjowanych składowych kompleksów OXPHOS wiąże się z prawidłowym składaniem tych kompleksów oraz utrzymaniem integralności i stabilności błony wewnętrznej. Wśród zidentyfikowanych substratów drożdżowej proteazy i-AAA (Yme1) znajdują się niezasocjowana podjednostka II oksydazy cytochromu *c* (Cox2) oraz podjednostka I kompleksu dehydrogenazy NADH (Nde1p) [11,17,23,39]. Do białek, które zidentyfikowano jako fizjologiczne substraty ludzkiej YME1L należą błonowe podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego jak Cox4, Ndufb6 [40]. Drożdżowy przedstawiciel proteaz *m*-AAA, heterooligomeryczny kompleks Yta10/Yta12 degraduje niezasocjowane mitochondrialnie kodowane podjednostki kompleksu *bc1* (Cob), kompleksu oksydazy cytochromu *c* (Cox1, Cox3) oraz kompleksu V, syntazy ATP (ATP6,8,9) [41]. Przykładem innego rodzaju substratów degradowanych przez proteazę *i*-AAA są zlokalizowane w przestrzeni międzybłonowej małe białka Tim, które w formie błędnie zwiniętej są degradowane przez drożdżową Yme1 [42].

Kontrola nad obrotem metabolicznym krótko żyjących białek regulatorowych to aktywność, która mocno rozszerza znaczenie omawianych proteaz w regulacji złożonych procesów wewnątrzmitochondrialnych (Ryc.2). Jeden z najbardziej znanych przykładów dotyczy drożdżowej proteazy *i*-AAA/Yme1 i jej wpływu na metabolizm fosfolipidów w błonie mitochondrialnej. Wykazano, że proteaza Yme1 zaangażowana jest w mechanizm regulacji poziomu ważnych dla funkcjonowania mitochondriów fosfolipidów: kardiolipiny (CL) oraz fosfatydyloetanolaminy (PE) [1,43]. Kardiolipina wykazuje pleiotropowy wpływ na funkcje mitochondriów. Stabilizuje genom mitochondrialny, kompleksy i superkompleksy OXPHOS, kompleksy przenośnikowe ADP/ATP oraz translokazę TIM23 [44]. Wśród białek zasadniczych dla biogenezy CL u drożdży znajdują się regulatorowe białka rezydujące w przestrzeni międzybłonowej Ups1 i Ups2. Regulacja czasu półtrwania tych białek kontrolowana jest przez proteazę Yme1 oraz w przypadku białka Ups1 dodatkowo przez proteazę ATP23 [43] (Ryc. 2F). Ponadto stwierdzono, że proteaza *i*-AAA determinuje stabilność dekarboksylazy fosfatydyloseryny (Psd1), która pośredniczy w konwersji fosfatydyloseryny do PE [45].

Zlokalizowana w macierzy mitochondrialnej proteaza Lon wpływa natomiast na biosyntezę hormonów steroidowych w komórkach kory nadnercza, łożyska oraz gonad poprzez utrzymanie odpowiedniej ilości regulatorowego białka StAR, pośredniczącego w transporcie cholesterolu z cytosolu do mitochondriów [46]. Stwierdzono też, że proteaza Lon reguluje metabolizm mtDNA poprzez specyficzną degradację mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (TFAM) (Ryc. 2H). Sugeruje się, że proteaza Lon kontroluje prawidłowy stosunek ilości czynnika transkrypcyjnego do mtDNA przez co reguluje mitochondrialną transkrypcję [47].

Wśród potencjalnych substratów ClpXP znalazły się niemal wszystkie podjednostki kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH), enzymy cyklu kwasów trikarboksylowych, enzymy metabolizujące aminokwasy i kwasy tłuszczowe, a także białka wiążące centra żelazo-siarkowe [48].

Bardzo interesujące są doniesienia wskazujące na prawdopodobne zaangażowanie proteaz zależnych od ATP we wczesne etapy regulacji procesu mitofagii. Proces ten jest kluczowym elementem systemu kontroli jakości białek na poziomie organellarnym [1,3,4,49]. W trakcie mitofagii mitochondria są transportowane do lumen lizosomów/wakuol i tam rozkładane. Sugeruje się, że proteazy ClpXP, Lon oraz *m*-AAA uczestniczą w obrocie metabolicznym kinazy białkowej PINK1 [1,50] (Ryc. 2G). W warunkach fizjologicznych białko to jest importowane do mitochondriów i wbudowywane w błonę wewnętrzną, a jego stały odpowiedni poziom jest pod kontrolą proteaz zależnych od ATP. Podczas stresu, kiedy wydajność importu białek jest obniżona, PINK1 akumuluje się na powierzchni mitochondriów i aktywuje białko Parkin, które poprzez poliubikwitylację białek błony zewnętrznej uruchamia proces degradacji mitochondriów, mitofagii [50].

Aktywność proteolityczna proteaz zależnych od ATP to nie tylko degradacja białek do peptydów. Proteazy te mogą również przetwarzać białka poprzez ograniczoną proteolizę, prowadząc do ich aktywacji (Ryc. 2).

Jeden z najlepiej udokumentowanych przykładów ograniczonej proteolizy dotyczy drożdżowej proteazy *m*-AAA i białka dużej podjednostki mitorybosomów MrpL32 [51]. Wykazano, że proteaza *m*-AAA jest odpowiedzialna za odcięcie N-końcowej sekwencji sygnałnej importowanego do mitochondrium białka MrpL32 (Ryc. 2C). W rezultacie proteaza *m*-AAA, poprzez aktywację tej podjednostki, reguluje biogenezę mitorybosomów i wpływa na wydajność translacji mitochondrialnej. Zaburzenia w procesie translacji mitochondrialnej skutkują brakiem kodowanych mitochondrialnie składowych OXPHOS i uniemożliwiają formowanie kompleksów oddechowych. Okazało się, że istotnym elementem w rozpoznaniu białka MrpL32 jako substratu ograniczonej proteolizy jest jego charakterystyczny zachowany w ewolucji motyw CXXC-X₀-CXXC [52]. Mutacja w obrębie jego sekwencji zmienia MrpL32 z substratu ulegającego tylko obróbce na substrat degradowany przez *m*-AAA. Motyw ten zapewnia przybranie przez białko odpowiedniej natywnej konformacji, która uniemożliwia całkowitą degradację, ale daje możliwość odcięcia sekwencji sygnałnej [52]. Proces dojrzewania białka MrpL32 odróżnia go od większości białek importowanych i aktywowanych przez typową proteazę procesującą MPP. Funkcja proteazy *m*-AAA w regulacji biogenezy rybosomów i mitochondrialnej translacji jest najprawdopodobniej zachowana również u roślin, o czym świadczą wyniki komplementacji mutantów *yta10/yta12* przez proteazę PsFTSH grochu (*Pisum sativum*) [53].

U ssaków proteaza *i*-AAA odpowiada za obróbkę występującej w wewnętrznej błonie dynamino-podobnej GTPazy OPA1 (ang. *opticotrophy 1 protein*) [54] (Ryc. 2D). W wyniku działania *i*-AAA powstaje forma długa białka tzw. L-OPA1. W warunkach stresu aktywacji ulega inna metaloproteaza błony wewnętrznej OMA1, która przeprowadza konwersję dłuższych form białka OPA1 (L-OPA1) do jej krótszych wersji (S-OPA1). Akumulacja S-OPA1 jest równoznaczna z zapoczątkowaniem fragmentacji organellum. Odpowiednia forma białka OPA1 warunkuje utrzymanie balansu pomiędzy procesami fuzji i podziałów [1,45,54,]. Z kolei stosunek fuzji do podziałów decyduje o właściwej morfologii mitochondriów, ich liczbie, ruchliwości, segregacji podczas podziałów komórki, stabilności mtDNA czy w końcu zdolnościach oddechowych. Podobne mechanizmy angażujące proteazy zależne od ATP w kontrolę dynamiki mitochondriów obserwowane są u drożdży, gdzie homologiem białka OPA1 jest Mgm1[3].

Dla drożdżowej proteazy Yme1 wykazano, że prowadzona przez nią obróbka proteolityczna receptorowego białka błony zewnętrznej Atg32, wpływa na uruchomienie i efektywny przebieg procesu mitofagii [55] (Ryc. 2E). Zahamowanie cięcia C-końcowej sekwencji sygnałnej

Atg32 wiązało się z dużymi zaburzeniami tego procesu [55].

Inny przykład aktywności przetwarzającej zależnych od ATP proteaz jest związany z procesem usuwania intronów w transkryptach mitochondrialnych. Stwierdzono, że wspólnym substratem dla aktywności przetwarzającej proteaz PIM1 oraz *m*-AAA jest matura RNA, katalizująca wycięcie intronów transkryptów genów *cox1* i *cob* [56]. Poprzez aktywację maturazy enzymy te biorą udział w regulacji ekspresji genów mitochondrialnych.

FUNKCJE ZWIĄZANE Z AKTYWNOŚCIĄ BIAŁKA OPIEKUŃCZEGO

Dane literaturowe wskazują, że niektóre z funkcji pełnionych przez proteazy zależne od ATP opierają się jedynie na ich aktywności białka opiekuńczego, bez udziału proteolizy. Dobrym przykładem jest proces dojrzewania peroksydazy cytochromu c (Ccp1, białka chroniącego przed stresem oksydacyjnym) u drożdży [57]. Stwierdzono, że *m*-AAA uczestniczy w zależnej od ATP dyslokacji Ccp1 w celu zapewnienia właściwej pozycji tego białka w błonie umożliwiającej przeprowadzenie wewnątrzblonowego cięcia przez inną proteazę zwaną romboidem [57]. Kolejny przykład funkcji niezwiązanych z aktywnością proteolityczną dotyczy drożdżowej proteazy *i*-AAA oraz procesu dojrzewania PNPazy (fosforylasy polinukleotydowej), białka przestrzeni międzyblonowej związanego z importem RNA [58]. Aby nastąpiła obróbka proteolityczna PNPazy, jej prekursor musi dostać się do macierzy mitochondrialnej, gdzie MPP przeprowadzi cięcie N-końcowej sekwencji sygnałnej. Następnie białko to powinno z powrotem zostać przetransportowane przez błonę wewnętrzną do przestrzeni międzyblonowej. Zahamowanie translokacji białka i jego akumulację w macierzy mitochondrialnej obserwuje się podczas heterologicznej ekspresji zwierzęcego homologa PNPazy w mutantach drożdżowych *yme1* z wyłączoną aktywnością domeny ATPazowej. Wynik ten wskazuje na rolę funkcji białka opiekuńczego Yme1 podczas translokacji PNPazy przez błonę wewnętrzną [58].

Badania wskazują również, że niezależna od aktywności proteolitycznej funkcja białka opiekuńczego proteaz AAA jest wymagana podczas formowania kompleksu syntazy ATP u drożdży (Ryc. 2B). Powstawanie złożonych z ATP9 i ATP6 intermediatów, tworzących następnie błonową część kompleksu V (F_0), zależy od proteaz *m*-AAA, ale nie jest związane z ich funkcją proteolityczną [59]. Rolę aktywności ATPazowej w tworzeniu syntazy ATP opisano również dla białka Yme1 [60,61]. Inną proteazą wykorzystującą w procesie składania kompleksów OXPHOS funkcję białka opiekuńczego jest proteaza macierzy mitochondrialnej Lon [62]. Stwierdzono, że nadekspresja jej genu prowadzona w mutantach drożdżowych *m*-AAA w dużym stopniu przywraca zdolności oddechowe i stopień złożenia kompleksów oddechowych, ale nie wpływa na poziom białek zakumulowanych w mutancie *yta10/12*. Efekt supresji nasila się podczas ekspresji genu Lon z wyłączoną aktywnością domeny proteolitycznej [62].

UDZIAŁ PROTEAZ ZALEŻNYCH OD ATP W ODPOWIEDZI NA STRES

W ostatnim czasie intensywnie pracuje się nad zrozumieniem działających w mitochondriach mechanizmów mających na celu dostosowanie składu oraz aktywność mitochondrialnej maszynerii importu białek oraz systemu kontroli jakości białek (proteaz i białek opiekuńczych) do zaistniałego zapotrzebowania komórki [63-65]. Procesy te polegają na związanej ze stresem aktywacji odpowiednich ścieżek sygnałowych skutkujących indukcją transkrypcji genów jądrowych kodujących mitochondrialne białka, które pomogłyby w przywróceniu homeostazy mitochondrialnej.

Najlepiej poznaną ścieżką sygnałową, która aktywowana jest poprzez stres proteotoksyczny w mitochondriach, jest odpowiedź mtUPR (ang. *mitochondrial Unfolded Protein Response*) [35,66-68]. Stanowi ona podstawowy mechanizm przeciwdziałający akumulacji niepoprawnie zwiniętych białek. Chociaż ścieżka ta została odkryta w systemie ssaczym, molekularne podstawy jej działania zostały zrozumiane na podstawie badań przeprowadzonych na modelowym organizmie *Caenorhabditis elegans* [69]. Newralgiczną rolę w aktywacji ścieżki mtUPR pełnią mitochondrialne proteazy zależne od ATP. U *C. elegans*, peptydy powstałe w wyniku degradacji przez proteazę Clp niesfaldowanych białek gromadzących się w macierzy mitochondrium, transportowane są do cytoplazmy z udziałem transportera HAF-1, należącego do transporterów typu ABC. Następnie peptydy te biorą udział w aktywacji ekspresji genów jądrowych kodujących m.in składniki systemu mitochondrialnej kontroli jakości białek [67,68]. Odpowiedź jądra wymaga utworzenia kompleksu czynnika transkrypcyjnego DVE-1 z białkiem ubikwitynopodobnym UBL-5 oraz aktywacji czynnika transkrypcyjnego (ATFS-1). ATFS-1 posiada sygnał kierujący do jądra oraz do mitochondriów. W warunkach optymalnych, ATFS-1 jest importowany do macierzy mitochondrialnej, gdzie jest szybko degradowany przez proteazę Lon. Podczas stresu, szczególnie proteotoksycznego, wydajność importu białek do mitochondriów spada, co powoduje akumulację ATFS-1 w cytosolu i jego migrację do jądra, gdzie aktywuje ekspresję białek opiekuńczych oraz proteaz mitochondrialnych [66].

Stwierdzono, że do indukcji ścieżki mtUPR może dochodzić nie tylko na drodze związanej z aktywnością proteazy Clp, ale również poprzez zmiany ilościowe kluczowej podjednostki translokazy białkowej TIM23, białka Tim17A. Obniżony poziom tego białka wywołuje zmniejszenie efektywności importu białek prekursorowych do organelum, co aktywuje ścieżkę mtUTR [70].

CHOROBY WYWOŁANE BRAKIEM AKTYWNOŚCI PROTEAZ ZALEŻNYCH OD ATP

Biorąc pod uwagę różnorodne funkcje molekularne, a w konsekwencji różnorodność procesów w których uczestniczą mitochondrialne proteazy zależne od ATP można stwierdzić, że pełnią one kluczową rolę w utrzymywaniu puli funkcjonalnych mitochondriów. Dane literaturowe wskazują, że zaburzone działanie tych proteolitycznych

Tabela 2. Choroby dziedziczne wywołane przez mutacje w genach kodujących mitochondrialne proteazy zależne od ATP.

Gen	Białko	Locus	Choroba	Dziedziczenie	Piśmiennictwo
AFG3L2	podjednostka proteazy mAAA	18p11	Ataksja mózdkowo-rdzeniowa SCA28	autosomalne dominujące	[71,74]
AFG3L2	podjednostka proteazy mAAA	18p11	Zespół spastycznej ataksji - neuropatii	autosomalne recesywne	[77]
SPG7	podjednostka proteazy mAAA	16q24	Dziedziczna papraplegia spastyczna	autosomalne recesywne	[37,73]
SPG7	podjednostka proteazy mAAA	SPG7	Zespół przewlekłej postępującej zewnętrznej oftalmoplegii	N/D	[72]
LON	proteaza Lon	19p13	Zespół mózgowo-oczno-zębowo-uszno-szkieletowy (CODAS)	autosomalne recesywne	[81]
CLPP	podjednostka proteolityczna proteazy Clp	19p13	Zespół Perraulta	autosomalne recesywne	[84]

maszyny białkowych jest związane z chorobami neurologicznymi, degeneracyjnymi, metabolicznymi, multisystemowymi oraz nowotworowymi u ludzi (Tab. 2). Te patologiczne stany mogą być konsekwencją dziedzicznej mutacji w genie kodującym proteazę. Choroba może rozwinąć się również w efekcie zaburzenia równowagi elementów systemu kontroli jakości np. poprzez nieoptymalne zmiany w syntezie proteazy.

Wiele przesłanek wskazuje, że proteaza *m-AAA* odgrywa niezbędną rolę w funkcjonowaniu komórek nerwowych. Mutacje w genach *AFG3L2* i *SPG7*, które kodują podjednostki proteazy *m-AAA* u ludzi, powodują kurczowe porażenie kończyn dolnych oraz niezdolność ruchową [37,71]. Mutacje w *SPG7* również są przyczyną przewlekłej oftalmoplegii [72]. Myszy pozbawione *m-AAA* wykazują szereg neurologicznych defektów, które przypominają stany chorobowe charakteryzujące się degeneracją aksonów [73,74]. *AFG3L2* jest mitochondrialnym białkiem kluczowym dla funkcjonowania komórek Purkiniego [75]. Zaburzenia w aktywności *AFG3L2* indukują zależną od mitochondriów degenerację komórek Purkiniego, zmiany w transporcie mitochondriów i hiperfosforylację białka tau, co jest powiązane z neurodegeneracją i demencją [74,76,77].

Defekty i mutacje w genach kodujących mitochondrialne proteazy zależne od ATP w konsekwencji prowadzą również do chorób metabolicznych oraz multisystemowych. Przykładem są polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w genie *SPG7*, dla których wykazano związek m.in. z cukrzycą typu 2 oraz chorobą wieńcową obydwójga płci oraz dysgenезją jajników (u kobiet) [78].

Regulacja aktywności mitochondriów, poprzez wpływ tych organelli na metabolizm i energetykę całej komórki, ma kluczowe znaczenie w procesie nowotworzenia [79]. Wiele danych wskazuje na ważną rolę mitochondrialnej proteazy LON w procesie transformacji nowotworowej. LON uczestniczy w reorganizacji metabolizmu komórkowego oraz

chroni komórki przed akumulacją czynników indukujących starzenie [1]. Wykazano, iż obniżenie aktywności tej proteazy w komórkach rakowych, obniża ich nowotworowe właściwości. Natomiast zwiększenie aktywności LON uodparnia komórki na warunki stresu i chroni je przed apoptozą [1,80]. Dysfunkcja proteazy Lon jest przyczyną zespołu zaburzeń rozwojowych tzw. syndromu CODAS [81]. LON uczestniczy również w zależnej od czynnika indukowanego przez hipoksję-1 adaptacji mitochondriów do warunków niedotlenienia, które są charakterystyczne w przypadku złośliwych guzów [82].

Homozygotyczna delecja genu *CLPP* u myszy prowadzi do nagromadzenia podjednostki CLPX, mitochondrialnego DNA i mediatorów odpowiedzi zapalnej [83]. Brak funkcjonalnej *CLPP* wiąże się z zahamowanym wzrostem, bezpłodnością oraz utratą słuchu [84]. *CLPP* jest atrakcyjnym celem w terapii skierowanej przeciwko ostrej białaczce mieloblastycznej. W komórkach tej formy białaczki obserwuje się znaczne podwyższenie poziomu *CLPP*. Genetyczne lub indukowane chemicznie obniżenie aktywności *CLPP* zaburza funkcjonowanie mitochondriów w tych komórkach, co koreluje z ich zwiększoną umieralnością [85].

PODSUMOWANIE

Badania nad proteazami mitochondrialnymi zależnymi od ATP, które prowadzone są już od niemal pół wieku, ukazują bardzo szeroki zakres aktywności tych intrygujących maszyn białkowych. Proteazy zależne od ATP regulują funkcjonowanie mitochondriów na wielu płaszczyznach. Niewątpliwie podstawową rolą tych proteaz jest zapobieganie akumulacji niefunkcyjnych, błędnie zwiniętych białek w tym organellum poprzez ich degradację. Z drugiej strony, proteazy te mogą również wykazywać wysoką specyficzność substratową i przeprowadzać precyzyjne cięcie określonych białek czy kontrolować stabilność krótkożyjących, natywnie zwiniętych białek regulatorowych. Dzięki tym właściwościom proteazy zależne od ATP kontrolują

wiele procesów kluczowych dla funkcjonowania mitochondriów wliczając w to m.in. mitochondrialną translację, biogenezę fosfolipidów, fuzję oraz autofagię mitochondriów. Proteazy te zaangażowane są również w mechanizmy mitochondrialnej odpowiedzi na stres np. mtUPR. Kluczową rolę proteaz zależnych od ATP w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów dodatkowo podkreśla fakt, iż mutacje w genach kodujących podjednostki tych proteaz prowadzą do wielu chorób o podłożu metabolicznym, zapalnym oraz neurodegeneracyjnym. Stąd, proteazy zależne od ATP są interesującymi celami terapeutycznymi w leczeniu wielu schorzeń. W zależności od przyczyn zaistniałego stanu patologicznego w chorych komórkach stosuje się różne strategie modulacji aktywności tych białek. W chorobach neurodegeneracyjnych korzystna jest stymulacja aktywności tych mitochondrialnych proteaz, hamująca degenerację komórek nerwowych [1]. Natomiast w terapiach nowotworowych stosuje się wyciszenie aktywności tych enzymów [25]. Dalsze badania molekularnego podłoża funkcjonowania proteaz zależnych od ATP pozwolą nam w pełni zrozumieć ich znaczenie dla optymalnej aktywności mitochondriów.


PIŚMIENNICTWO

- Quirós PM, Langer T, Otín CL (2015) New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Molecular Cell Biology* 16: 345-359
- Ni HM, Williams JA, Ding WX (2015) Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology* 4: 6-12
- Bohovych I, Sherine SL, Chan Khalimonchuk O (2015) Mitochondrial protein quality control: the mechanisms guarding mitochondrial health antioxidants & redox. *Signaling* 22: 977-993
- Baker MJ, Tatsuta T, Langer T (2011) Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a007559
- Kuzmenko A, Atkinson GC, Levitskii S, Zenkin N, Tenson T, Hauryliuk V, Kamenski P (2014) Mitochondrial translation initiation machinery: Conservation and diversification. *Biochimie* 100: 132-140
- Giege P, Sweetlove LT, Cognat V, Leaver CJ (2005) Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1497-1512
- Scheibye-Knudsen M (2015) Protecting the mitochondrial powerhouse. *Trends Cell Biol* 25: 158-170
- Janska H, Kwasniak M, Szczepanowska J (2012) Protein quality control in organelles – AAA/FtsH story. *Biochim Biophys Acta* 1: 381-387
- Lee I, Suzuki CK (2008) Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates *Biochim Biophys Acta* 1784: 727-735
- Baker TA, Sauer RT (2012) ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim Biophys Acta* 1823: 15-28
- Kaser M, Langer T (2000) Protein degradation in mitochondria. *Cell Develop Biol* 11: 181-190
- Langklotz S, Baumann U, Narberhaus F (2012) Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochim Biophys Acta* 1823: 40-48
- Janska H, Piechota J, Kwasniak M (2010) ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1071-1075
- Rigas S, Daras G, Tsitsekian D, Alatzas A, Hatzopoulos P (2014) Evolution and significance of the Lon gene family in *Arabidopsis* organelle biogenesis and energy metabolism. *Front Plant Sci* 5: 145
- Halperin T, Zheng B, Itzhaki H, Clarke AK, Adam Z (2001) Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent Clp protease. *Plant Mol Biol* 45: 461-468
- Gerdes F, Takashi Tatsuta, Thomas Langer (2012) Mitochondrial AAA proteases – Towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim Biophys Acta* 1823: 49-55
- Janska (2005) ATP-dependent proteases in plant mitochondria: What do we know about them today? *Physiologia Plantarum* 123: 399-405
- 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: 758-767
- Piechota J, Kolodziejczak M, Juszcak I, Sakamoto W, Janska H (2010) Identification and characterization of high molecular weight complexes formed by matrix AAA proteases and prohibitins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 285: 12512-12521
- Langklotz S, U Baumann, Narberhaus F (2012) Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochim Biophys Acta* 1823: 40-48
- Cha SS, An YJ, Lee CHR, Lee HS, Kim YG, Kim SJ, Kwon Gian Marco De Donatis KK, Lee JH, Maurizi MM, Gyun Kang S (2010) Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber. *EMBO J* 29: 3520-3530
- Striebel F, Kress W, Weber-Ban E (2009) Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol* 19: 209-217
- Augustin S, Nolden M, Müller S, Hardt O, Arnold I, Langer T (2008) Characterization of peptide released from mitochondria: evidence for constant release and peptide flux. *J Biol Chem* 280: 2691-2699
- Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, Langer T (2001) Role of ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291: 2135-2138
- Pinti M, Gibellini L, Liu Y, Xu S, Lu B, Cossarizza A (2015) Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer *Cel Molec Life Sci* 72: 4807-4824
- Bayot A, Gareil M, Chavatte L, Hamon MP, L'Hermitte-Stead C, Beaumatin F, Priault M, Rustin P, Lombès A, Friguet B, Bulteau AL (2014) Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. *Biochimie* 100: 38-47
- Van Dyck I, 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: 238-242
- Bender T, Lewrenz I, Franken S, Baitzel C, Voos W (2011) Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim/LON protease. *Mol Biol Cell* 22: 541-554
- Smakowska E, Czarna M, Janska H (2013) Mitochondrial ATP-dependent proteases in protection against accumulation of carbonylated proteins. *Mitochondrion* 19: 245-251
- Major T, von Janowsky B, Ruppert T, Mogk A, Voos W (2006) Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease Pim1. *Mol Cell Biol* 26: 762-776
- Bota DA, Davies KJ (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4: 674-680
- Solheim C, Li L, Hatzopoulos P, Millar AH (2012) Loss of Lon1 in *Arabidopsis* changes the mitochondrial proteome leading to altered metabolite profiles and growth retardation without an accumulation of oxidative damage. *Plant Physiol* 160: 1187-1203
- Haynes C, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13: 467-480
- Liu L, Zhou Y, Zhou G, Ye R, Zhao L, Li X, Lin Y (2008) Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. *Plant Mol Biol* 67: 37-55
- Haynes CM, Ron D (2010) The mitochondrial UPR – protecting organelle protein Homeostasis. *J Cell Sci* 123: 3849-3855
- Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G (1994) Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* 26: 273-27637.
- Atorino I, 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 heredity spastic paraplegia. *J Cell Biol* 163: 777-787
38. Kołodziejczak M, Gibala M, Urantówka A, Jańska H (2007) The significance of *Arabidopsis* AAA proteases for activity and assembly/stability of mitochondrial OXPHOS complexes. *Physiol Plantarum* 129: 135-142
 39. Pearce DA, Sherman F (1995) Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J Biol Chem* 270: 1-4
 40. 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: 1010-1023
 41. Guelin E, Rep M, Givel LA (1996) Afg3, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease is involved in degradation of mitochondrially-encoded Cox 1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, iV and V. *FEBS Lett* 381: 42-46
 42. Baker MJ, Mooga VP, Guiard B, Langer T, Ryan MT, Stojanovski D (2012) Impaired folding of the mitochondrial small TIM chaperones induces clearance by the i-AAA protease. *J Mol Biol* 424: 227-239
 43. Potting C, Claudia W, Engmann T, Osman C, Langer T (2010) Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J* 28: 2888-2898
 44. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2014) Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1837: 408-417
 45. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, Langer T (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* 204: 919-29
 46. Granot O, Kobiler N, Melamed-Book S, Eimerl A, Bahat BL, 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: 2164-2177
 47. 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 USA* 107: 18410-18415
 48. Fischer F, Langer JD, Osiewacz HD (2015) Identification of potential mitochondrial CLPX protease interactors and substrates suggests its central role in energy metabolism. *Sci Rep* 5: 18375
 49. Stotland A, Gottlieb RA (2015) Mitochondrial quality control: easy come, easy go. *Biochim Biophys Acta* 1853: 2802-2811
 50. Jin SM, Youle RJ (2013) The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy* 9: 1750-1757
 51. Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T (2005) The m-AAA proteases defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* 123: 277-289
 52. Bonn F, Tatsuta T, Petringaro C, Riemer J, Langer T (2011) Presequence-dependent folding ensures MrpL32 processing by the m-AAA protease in mitochondria. *EMBO J* 30: 2545-2556
 53. Kołodziejczak M, Kołaczowska A, Szczyński B, Urantówka A, Knorpp C, Kieleczawa J, Jańska H. (2002) A higher plant mitochondrial homologue of the yeast m-AAA protease. Molecular cloning, localization, and putative function. *J Biol Chem* 277: 43792-43798
 54. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, Langer T (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* 204: 919-929
 55. Wang KE, Jin M, Liu X, Klionsky DJ (2013) Proteolytic processing of Atg32 by the mitochondrial i-AAA protease Yme1 regulates mitophagy. *Autophagy* 9: 1828-1836
 56. Van Dyck L, Neupert W, Langer T (1998). The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev* 12: 1515-24
 57. Tatsuta T, Nolden SM, Friedrichs B, Langer T (2007) m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. *EMBO J* 26: 325-335
 58. Rainey RN, Hsiao-Wen Chen JD, French SW, Teitell MA, Koehler CM (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: 8488-8497
 59. 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: 875-885
 60. Schreiner B, Westerburg H, Forne I, Imhof A, Neupert W, Mokranjac D (2012) Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell* 23: 4335-4346
 61. Francis BR, Thorsness PE (2011) Hsp90 and mitochondrial proteases Yme1 and Yta10/12 participate in ATP synthase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* 11: 587-600
 62. Rep M, van Dijl JM, Suda K, Schatz G, Grivell LA, Suzuki CK (1996). Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* 274: 103-106
 63. Arnould T, Michel S, Renard P (2015) Mitochondria retrograde signaling and the UPRmt: Where are we in mammals? *J Mol Sci* 16: 18224-18251
 64. Topf U, Wrobel L, Chacinska A (2016) Chatty mitochondria: keeping balance in cellular protein homeostasis. *Trends Cell Biol* doi: org/10.1016/j.tcb.2016.03.002
 65. Jovaisaite V, Mouchiroud L, Auwerx J (2014) The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *The J Exp Biol* 217: 137-143
 66. Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, Baker BM, Haynes CM (2012) Mitochondrial import efficiency of AIFs-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* 337: 587-590
 67. Ryan MT, Hoogenraad NJ (2007) Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 76: 701-722
 68. Aldridge JE, Horibe T, Hoogenraad NJ (2007) Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One* 9: e874
 69. Bennett CF, Wende HV, Simko M, Klum S, Barfield S, Choi H, Pineda V, Kaerberlein M (2013) Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Commun* 5: 3483
 70. Rainbolt TK, Atanassova N, Genereux JC, Wiseman RL (2013) Stress-regulated translational attenuation adapts mitochondrial protein import through Tim17A degradation. *Cell Metab* 18: 908-919
 71. Bella DB, 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, Mariotti C, Gellera C, Fracasso V, Magri S, Langer T, Paolo Plevani P, Di Donato S, Muzi-Falconi M (2011) Mutations in the mitochondrial protease gene *AFG3L2* cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nature Genet* 42: 313-321
 72. Pfeffer G, Gorman GS, Griffin H, Kurzawa-Akanbi M, Blakely EL, Wilson I, Sitarz K, Moore D, Murphy JL, Alston CL, Pyle A, Coxhead J, Payne B, Gorrie GH, Longman C, Hadjivassiliou M, McConville J, Dick D, Imam I, Hilton D, Norwood F, Baker MR, Jaiser SR, Yu-Wai-Man P, Farrell M, McCarthy A, Lynch T, McFarland R, Schaefer AM, Turnbull DM, Horvath R, Taylor RW, Chinnery PF (2014) Mutations in the *SPG7* gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. *Brain* 137: 1323-1336
 73. Ferreira 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: 231-242
 74. Maltecca F, Magnoni R, Cerri F, Cox GA, Quattrini A, Casari G (2009) Haploinsufficiency of *AFG3L2*, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28, causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. *J Neurosci* 29: 9244-9254

75. Almajan, ER, Richter R, Paeger L, Martinelli P, Barth E, Decker T, Larsson NG, Kloppenburg P, Langer T, Rugarli EI (2012) AFG3L2 supports mitochondrial protein synthesis and Purkinje cell survival. *J Clin Invest* 122: 4048-4058
76. Kondadi AK, Wang, Montagner S, Kladt N, Korwitz A, Martinelli P, Michael D, Baker J, Schauss AC, Langer T, Rugarli EI (2014) Loss of the *m*-AAA protease subunit AFG3L2 causes mitochondrial transport defects and tau hyperphosphorylation. *EMBO* 33: 1011-1026
77. Pierson TM, Adams D, Bonn F, Martinelli P, Cherukuri PF, Teer JK, Hansen NF, Cruz P, James C, Blakesley RW, Golas G, Kwan J, Sandler A, Fajardo K, Markello T, Tift C, Blackstone C, Rugarli RI, Langer T, Gahl WA, Toro C (2011) Whole-exome sequencing identifies homozygous AFG3L2 mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial *m*-AAA proteases. *PLoS Genet* 7: e1002325
78. Almontashiri NAM, Chen HH, Mailloux RJ, Tatsuta T, Teng ACT, Mahmoud AB, Ho T, Stewart NAS, Rippstein P, Harper ME, Roberts R, Willenborg C, Erdmann J, Pastore A, Pastore MH, Langer T, a Stewart AFR (2014) SPG7 variant escapes phosphorylation-regulated processing by AFG3L2, elevates mitochondrial ROS, and is associated with multiple clinical phenotypes. *Cell Rep* 7: 834-847
79. Wallace DC (2012) Mitochondria and cancer. *Nature Rev Cancer* 12: 685-698
80. Gibellini L, Pinti M, Boraldi F, Giorgio V, Bernardi P, Bartolomeo R, Nasi M, De Biasi S, Missiroli S, Carnevale G, Losi L, Tesi A, Pinton P, Quagliano D, Cossarizza A (2014) Silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in colon cancer cells. *FASEB J* 28: 5122-5135
81. Strauss KA, Jinks RN, Puffenberger EG, Venkatesh S, Singh K, Cheng I, Mikita N, Thilagavathi J, Lee J, Sarafianos S, Benkert A, Koehler A, Zhu A, Trovillion V, McGlincy M, Morlet T, Deardorff M, Micheil Innes a, Prasad C, Chudley AE, IR Wing I Lee, Suzuki CK (2015) CO-DAS syndrome is associated with mutations of *LONP1*, encoding mitochondrial AAA+ Lon protease. *Am. J Hum Genet* 96: 121-135
82. 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: 111-122
83. Gispert S, Parganlija D, Klinkenberg M, Dröse S, Wittig I, Mittelbronn M, Grzmil P, Koob S, Hamann A, Walter M, Büchel F, Adler T, Hrabé de Angelis M, Busch DH, Zell A, Reichert AS, Brandt U, Osiewacz HD, Jendrach M, Auburger G (2013) Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation *via* accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. *Hum Mol Genet* 22: 4871-4887
84. Jenkinson EM, Rehman AU, Walsh T, Clayton-Smith J, Lee K, Morrell 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; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Black GC, Trump D, Davis JR, Ahmad W, Leal SM, Riazuddin S, King MC, Friedman TB, Newman WG (2012) Perrault syndrome is caused by recessive mutations in *CLPP*, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am J Hum Genet* 92: 605-613
85. Cole A, Wang Z, Coyaud E, Voisin V, Gronda M, Jitkova Y, Mattson R, Hurren R, Babovic S, Maclean N, Restall I, Wang X, Jeyaraju DV, Sukhai MA, Prabha S, Bashir S, Ramakrishnan A, Leung E, Qia YH, Zhang N, Combes KR, Ketela T, Lin F, Houry WA, Aman A, Al-Awar R, Zheng W, Wienholds, Xu CJ, Dick J, Wang JC, Moffat J, Minden MD, Eaves CJ, Bader GD, Hao Z, Kornblau SM, Raught B, Schimmer AD (2015) Inhibition of the mitochondrial protease ClpP as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 27: 864-876

ATP-dependent proteases in the quality control of mitochondrial proteome

Marta Kołodziejczak , Magdalena Opalińska, Małgorzata Czarna, Hanna Jańska

University of Wrocław, Faculty of Biotechnology, 14A F. Joliot-Curie St., 50-383 Wrocław, Poland

 e-mail: marta.kolodziejczak@uwr.edu

Key words: mitochondrial proteases, AAA protease, FTSH, Lon, ClpXP, protein quality control in mitochondria

ABSTRACT

Mitochondria play the fundamental role in energy production and integration of many important metabolic and signalling pathways, which makes them essential for the function of a cell. The optimal operation of mitochondria depends on the qualitative and quantitative composition of the organellar proteins – the proteome. To maintain the homeostasis of the mitochondrial proteome, mitochondria developed a protein quality control system, which acts on the molecular, cellular and organellar levels. ATP-dependent proteases constitute a key element of this system. It consists of Lon/PIM1 and ClpXP proteases located in the mitochondrial matrix as well as AAA proteases anchored in the inner mitochondrial membrane. The ATP-dependent proteases degrade misfolded, damaged or not assembled proteins. These enzymes are also involved in complex regulatory mechanisms such as mitochondrial translation, fusion and response to stress. Lack of any of ATP-dependent proteases leads to mitochondrial dysfunction and the development of many major diseases in humans. This work summarizes the current knowledge of the ATP-dependent proteolytic system in mitochondria in different organisms.