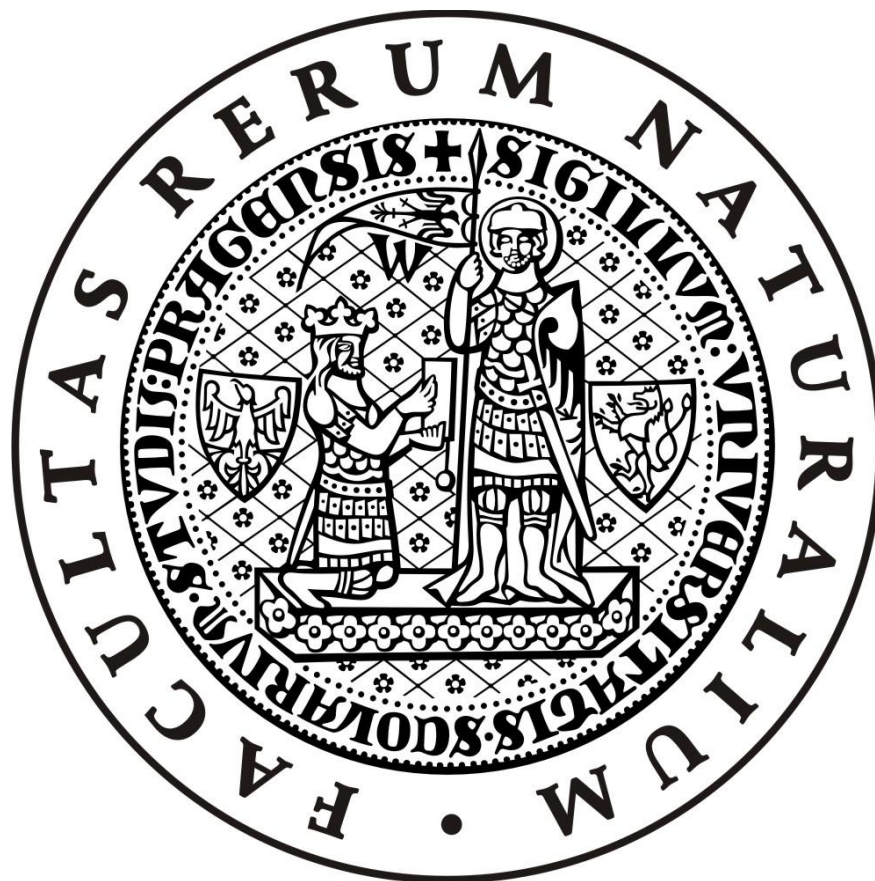


PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Katedra parazitologie



BUNĚČNÉ FUNKCE TAIL-ANCHORED PROTEINŮ

Eva Martincová

Bakalářská práce

Praha, 2010

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi Ph.D. za vstřícnost a cenné rady při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat týmu laboratoře Prof. Tachezyho za možnost účastnit se na výzkumu.

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracovala sama a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje. Souhlasím se zapůjčováním práce.

Praha 29.4.2010

.....

Eva Martincová

ABSTRAKT

Tato práce je souhrnem dosavadních poznatků o biogenezi tail-anchored proteinů. Jedná se o velmi různorodou skupinu transmembránových proteinů, jež jsou v současnosti intenzivně studovány. Tato skupina je definována na základě struktury a orientace v membráně, nesdílí tedy žádné funkční podobnosti. Jsou zde popsány jejich základní funkce, struktura a buněčná lokalizace. Důraz je kladen především na unikátní mechanismy transportu a na způsoby determinace cílových kompartmentů buňky – endomembránového systému a vnější mitochondriální membrány. Zvláštní kapitola je věnována VAP proteinům, což je konzervovaná rodina tail-anchored proteinů, vyskytující se u všech eukaryotických organismů. Závěrem jsou uvedeny výsledky a plány studia těchto proteinů u lidského parazita *Giardia intestinalis* v laboratoři zabývající se biogenezí organel.

Klíčová slova: Tail-anchored proteiny, transport, VAP

ABSTRACT

This work reviews recent studies on the biogenesis of tail-anchored proteins. These proteins form a distinct class of integral membrane proteins which are intensively studied nowadays. Although this class of proteins is defined by the structure and membrane topology, individual proteins do not share any functional similarities. The basic cellular functions, structure and localisation are reviewed there. The work is focused mainly on the unique transport mechanisms and the determination of the target cellular compartments – endomembrane system and mitochondrial outer membrane. A separate part of the work also summarizes existing knowledge about VAP protein family which belongs to the class of tail-anchored proteins and which is conserved across all eukaryotic species. The last chapter presents results and goals of the research of these proteins in the human parasite *Giardia intestinalis* in the laboratory of organellar biogenesis.

Key words: Tail-anchored proteins, transport, VAP

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1 Vezikulární transport.....	7
1.2 Regulace apoptózy	8
2. TRANSPORT.....	9
2.1 Transport do ER	10
2.1.1 SRP dráha.....	11
2.1.2 Hsp40-Hsc70 dráha	11
2.1.3 Asna-1/GET dráha.....	12
2.2 Transport do MOM	14
2.3 Transport do peroxisomů	15
2.4 Transport do subkompartmentů sekretorické dráhy.....	16
3. PROTEINOVÁ RODINA VAP.....	17
3.1 Struktura.....	18
3.2 Funkce VAPu a VAP-vazebné proteiny.....	19
3.2.1 Vazba FFAT motivu.....	19
3.2.2. Vazba SNARE proteinů a role VAPů ve vezikulárním transportu	21
3.3. VAP v Giardia intestinalis.....	23
4. ZÁVĚR.....	25
5. POUŽITÁ LITERATURA.....	26

1. ÚVOD

V každé buňce se nachází mnoho proteinů zakotvených do membrán – přibližně jedna třetina všech proteinů. Ty se třídí do skupin podle počtu transmembránových domén (TMD) a orientace v membráně. V roce 1993 byla popsána skupina proteinů zakotvených v membráně pouze jednou hydrofobní sekvencí velice blízko C-konci (přibližně 50 aminokyselin). Tato sekvence slouží nejenom jako TMD, ale zároveň i jako signální sekvence určující transport do konkrétních cílových kompartmentů (tyto proteiny tedy nemají klasické N-terminální signální peptidy). Tyto proteiny označujeme jako „tail-anchored“ (TA) (Kutay et al., 1993).

Ačkoli mají TA-proteiny jedinou TMD, nepatří do skupiny klasických membránových proteinů typu II (ty jsou definovány právě jednou TMD a orientací N-konce do cytosolu). TA-proteiny odlišuje hlavně jejich posttranslační transportní mechanismus (viz níže).

Všechny TA-proteiny mají N-terminální funkční doménu orientovanou do cytosolu, ať už se nachází v endoplazmatickém retikulu (ER), vnější mitochondriální membráně (MOM – mitochondrial outer membrane), chloroplastu nebo sekretorické dráze. V lumen organel se nachází jen několik málo aminokyselin (Kutay et al., 1993).

Díky netradičnímu mechanismu transportu a hlavně díky životně důležitým funkcím, které v buňce zastávají, se TA-proteiny těší velkému výzkumnému zájmu. Postupně je tak od roku 1993 identifikováno stále více nových proteinů tohoto typu.

V nedávné bioinformatické studii se vědci pokoušeli identifikovat všechny TA-proteiny v lidském genomu. Použili metodu pro identifikaci proteinů s jednou TMD vzdálenou max. 25 aminokyselin od C-konce a poté odstranili všechny proteiny obsahující signální peptidy. Použitím sekvencí již známých TA-proteinů zjistili výskyt jednotlivých aminokyselin v jejich TMD a na základě toho poté identifikovali proteiny s podobnou strukturou TMD. Výsledkem je okolo 400 TA-proteinů (hypotetických, známých, predikovaných i různých sestřihových variant) (**tabulka 1**) (Kalbfleisch et al., 2007). Seznam obsahuje i homology dříve nalezených proteinů u kvasinek, u kterých bylo v genomu bioinformaticky identifikováno přes 50 TA-proteinů (Beilharz et al., 2003). Výsledky různých bioinformatických studií se od sebe často mírně liší v závislosti na zvolených parametrech vyhledávání, proto tabulka neobsahuje všechny proteiny zmiňované v této práci.

TA-proteiny můžeme najít prakticky ve všech membránách buňky, kde zastávají nejrůznější funkce. Jsou například součástí translokačních kanálů v membráně ER (β , γ podjednotky Sec61 translokázy) a MOM (Tom5, Tom6) nebo představují proteiny s enzymatickou funkcí jako například cytochrom b5 nebo hemoxygenáza. Mezi nejdůležitější

funkce patří klíčová úloha ve (i) vezikulárním transportu a (ii) regulaci apoptózy (Borgese et al., 2003).

FUNKCE	PROTEIN	LOKALIZACE
vezikulární transport	t-SNARE v-SNARE	cílové membrány váčky
transport proteinů	Sec61 β , Sec61 γ VAP	ER ER
enzymatická	cytochrom b5 aldehyd dehydrogenáza monoamin oxidáza hem oxygenáza	ER/MOM ER MOM ER
regulace apoptózy	Bax Bcl-2	cytosol/MOM MOM

Tabulka 1: Nejznámější TA-proteiny identifikované v lidském genomu (Kalbfleisch et al., 2007).

1.1 Vezikulární transport

Klíčovou roli při membránových fúzích hrají TA-proteiny rodiny SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), které jsou lokalizovány na mnoha různých intracelulárních membránách. V místě fúze dochází ke tvorbě tzv. SNARE komplexu, který je tvořen specifickými SNARE proteiny z obou zúčastněných membrán. Odtud pochází původní dělení na v-SNARE (*vessicle-membrane SNARE*) a t-SNARE (*target-membrane SNARE*), podle membrány, ve které jsou ukotveny. Jejich vzájemnou interakcí dochází k těsnému přiblížení membrán a jejich následné fúzi (Jahn and Scheller, 2006).

SNARE komplex se tvoří interakcí coiled-coil domén jednotlivých proteinů a dochází tak k vytvoření svazku čtyř α -helixů (Sutton et al., 1998). Při vytváření SNARE komplexu vzniká uvnitř svazku tzv. 0-centrální iontová vrstva. Ta je tvořena třemi glutaminovými (Q) a jedním argininovým (R) zbytkem. Odtud pochází moderní dělení na Q-SNARE a R-SNARE proteiny (Fasshauer et al., 1998).

Rozpad komplexu zajišťuje ATPáza NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*). Komponenty komplexu se tak uvolňují a jsou recyklovány k dalšímu použití (Jahn and Scheller, 2006).

1.2 Regulace apoptózy

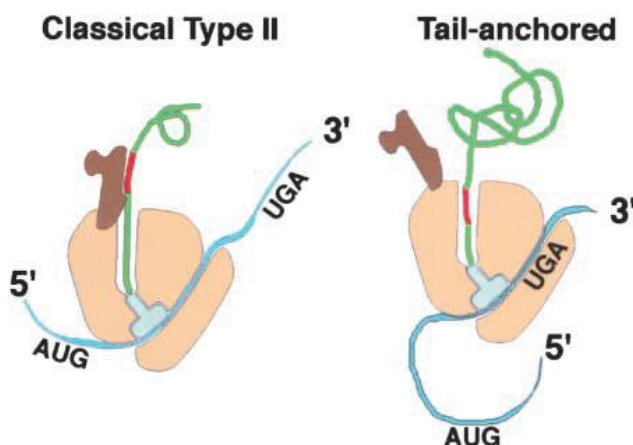
Apoptóza je proces tzv. programované buněčné smrti, kdy je buňka zevnitř degradována pomocí proteáz – kaspáz a rozložena do membránových váčků tak, že ve tkáni nezpůsobuje zánět. Tento proces je v každém organismu přísně regulovaný a klíčovou roli v něm hrají proteiny Bcl-2 rodiny, z nichž mnohé patří mezi TA-proteiny.

Do Bcl-2 rodiny jsou zahrnovány jak proteiny proapoptotické (spouští apoptózu – Bax, Bak) tak i antiapoptotické (blokuje apoptózu – Bcl2, Bcl-X_L). Bax a Bak způsobují permeabilizaci MOM a následný únik proteinů mezimembránového prostoru do cytosolu. Takovým proteinem je například cytochrom c, jehož přítomnost v cytosolu aktivuje kaspázy. Za normálních okolností je Bax volně rozpustný cytosolický protein. Do membrány se integruje až po apoptotickém stimulu, který odkryje jeho C-terminální TMD. Proapoptotické proteiny zastávají opačnou funkci tzn. udržují integritu buněčných membrán mitochondrie, ale i ER nebo jádra (Cory and Adams, 2002).

2. TRANSPORT

Většina proteinů je překládána na volných ribosomech v cytosolu a odkud transportována do jednotlivých organel – takové proteiny nesou tzv. signální peptidy. Signální peptid je krátká aminokyselinová sekvence nacházející se většinou na N-konci, která řídí transport do cílové organely, v jejímž lumen je zpravidla odštěpena. Signální peptidy transmembránových proteinů však nesou zároveň i funkci TMD, což je hydrofobní úsek, který kotví protein v membráně organely a odštěpován není. Proteiny lokalizované v ER jsou transportovány kotranslačně, do mitochondrií posttranslačně.

Transport TA-proteinů naproti tomu probíhá vždy posttranslačně. Tyto proteiny neobsahují N-terminální signální peptid, ale vnitřní signální sekvenci – TMD – blízko C-konce (Kutay et al., 1993). V průběhu syntézy proteinu je vždy část nově vznikajícího proteinu uzavřena v ribosomu, než je uvolněna do cytosolu – velká ribosomální podjednotka eukaryot takto pojme okolo 40 aminokyselin (Blobel and Sabatini, 1970). V okamžiku dosažení STOP kodónu TA-proteinu ribosomem je tedy signální sekvence stále uvnitř ribosomu, takže nemůže vázat cytosolické faktory v průběhu translace, ale až po jejím ukončení (**obrázek 1**). Proto můžeme ty proteiny, které mají mezi TMD a C-koncem méně než 50 aminokyselin (v různých zdrojích se tento počet může mírně lišit) považovat za „tail-anchored“ (Kutay et al., 1993).



Obrázek 1: Při translaci proteinu typu II je signální peptid uvolněn z ribosomu před ukončením translace (vlevo). Naopak při translaci TA-proteinu je signální peptid při ukončení translace stále uzavřen v ribosomu (vpravo). Převzato z: (Borgese et al., 2003).

TA-proteiny jsou z cytosolických ribosomů transportovány do různých organel buňky v závislosti na své TMD. Část z nich směřující do sekretorické dráhy je importována nejprve do ER a dále transportována pomocí váčků do jednotlivých endomembránových

subkompartmentů (Linstedt et al., 1995). Ukázalo se, že i peroxisomální proteiny musí být nejprve integrovány do membrány ER, a odtud teprve transportovány do organel (Elgersma et al., 1997), ačkoli diskutovaná je i přímá transportní cesta (viz níže). Nově syntetizovaný protein je tedy primárně transportován pouze do dvou buněčných kompartmentů: ER a mitochondrie.

To, které vlastnosti proteinu určují jeho cílení do konkrétních organel, bylo objasněno pokusy se savčím cytochromem b5. Dvě isoformy tohoto proteinu, které mají shodnou N-terminální doménu exponovanou do cytosolu, se vyskytují v ER a v MOM. Vytvořený chimerický protein, který obsahoval C-terminální TMD cytochromu z MOM a cytosolickou doménu proteinu z ER, byl nalezen v MOM (De Silvestris et al., 1995). Delece aminokyselin z C-konce apoptotického proteinu Bcl-2 naopak znemožnila jeho transport do MOM (Nguyen et al., 1993). Tyto výsledky naznačují funkci C-konce v rozlišení cílových membrán. Co konkrétně tedy rozhoduje o tom, jestli bude protein transportován do ER nebo MOM?

Studiem exprese mutovaných cytochromů b5 v savčích buňkách a sledováním jejich lokalizace bylo zjištěno, že důležitou roli hraje počet pozitivních nábojů obklopujících TMD. V případě, že byly odstraněny pozitivní náboje na C-konci mitochondriálního cytochromu, byl protein transportován do ER (Kuroda et al., 1998). Důležitou roli hraje také délka TMD, VAMP (vesicle associated membrane protein – jeden ze SNARE proteinů) se zkrácenou TMD byl transportován do mitochondrií místo do ER a odtud do transportních váček (Isenmann et al., 1998). Výběr cílové organely je tedy pravděpodobně určen kombinací těchto dvou vlastností. Proteiny s krátkou TMD obklopenou více pozitivně nabitými AMK jsou transportovány do MOM. Ztráta jedné z těchto dvou vlastností se projeví transportem do ER.

Transport však může kromě TMD ovlivňovat i cytosolická doména. Takovým příkladem jsou např. proteiny Golgiho aparátu (Misumi et al., 2001), nebo SNARE proteiny, které nejsou lokalizovány v jednom ze subkompartmentů, ale cyklují v rámci sekretorické dráhy (Joglekar et al., 2003).

2.1 Transport do ER

Nascentní proteiny s N-terminálním signálním peptidem pro ER jsou pomocí signal recognition particle (SRP) dopraveny k Sec61 translokáze a následně současně s probíhající translací začleněny do membrány. Protože se však signální sekvence TA-proteinů objevuje v cytosolu až po ukončení translace, je zřejmé, že se na ni SRP nemůže vázat kotranslačně.

TA-proteiny využívají více transportních drah do ER závislé na různých zdrojích energie. Doposud byly popsány tři odlišné dráhy, pro které byly identifikovány příslušné pomocné proteiny: (i) SRP dráha, (ii) Hsp40/Hsc70 dráha a (iii) Asna-1 dráha. Regulace a vzájemné interakce jednotlivých transportních drah TA-proteinů nejsou dosud známy.

2.1.1 SRP dráha

SRP váže hydrofobní TMD některých TA-proteinů (například Syb2 a Sec61 β) a transportuje je k membráně ER a to nezávisle na přítomnosti ribosomu. Pro transport je nezbytná také přítomnost SRP receptoru a GTP. SRP má však šanci se vázat pouze po krátký okamžik těsně po objevení vazebného místa v cytosolu, předtím, než je protein sbalen nebo se na něj naváží jiné cytosolické faktory (Abell et al., 2004). Navíc koncentrace SRP v cytosolu je poměrně nízká vůči koncentraci ribosomů (Raue et al., 2007). Mnoho TA-proteinů by se tak pravděpodobně nestihlo navázat na SRP. Ukázalo se však, že hydrofobní transmembránové úseky, které se ještě nacházejí uvnitř ribosomu, mohou podporovat vazbu SRP na ribosom (Berndt et al., 2009). To umožňuje rychlou vazbu SRP hned po uvolnění TMD z ribosomu. Vazba SRP hraje zřejmě roli hlavně v udržování proteinu ve správné konformaci pro jeho translokaci do membrány (Sanz and Meyer, 1988).

Mechanismy následné translokace proteinu přes membránu však zatím nebyly plně objasněny a tento proces vykazuje vlastnosti specifické pro každý TA-protein. Na rozdíl od cytochromu b5 tak např. Syb2 není schopen začlenit se do membrány tvořené pouze fosfolipidy (Brambillasca et al., 2006), vyžaduje tedy pro svou inzerci membránové receptory, ať už SRP receptor nebo další faktory.

Zdrojem energie pro SRP-zprostředkovanou dráhu je GTP. Tato dráha je však zodpovědná za integraci jen asi poloviny Syb2 *in vitro* – tento protein tak zřejmě využívá i nějakou z alternativních, ATP-dependentních drah (Abell et al., 2004).

2.1.2 Hsp40-Hsc70 dráha

Hsp40 a Hsc70 patří mezi tzv. proteiny teplotního šoku (heat shock protein – Hsp), které v buňce zastávají funkci chaperonů. Chaperony jsou proteiny, které za spotřeby ATP napomáhají ostatním proteinům zaujmout svou nativní konformaci, nebo je naopak udržují v nesbaleném stavu schopném pronikat do membrán. Mohou se tak podílet na posttranslačním transportu některých proteinů (Ngosuwan et al., 2003).

Proto se také předpokládalo, že je biogeneze většiny TA-proteinů závislá na spotřebě ATP a buněčných chaperonech (Yabal et al., 2003). Potvrdilo se, že Hsp40 a Hsc70 váží TMD

některých TA-proteinů. Za přítomnosti ATP tyto chaperony postačí pro inzerci Sec61 β do membrány ER *in vitro* (Abell et al., 2007).

Zatímco část TA-proteinů využívá tuto dráhu obligátně, druhá část je i po přidání inhibitorů Hsp40-Hsc70 vložena do cílových membrán, a je tak zřejmě schopna využít alternativní, pravděpodobně Asna-1, mechanismus inzerce (Rabu et al., 2008).

O tom, zda bude daný TA-protein substrátem právě pro Hsp40/Hsc70 dráhu rozhoduje zejména nízká hydrofobicita TMD. Proteiny s hydrofobnější TMD mohou totiž využívat i Asna1 dráhu (viz níže) (Rabu et al., 2008).

Co se děje s komplexem „TA-protein-chaperon“ přímo na membráně ER není dosud jasné, protože zde zatím nebyl identifikován žádný membránový receptor. Možné tedy je, že funkce chaperonů spočívá pouze v ochraně proti agregaci hydrofobních částí TA-proteinů a v udržování konformace schopné proniknout do membrány (Ngosuwan et al., 2003).

Cytochrom b5 je díky své TMD o nízké hydrofobitě typickým substrátem Hsp40/Hsc70 dráhy (Rabu et al., 2008) a tyto chaperony zůstávají zatím jedinými známými proteinovými faktory potřebnými k jeho integraci do membrány ER (Brambillasca et al., 2005a). Společně s velice malými nároky na koncentraci ATP pro translokaci proteinu (Yabal et al., 2003) to ukazuje na možnou neasistovanou inzerci cytochromu b5 do membrány ER (Brambillasca et al., 2006). Efektivita takové inzerce je ovlivněna fosfolipidovým složením membrány – vyšší koncentrace cholesterolu inhibují inzerci do membrán (Brambillasca et al., 2005).

2.1.3 Asna-1/GET dráha

Asna-1 patří do velké skupiny P-loop GTPáz, z nichž některé během evoluce získaly ATPázovou aktivitu a je pravděpodobně archeálního nebo archeukaryotického původu (Leipe et al., 2002).

Více hydrofobní TMD některých TA-proteinů (Sec61 β , VAMP2) interagují s Asna-1, která tak funguje jako tzv. rozpoznávací komplex TMD - proto se také označuje TRC-40, 40kD TM-recognition complex (Stefanovic and Hegde, 2007; Favaloro et al., 2008).

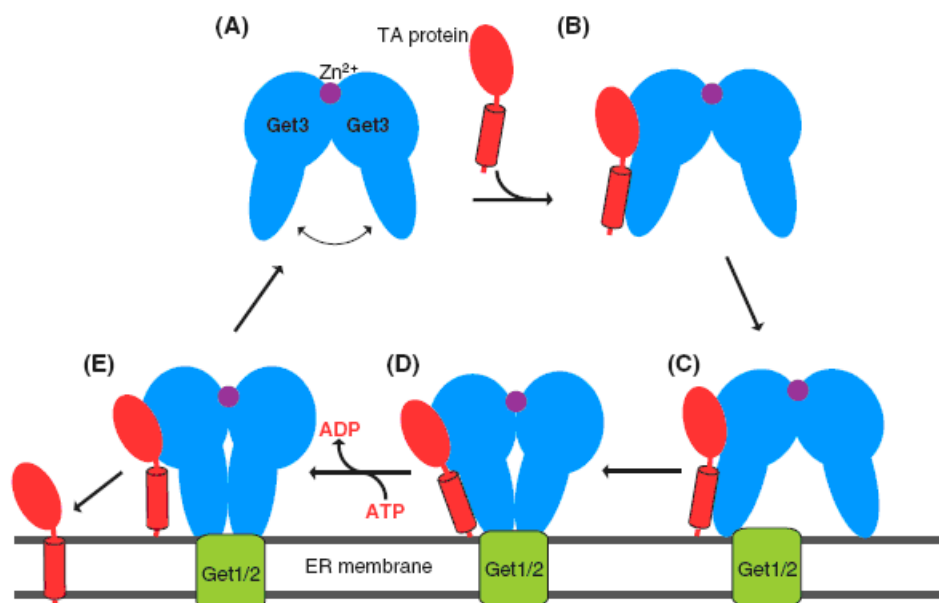
Kvasinkový homolog Asna-1 byl nazván Get3 (*Golgi-ER trafficking*), jako jeden z proteinů účastnící se sekretorické dráhy (Schuldiner et al., 2005). Spolu s dalšími proteiny tvoří GET (*guided entry of tail-anchored proteins*) dráhu nezbytnou pro biogenezi TA-proteinů (Schuldiner et al., 2008).

Get1 a Get2 jsou membránové proteiny tvořící receptor na membráně ER (Schuldiner et al., 2008), Get4 a Get5 jsou cytosolické proteiny, které tvoří společně s Get3 kvasinkový TRC

(Jonikas et al., 2009). U vyšších eukaryot zatím membránové receptory na ER nebyly nalezeny.

Umlčení genu pro Asna-1 má letální účinky v průběhu embryogeneze myši (Mukhopadhyay et al., 2006), což ukazuje na obligátní využívání Asna-1 dráhy alespoň některými TA-proteiny. Pro kvasinky však ztráta Get3 letální není, způsobuje pouze lokalizaci proteinů v mitochondriích (Schuldiner et al., 2008). Mnohobuněčné organismy tak možná vyvinuly nové TA-proteiny zcela závislé na Asna-1 dráze.

Na základě krystalické struktury bylo zjištěno, že dimer Get3 obsahuje nukleotid-vazebnou doménu a tzv. finger doménu, která obsahuje hydrofobní žlábek, kam se pravděpodobně váže TMD (zatím není známo, kolik TA-proteinů může vázat jeden Get-dimer). Pro funkci Get3 byl vytvořen model, který předpokládá, že při inzerci TA-proteinu dimer Get3 přepíná mezi otevřeným a zavřeným konformačním stavem, což umožňuje vazbu a uvolnění substrátu (Hu et al., 2009) (obrázek 2).



Obrázek 2. Model pro inzerci TA-proteinů do ER pomocí Get3 ATPázy. (A) Get3 v otevřené konformaci. (B) Navázání TA-proteinu skrz TMD. (C) Transport komplexu na membránové receptory Get1 a Get2. (D) Uzavřená konformace stimuluje hydrolýzu ATP. (E) ATP hydrolýza způsobuje uvolnění proteinu z komplexu a následnou inzerci do membrány. Převzato z: (Yamagata et al., 2010).

2.2 Transport do MOM

Většina mitochondriálních proteinů je kódována v jádře, odkud je posttranslačně transportována do mitochondrie. V membráně mitochondrií jsou zakotveny komplexy proteinů zajišťující import do mitochondriální matrix, případně inzerce do vnitřní či vnější membrány a mezimembránového prostoru. Jsou to TOM (*translocase of the mitochondrial outer membrane*) a TIM (*translocase of the mitochondrial inner membrane*) komplexy, SAM (*sorting and assembly machinery*) komplex a PAM (*presequence translocase associated motor*) komplex (Balsera et al., 2009).

Asi polovina proteinů směřujících do mitochondrie obsahuje N-terminální signální peptidy pro transport do matrix, které jsou rozpoznávány TOM receptory (Tom70, Tom20) a po průniku do matrix odštěpeny specifickými peptidázami. Ostatní proteiny obsahují interní cílové sekvence často umístěné v TMD (Balsera et al., 2009).

Ačkoliv vlastnosti TA-proteinů důležité pro transport do mitochondrie byly dobře popsány – krátká a méně hydrofobní sekvence obklopená pozitivně nabitými aminokyselinami (Kuroda et al., 1998; Isenmann et al., 1998), mechanismus inzerce do MOM zůstává nejasný. Dosud publikované studie podávají často rozporuplné výsledky. Nejvíce diskutovanou otázkou je případná účast TOM komplexu na translokaci TA-proteinů.

Import některých savčích TA-proteinů (Bak, Bcl-XL, Omp25) využívá dráhu zcela nezávislou na TOM komplexu a probíhá dokonce i při absenci ostatních cytosolických proteinů. Ty pouze transport usnadňují, což může být způsobeno faktory napomáhajícími správnému sbalení N-terminálních funkčních domén (Setoguchi et al., 2006). Import Fis1 (protein účastnící se mitochondriálního dělení) je také nezávislý na TOM komplexu a je pravděpodobně ovlivněn složením membrány. Mitochondriální membrána kvasinek obsahuje oproti ostatním buněčným membránám málo ergosterolu, což způsobuje vyšší fluiditu a urychluje zabudování proteinů do membrány (Kemper et al., 2008).

Receptorem pro import Bcl-2 je Tom20, který rozpoznává jeho TMD. Bcl-2 ale neinteraguje s dalšími TOM proteiny tvořícími translokační kanál, takže jím pravděpodobně neprochází a je vkládán do membrány přímo (Motz et al., 2002). Nelze ovšem vyloučit, že pro svou inzerce vyžaduje nějaké další, dosud neznámé proteiny.

Proapoptotický protein Bax využívá jako receptor pro import do MOM protein Tom22, jeden z proteinů tvořících hlavní importní komplex přes vnější membránu. Přidáním protilátek proti Tom22 byla zastavena translokace Bax a Bax-indukovaná apoptóza. Tom22 však

překvapivě neváže TMD Baxu, ale α -helixy v rámci jeho cytosolické domény. To ukazuje na účast N-terminální domény při transportu některých TA-proteinů (Bellot et al., 2007).

Zdá se tedy, že ani pro import TA-proteinů do mitochondrií neexistuje jedna obligátní dráha a pokud využívají TOM komplex, tak ne všechny stejným způsobem. Je tak třeba identifikovat další konkrétní molekuly účastnící se těchto procesů.

2.3 Transport do peroxisomů

Peroxisomální proteiny jsou nazývány peroxiny (Pex) a jsou transportovány do lumen nebo do membrány peroxisomů. Transmembránové proteiny nesou tzv. PTS (peroxisomal targeting sequence) sekvenci, jež zahrnuje TMD a vazebné místo pro Pex19 (který funguje jako cytosolický chaperon a zároveň jako receptor pro import). Některé transmembránové proteiny jsou však nejprve importovány do ER, kde se tvoří peroxisomální váčky *de novo*. Pex19 tedy směřuje cílové proteiny buď přímo do peroxisomu, nebo do ER. Pex19 je poté na membránách rozpoznáván proteinem Pex3 (Platta and Erdmann, 2007).

Pro cestu TA-proteinů z ER do peroxisomů rozhoduje pozitivně nabitá vnitřní sekvence poblíž C-konce (Mullen and Trelease, 2000). To znamená, že TA-proteiny, které jsou nejprve podle své hydrofobní sekvence transportovány do ER musí poté projít roztříděním do jednotlivých částí endomembránového systému (Beilharz et al., 2003). Například kvasinkový Pex15 obsahuje TMD, pomocí níž je transportován do ER, což dokazuje O-glykozylace C-konce proteinu. Jeho overexprese navíc způsobuje proliferaci ER. Na C-konci se nachází i PTS, která se překrývá TMD. Pex15 tak pravděpodobně využívá oba výše zmíněné způsoby transportu (Elgersma et al., 1997).

Savčí homolog kvasinkového Pex15 (Pex26) obsahuje dvě vazebná místa pro Pex19, z nichž jedno se překrývá s TMD a druhé se nachází na C-konci. Ztrátou druhého vazebného místa nebo odstraněním Pex19 z buněk došlo k narušení transportu do peroxisomů. To dokazuje, že alespoň některé TA proteiny mohou využívat stejnou transportní cestu jako klasické proteiny s PTS adresou (Halbach et al., 2006). Původní představu o transportu Pex15 přes ER (Elgersma et al., 1997) autor vyvrací tím, že overexpresí proteinu mohlo dojít k saturaci Pex19 receptoru (Halbach et al., 2006). Přímý transport z cytosolu a využití Pex19 byl ověřen i u peroxisomálního proteinu Fis1, který je stejně jako u mitochondrie zodpovědný za dělení organely (Delille and Schrader, 2008).

2.4 Transport do subkompartmentů sekretorické dráhy

Proteiny importované do ER jsou zde buď zadrženy, nebo transportovány sekretorickou drahou do dalších kompartmentů. Střední hydrofobicita TMD je rozhodujícím kritériem pro zadržení proteinu v ER, případně na jeho návrat z *cis*-Golgi (Pedrazzini et al., 2000, Bulbarelli et al., 2002). Prodloužení TMD cytochromu b5 tak způsobuje změnu lokalizace z ER na plasmatickou membránu (Pedrazzini et al., 1996). Částečnou roli však mohou hrát také interakce proteinů s lipidy membrán sekretorické dráhy (Ceppi et al., 2005).

Uměle vytvořené fluorescenční proteiny s různou délkou TMD (17AMK FP-17, 22AMK FP-22) byly transportovány na různé membrány. FP-17 do ER a FP-22 na plasmatickou membránu. Ukázalo se tak, že ke třídění proteinů dochází už v rámci ER, pravděpodobně v závislosti na složení fosfolipidů v jednotlivých částech ER – FP-17 byl eliminován z tzv. ER exit sites (část ER, kde se odštěpují váčky), zatímco FP-22 tam byl cíleně transportován (Ronchi et al., 2008).

Při zadržování proteinů v Golgi hraje důležitou roli i sekvence v cytosolické doméně přilehlá k TMD (Misumi et al., 2001). Na transportu Rbet1 proteinu (ER/Golgi SNARE) se podílí SNARE motiv, který pravděpodobně interaguje s plášťovými proteiny váčků (Joglekar et al., 2003).

3. PROTEINOVÁ RODINA VAP

VAPy jsou rodina TA-proteinů vyskytující se u všech dosud zkoumaných eukaryotických organismů. První takový protein byl objeven u mořského plže *Aplysia californica* jako protein vážící VAMP (vesicle-associated membrane protein) při uvolňování neurotransmiteru na nervových synapsích – odtud název VAP-33 (33kDa VAMP-associated protein) (Skehel et al., 1995). VAMP je typickým SNARE proteinem, který na plasmatické membráně v nervové synapsi tvoří komplex se dalšími dvěma SNARE proteiny (SNAP-25, syntaxin), a zajišťuje tak dostatečné přiblížení membrán při jejich splynutí (Sollner et al., 1993). Kvasinkový VAP-33 homolog byl nazván SCS2 (Kagiwada et al., 1998), lidské homology pak VAP-A a VAP-B (identický s VAP-A z 63%) a VAP-C, což je sestřižená varianta VAP-B postrádající C-terminální doménu (Nishimura et al., 1999).

Postupným studiem funkce VAPů bylo zjištěno, že tyto proteiny interagují s mnoha dalšími proteiny a účastní se řady rozličných buněčných funkcí jako např. membránový transport (Soussan et al., 1999), interakce membrán s mikrotubuly (Skehel et al., 2000), transport lipidů (Kawano et al., 2006) a metabolismus lipidů (Kagiwada and Zen, 2003) a tzv. „unfolded protein response“ (UPR) (Brickner and Walter, 2004), což je stresová dráha, která se v buňce spouští při nadbytku špatně sbalených proteinů. To ale nutně neznamená, že konkrétní homolog VAP proteinu zastává všechny tyto odlišné funkce – ty byly totiž popsány na různých buněčných typech a různých organismech a mohou pouze odrážet specifické vlastnosti daných buněk.

Ačkoli jsou VAPy označovány jako integrální proteiny ER (Skehel et al., 2000), byly nalezeny byly i v jiných buněčných kompartmentech: v časné sekretorické dráze – mezi ER a Golgi (Soussan et al., 1999), v tight junctions (těsné spoje) (Lapierre et al., 1999) i v nervosvalových spojích octomilky (Pennetta et al., 2002) Vyskytují se i na plasmatické membráně, kde se podílí na transportu GLUT-4 insulin-dependentního glukózového transportéru (Foster et al., 2000).

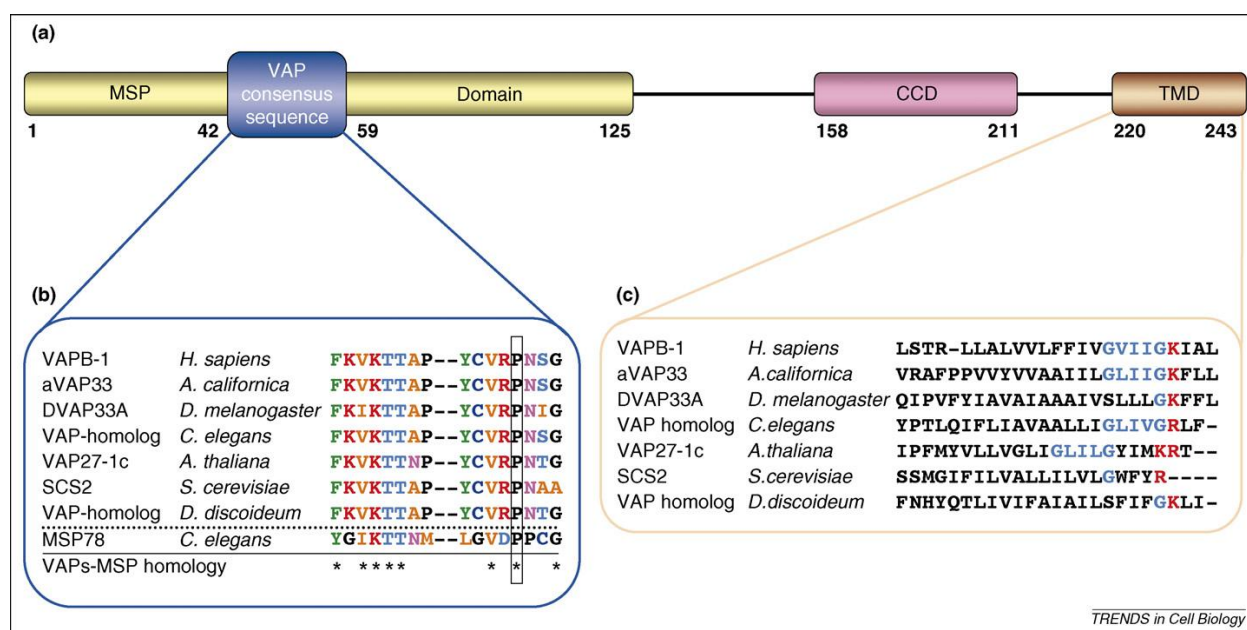
ER tvoří systém tubulů rozprostírající se po celé buňce. Membrány ER jsou také v kontaktu s membránami ostatních organel (Voeltz et al., 2002). V těchto místech se membrány nachází velice blízko sebe a pravděpodobně zde probíhá transport menších molekul, jako jsou Ca^{2+} a lipidy – ty se přenášejí pomocí LTPs (lipid transfer proteins) (Levine and Loewen, 2006). VAPy, které specificky váží několik takových LTPs (viz níže), se vyskytují právě v místech těsného kontaktu organel.

3.1 Struktura

VAPy obsahují tři konzervované domény. Major sperm protein (MSP) doménu, centrální coiled-coil doménu (CCD) a TMD na C-konci (Weir et al., 1998). (obrázek 3)

MSP je protein zodpovědný za motilitu spermií nematod. Ty nemají bičík, ale pohybují se amébovitě pomocí polymerace MSP (Roberts, 2005). MSP doména je součástí mnoha proteinů, kde zajišťuje protein-proteinové interakce (Tarr and Scott, 2005), mohla by se tak podílet i na oligomerizaci VAPů. Všechny VAPy mají v rámci MSP konzervovanou 16-ti aminokyselinovou sekvenci (tzv. VAP consensus sequence) (Kagiwada et al., 1998). Jedna záměnová mutace VAPu-B v této sekvenci z P56 na S56 způsobuje u člověka poruchu motorických nervů (Nishimura et al., 2004).

CCD je α -helikální doména schopná tvořit coiled-coil struktury. VAPy obsahují CCD (Nishimura et al., 1999) podobnou konzervované SNARE doméně (Weimbs et al., 1997).



Obrázek 3. (a) Domény VAPů: MSP, CCD a C-terminální TMD. (b) Konzervovaná VAP sekvence, zbytky konzervované mezi VAPy a MSP jsou označeny hvězdičkou. Záměna v prolínu na pozici 56 za serin ve VAP-B způsobuje poruchu motorických nervů. (c) Málo konzervovaná hydrofobní TMD obsahující GxxxG dimerizační motiv. Převzato z: (Lev et al., 2008).

3.2 Funkce VAPu a VAP-vazebné proteiny

VAP interaguje s mnoha proteiny v buňce (**obrázek 4**), podle kterých byly také určeny jeho funkce. Vazebné proteiny lze rozdělit do tří skupin: (i) FFAT motiv obsahující proteiny (zahrnující proteiny účastnící se metabolismu a transportu lipidů, proteiny účastnící se UPR interakcí s mikrotubuly), (ii) SNARE proteiny (vezikulární transport) a (iii) virové proteiny (kterými se v této práci nebudeme zabývat).

3.2.1 Vazba FFAT motivu

FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) motiv byl objeven v proteinu Opi1, který reguluje biosyntézu fosfolipidů v kvasinkách. Tento motiv se skládá ze dvou fenylalaninů obklopených kyselými aminokyselinami a je typický pro mnoho LTP. VAP váže konkrétní sekvenci EFFDaxE (Glu, Phe, Phe, Asp, Ala, x, Glu) cílových proteinů. Tato sekvence může být u některých homologů pozměněná, Aspartát na pozici 4 je však nezaměnitelný stejně jako přítomnost okolních kyselých aminokyselin (Loewen et al., 2003).

Vazebné místo pro FFAT motiv je pozitivně nabitá oblast na povrchu VAPu, nachází se uvnitř MSP domény v rámci vysoce konzervované sekvence pro VAPy, nikoli však pro další proteiny obsahující MSP doménu. Krystal FFAT-VAP komplexu se skládá ze dvou MSP domén, mezi nimiž jsou vázané dva FFAT motivy. Na dimerizaci se pravděpodobně podílí jak coiled-coil doména VAPu (Kaiser et al., 2005), tak GxxxG motiv v TMD, který zajišťuje interakci transmembránových α -helixů (Russ and Engelman, 2000).

3.2.1.1 Metabolismus a transport lipidů

Přítomnost FFAT motivu a následně i fyzická interakce s VAPem byla prokázána u mnoha proteinů ovlivňujících metabolismus lipidů, jako například s OSBP (*oxysterol-binding protein*) (Wyles et al., 2002), CERT (*ceramide transport protein*) (Kawano et al., 2006) a Nir2 (fosfatidylinositol/fosfatidylcholin-transfer protein) (Amarilio et al., 2005).

Vazba FFAT motivu slouží k transportu a lokalizaci LTP na membránu ER (Loewen et al., 2003), kde se na cytosolické straně odehrává metabolismus lipidů.

U kvasinek se protein Scs2 účastní i regulace metabolismu fosfatidylinositolu. Kvasinky s mutovaným *SCS2* genem vykazují nízkou expresi *INO1*, což je gen kódující inositol-1-fosfát syntázu (IPS – enzym nezbytný pro syntézu fosfatidylinositolu *de novo*). To se projeví nízkou hladinou fosfatidylinositolu a naopak zvýšenou hladinou fosfatidylcholinu v buňce. Scs2

tak přispívá k regulaci metabolismu fosfolipidů skrze regulaci exprese *INO1* a skrze regulaci syntézy fosfatidylcholinu (Kagiwada and Zen, 2003). Scs2 reguluje expresi *INO1* skrze vazbu na Opi1.

Scs2 lokalizuje Opi1 v membráně ER. Snížení hladiny Scs2 tak způsobuje, že se Opi1 vyvazuje z ER a je transportován do jádra, kde působí jako transkripční faktor a reprimuje *INO1* gen (Loewen et al., 2003). Scs2 má v rámci MSP také vazebnou doménu pro fosfatidylinositol monofosfát a bifosfát a tato doména se pravděpodobně překrývá s FFAT motiv vazebnou doménou. Při zvýšené hladině fosfatidylinositolu tak dochází k blokaci FFAT vazebné domény v Scs2 a zabránění navázání Opi1 – ten je tak transportován do jádra, kde snižuje expresi *INO1* a tím i syntézu fosfatidylinositolu *de novo* (Kagiwada and Hashimoto, 2007).

3.2.1.2 Unfolded protein response

Homeostáze v rámci ER je nezbytná pro správné fungování každé buňky, proto je syntéza ER-rezidentních proteinů přísně regulovaná. Hromadění špatně složených proteinů v lumen ER tak způsobuje zvýšenou transkripci endoplazmatických chaperonů, které napomáhají správnému sbalení proteinů (Zhang and Kaufman, 2006).

U kvasinek je jedna z takových stresových drah zprostředkovaná aktivací Ire1 (*inositol-requiring enzyme 1* – transmembránová kináza a ribonukleáza v ER). Ire1 má vnitřní N-terminální sekvenci, která slouží k rozpoznání stresového signálu a C-terminální cytoplasmatickou s endonukleázovou aktivitou, která způsobuje sestřih Hac1 mRNA. Hac1 je transkripční faktor, který aktivuje transkripci mnoha cílových genů podílejících se na UPR (Zhang and Kaufman, 2006).

UPR je v kvasinkách je kromě nerovnováhy v ER spouštěna také nedostatkem volného inositolu v buňce a protože UPR a dráha pro regulaci syntézy fosfatidylinositolu sdílí některé komponenty (Ire1, Hac1) (Cox et al., 1997), je zřejmé, že se Scs2 skrze vazbu na Opi1 podílí také na regulaci UPR.

Roli Scs2 v UPR potvrzují i studie kvasinkových mutantů. Expres *SCS2* genu potlačuje poškození buňky způsobené defektem *INO1* exprese (Nikawa et al., 1995). Kvasinky s mutovaným *SCS2* genem jsou vnímavé vůči účinku tunicamycinu, který vyvolává UPR (Kagiwada et al., 1998).

3.2.1.3 Interakce s mikrotubuly

Interakce VAPů s mikrotubuly byla pozorována především při fluorescenčních pokusech, kde byla patrná kolokalizace. Molekulární podstata těchto interakcí však zatím není příliš jasná.

Schopnost VAPů vázat se na mikrotubuly je nezbytná pro udržování organizace buněčných organel. U octomilky je VAP lokalizován na plasmatické membráně presynaptických zakončení, kde váže mikrotubuly. Působí patrně jako signál pro tvorbu presynaptických zakončení a udržuje v nich správnou organizaci cytoskeletu (Pennetta et al., 2002). Myší VAP lokalizovaný na membráně ER interaguje s mikrotubuly a může se tak podílet na samotné organizaci ER v buňce (Skehel et al., 2000).

VAP-B mění organizaci ER pomocí své vazby na FFAT motiv Nir proteinů. Kooverexprese VAP-B a Nir3 způsobila viditelnou přestavbu ER a seskupování mikrotubulů okolo membrán ER. Nir3 buď zvyšuje afinitu VAPu k mikrotubulům, nebo danou vazbu přímo zprostředkovává. Co-overexprese s Nir2 se projevila akumulací váček ER – Nir2/VAP-B komplexy tak pravděpodobně způsobují těsné přiblížení membrán (Amarilio et al., 2005). Nir2 a Nir3 patří do stejné rodiny proteinů, ale liší se svou tkáňovou lokalizací (Lev, 2004). To jen dokazuje funkční různorodost homologů VAPu v závislosti na buněčném typu. Overexprese VAP-A mutanta s nefunkční FFAT vazebnou doménou narušila organizaci ER (Kaiser et al., 2005).

3.2.2. Vazba SNARE proteinů a role VAPů ve vezikulárním transportu

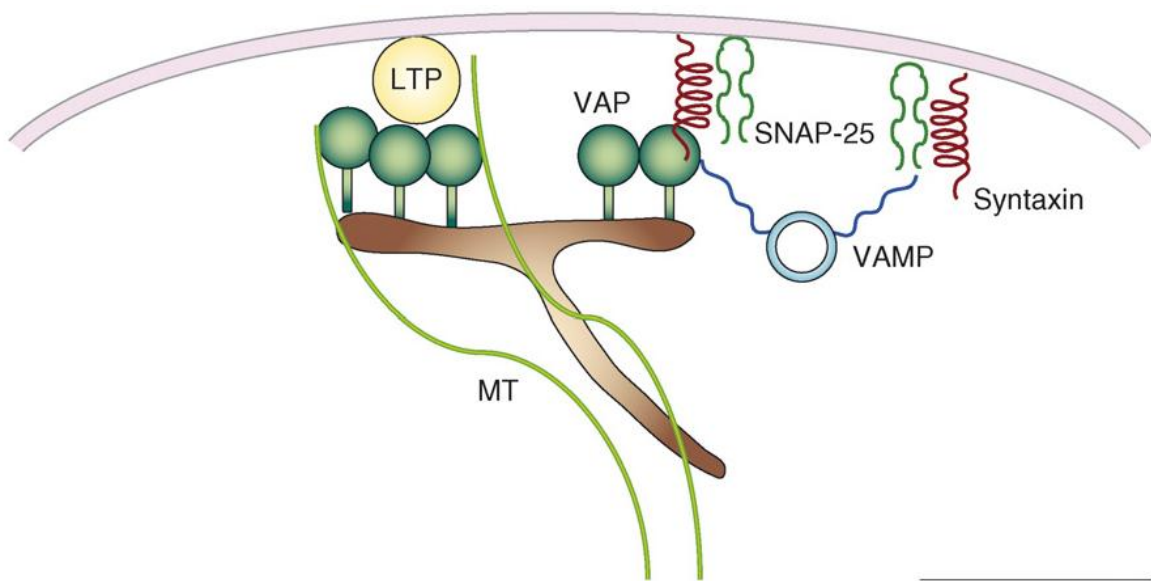
Kromě VAMP (viz výše) váže VAP mnoho jiných SNARE proteinů, které jsou zodpovědné za naprostou většinu membránových fúzí v eukaryotické buňce. VAPy se tak podílejí i na membránovém transportu. Řada prací ukazuje na konkrétní vezikulární defekty způsobené nedostatkem VAPu, obvykle však bez jasného molekulárního pozadí.

Například přidání VAP-33 protilátek do presynaptických neuronů inhibuje uvolňování neurotransmiteru u mlže *Aplysia californica* (Skehel et al., 1995) a protilátky proti ERG30 (kryší homolog VAP-33) inhibují transport v rámci Golgi a způsobují hromadění COPI váček (Soussan et al., 1999) odpovědných za retrogradní transport proteinů.

V epiteliálních buňkách se VAP-A nachází nejen ve váčcích, ale kolokalizuje také s ocludinem v „tight-junctions“, kde buď reguluje transport ocludinu do těchto spojů, nebo naopak využívá ocludin jako marker pro vezikulární transport (Lapierre et al., 1999). V nepolarizovaných buňkách VAP interaguje se SNARE proteiny Rbet1 a Rsec22, které se

podílí na transportu mezi ER a Golgi, dále váže α -SNAP a NSF (cytosolické proteiny nezbytné pro funkci SNARE komplexu) a syntaxin (SNARE protein plasmatické membrány) (Weir et al., 2001).

Konkrétní funkce VAPů při vezikulárním transportu není zatím objasněna. Mohly by hrát podobnou úlohu jako při interakcích s LTP, to znamená zajištění správné lokalizace konkrétních SNARE na cílové membrány. Možná je ovšem i pomocná funkce při tvorbě SNARE komplexu.



TRENDS in Cell Biology

Obrázek 4: Možné funkce VAPu v kontaktních místech organel (PM-fialová, ER-hnědá). Je zde vidět vazba LTP a úloha VAPu v transportu lipidů, vazba transportních váčků skrze interakci s VAMP. Vazba na mikrotubuly určuje organizaci membrán. Převzato z: (Lev et al., 2008).

3.3. VAP v *Giardia intestinalis*

G. intestinalis je běžně se vyskytující lidský parazitický prvok (Diplomonadida, Excavata), který žije ve střevě a způsobuje průjmové onemocnění giardiózu. Přenos je fekálně-orální, nejčastějším způsobem nákazy je konzumace kontaminované vody (díky odolnosti cyst vůči chlóru) v zemích s horšími hygienickými podmínkami. Tento dvoujaderný bičíkatý prvok byl pozorován již roku 1681 Antoniem Van Leeuwenhoekem (Ali and Hill, 2003).

G. intestinalis má jednohostitelský cyklus, kde se střídá stadium infekční cysty a trofozoita. Po požití cysty potenciálním hostitelem přichází cysta do žaludku, jehož kyselé prostředí indukuje excystaci. Z každé takové cysty vznikají dva trofozoiti, kteří putují dále do duodena a proximálního jejunu na jejichž stěnu se přisají pomocí ventrálního disku. Zde také dochází k rozmnožování pomocí binárního dělení. Tvoří se zde cysty, které ven odchází trávicím traktem (Kucik et al., 2004).

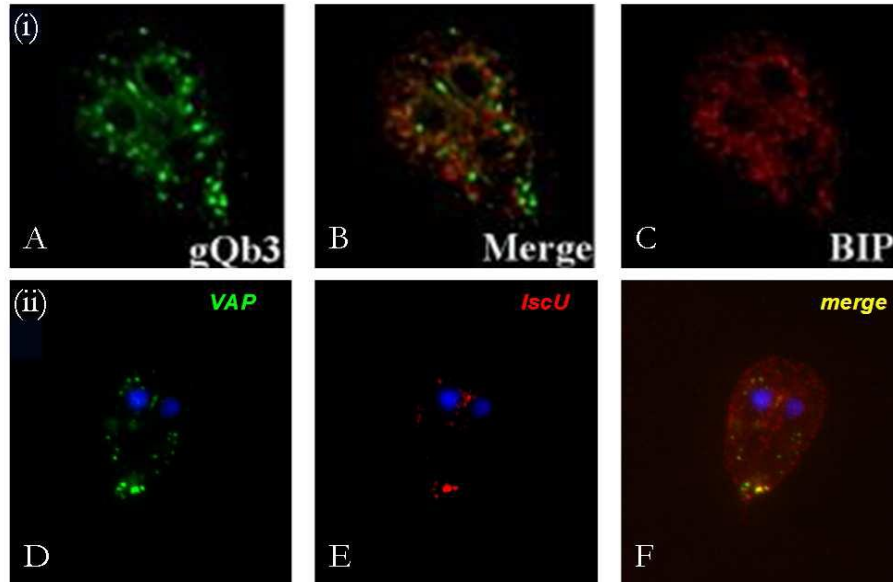
G. intestinalis byla dlouho řazena mezi tzv. „amitochondriální“ eukaryota, dokud u ní nebyly nalezeny váčky obalené dvěma membránami – tzv. mitosomy. Jsou to organely odvozené od mitochondrií, které zcela ztratily svůj genom a nehrají úlohu v produkci ATP. Jedinou dosud zjištěnou funkcí je biosyntéza FeS center (Tovar et al., 2003).

Přestože buňky trofozoitů nemají Golgiho aparát, bylo v nich experimentálně lokalizováno 17 SNARE proteinů. Pro jeden z těchto proteinů, Q-SNARE (Sec20), byla překvapivě navržena mitosomální distribuce (**Obrázek 5**). Buňky s knock-downovaným genem pro tento SNARE byly neživotaschopné, což znamená, že jeho funkce je pro buňku esenciální (Elias et al., 2008). Mitochondrie však nejsou součástí endomembránového systému a dosud nebyla pozorována jejich fúze s transportními váčky. Jediným známým SNARE proteinem, který byl lokalizován v mitochondrii je jedna ze sestřihových variant lidského proteinu VAMP1 (Isenmann et al., 1998).

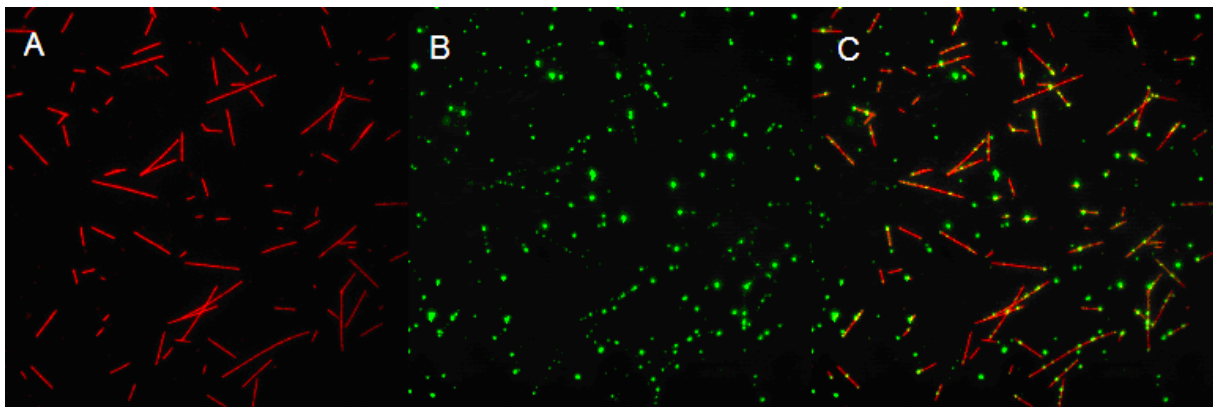
Sec20 je SNARE protein účastnící se transportu váček mezi Golgi a ER (Sweet and Pelham, 1992). Jeho přítomnost v mitosomu je tedy velmi překvapivá a není jasné, jakou zde zastává funkci. Kromě Sec20 je do mitosomů transportován i nově objevený homolog VAPu (**Obrázek 5**), jehož funkci v současnosti sledujeme. Naše předběžné *in vitro* pokusy ukázaly, že je schopen vazby na izolované mikrotubuly (**Obrázek 6**).

Cílem naší další experimentální práce je pokusit se zodpovědět na tyto otázky: (i) interagují spolu tyto dva mitosomální TA- proteiny – tj. Sec20 a VAP? (ii) hrají nějakou

úlohu v biogenezi mitosomů? A zejména (iii) svědčí přítomnost těchto proteinů o funkčním začlenění mitosomů do endomembránového systému *G. intestinalis*?



Obrázek 5: (i) Lokalizace Sec20 u *G. Intestinalis*. A – Sec20, C – ER marker, B – překryv A a C. Převezato z: (Elias et al., 2008). (ii) Lokalizace VAP u *G. Intestinalis*. D – VAP, E – mitosomální marker, F – překryv D a E (nepublikováno, Pavel Doležal)



Obrázek 6: TIRF (*Total internal reflection fluorescence microscope*) analýza vazebných vlastností VAPu z *G. intestinalis*. Fluorescenčně značené mikrotubuly (A) byly inkubovány *in vitro* s VAPem, který namísto C-terminální TMD obsahoval GFP (B). Překryv (C) ukazuje specifickou kolokalizaci VAPu a mikrotubulů. (nepublikováno, Pavel Doležal)

4. ZÁVĚR

Práce je přehledem dosavadních poznatků o biogenezi tail-anchored proteinů a stručně popisuje jejich buněčné funkce. Shrnuje navrhované transportní dráhy do buněčných kompartmentů a jejich využití dle vlastností konkrétních proteinů. Zároveň poukazuje na dosud nezodpovězené otázky ohledně regulace těchto drah a na potřebu jejich dalšího studia. Dále je práce zaměřená na proteiny rodiny VAP a jejich funkce v různých organismech. Z dosud publikovaných studií vyplývá, že tyto proteiny zastávají velice rozmanité funkce, není ovšem jasné, zda nejde pouze o odraz studia rozdílných buněčných typů. V závěru práce jsou navrženy možné funkce VAPu lokalizovaného v mitosomu lidského jednobuněčného prvoka *Giardia intestinalis*.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- Abell,B.M., Pool,M.R., Schlenker,O., Sinning,I., and High,S. (2004). Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J.* 23, 2755-2764.
- Abell,B.M., Rabu,C., Leznicki,P., Young,J.C., and High,S. (2007). Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J. Cell Sci.* 120, 1743-1751.
- Ali,S.A. and Hill,D.R. (2003). *Giardia intestinalis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 453-460.
- Amarilio,R., Ramachandran,S., Sabanay,H., and Lev,S. (2005). Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J. Biol. Chem.* 280, 5934-5944.
- Balsera,M., Soll,J., and Bolter,B. (2009). Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1903-1923.
- Beilharz,T., Egan,B., Silver,P.A., Hofmann,K., and Lithgow,T. (2003). Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 8219-8223.
- Bellot,G., Cartron,P.F., Er,E., Oliver,L., Juin,P., Armstrong,L.C., Bornstein,P., Mihara,K., Manon,S., and Vallette,F.M. (2007). TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death. Differ.* 14, 785-794.
- Berndt,U., Oellerer,S., Zhang,Y., Johnson,A.E., and Rospert,S. (2009). A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 1398-1403.
- Blobel,G. and Sabatini,D.D. (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J. Cell Biol.* 45, 130-145.
- Borgese,N., Colombo,S., and Pedrazzini,E. (2003). The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J. Cell Biol.* 161, 1013-1019.
- Brambillasca,S., Yabal,M., Makarow,M., and Borgese,N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J. Cell Biol.* 175, 767-777.
- Brambillasca,S., Yabal,M., Soffientini,P., Stefanovic,S., Makarow,M., Hegde,R.S., and Borgese,N. (2005). Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J.* 24, 2533-2542.
- Brickner,J.H. and Walter,P. (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol.* 2, e342.
- Bulbarelli,A., Sprocati,T., Barberi,M., Pedrazzini,E., and Borgese,N. (2002). Trafficking of tail-anchored proteins: transport from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and sorting between surface domains in polarised epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 1689-1702.
- Ceppi,P., Colombo,S., Francolini,M., Raimondo,F., Borgese,N., and Masserini,M. (2005). Two tail-anchored protein variants, differing in transmembrane domain length and intracellular sorting, interact differently with lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 16269-16274.
- Cory,S. and Adams,J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647-656.
- Cox,J.S., Chapman,R.E., and Walter,P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* 8, 1805-1814.
- De Silvestris,M., D'Arrigo,A., and Borgese,N. (1995). The targeting information of the mitochondrial outer membrane isoform of cytochrome b5 is contained within the carboxyl-terminal region. *FEBS Lett.* 370, 69-74.

- Delille,H.K. and Schrader,M. (2008). Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p. *J. Biol. Chem.* 283, 31107-31115.
- Elgersma,Y., Kwast,L., van den Berg,M., Snyder,W.B., Distel,B., Subramani,S., and Tabak,H.F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 16, 7326-7341.
- Elias,E.V., Quiroga,R., Gottig,N., Nakanishi,H., Nash,T.E., Neiman,A., and Lujan,H.D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 283, 35996-36010.
- Fasshauer,D., Sutton,R.B., Brunger,A.T., and Jahn,R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15781-15786.
- Favaloro,V., Spasic,M., Schwappach,B., and Dobberstein,B. (2008). Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins. *J. Cell Sci.* 121, 1832-1840.
- Foster,L.J., Weir,M.L., Lim,D.Y., Liu,Z., Trimble,W.S., and Klip,A. (2000). A functional role for VAP-33 in insulin-stimulated GLUT4 traffic. *Traffic.* 1, 512-521.
- Halbach,A., Landgraf,C., Lorenzen,S., Rosenkranz,K., Volkmer-Engert,R., Erdmann,R., and Rottensteiner,H. (2006). Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J. Cell Sci.* 119, 2508-2517.
- Hu,J., Li,J., Qian,X., Denic,V., and Sha,B. (2009). The crystal structures of yeast Get3 suggest a mechanism for tail-anchored protein membrane insertion. *PLoS. One.* 4, e8061.
- Isehnann,S., Khew-Goodall,Y., Gamble,J., Vadas,M., and Wattenberg,B.W. (1998). A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal. *Mol. Biol. Cell* 9, 1649-1660.
- Jahn,R. and Scheller,R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631-643.
- Joglekar,A.P., Xu,D., Rigotti,D.J., Fairman,R., and Hay,J.C. (2003). The SNARE motif contributes to rbt1 intracellular targeting and dynamics independently of SNARE interactions. *J. Biol. Chem.* 278, 14121-14133.
- Jonikas,M.C., Collins,S.R., Denic,V., Oh,E., Quan,E.M., Schmid,V., Weibezahn,J., Schwappach,B., Walter,P., Weissman,J.S., and Schuldiner,M. (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 323, 1693-1697.
- Kagiwada,S. and Hashimoto,M. (2007). The yeast VAP homolog Scs2p has a phosphoinositide-binding ability that is correlated with its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 870-876.
- Kagiwada,S., Hosaka,K., Murata,M., Nikawa,J., and Takatsuki,A. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J. Bacteriol.* 180, 1700-1708.
- Kagiwada,S. and Zen,R. (2003). Role of the yeast VAP homolog, Scs2p, in INO1 expression and phospholipid metabolism. *J. Biochem.* 133, 515-522.
- Kaiser,S.E., Brickner,J.H., Reilein,A.R., Fenn,T.D., Walter,P., and Brunger,A.T. (2005). Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure.* 13, 1035-1045.
- Kalbfleisch,T., Cambon,A., and Wattenberg,B.W. (2007). A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic.* 8, 1687-1694.
- Kawano,M., Kumagai,K., Nishijima,M., and Hanada,K. (2006). Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* 281, 30279-30288.
- Kemper,C., Habib,S.J., Engl,G., Heckmeyer,P., Dimmer,K.S., and Rapaport,D. (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J. Cell Sci.* 121, 1990-1998.

- Kucik,C.J., Martin,G.L., and Sortor,B.V. (2004). Common intestinal parasites. *Am. Fam. Physician* 69, 1161-1168.
- Kuroda,R., Ikenoue,T., Honsho,M., Tsujimoto,S., Mitoma,J.Y., and Ito,A. (1998). Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 273, 31097-31102.
- Kutay,U., Hartmann,E., and Rapoport,T.A. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* 3, 72-75.
- Lapierre,L.A., Tuma,P.L., Navarre,J., Goldenring,J.R., and Anderson,J.M. (1999). VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 21), 3723-3732.
- Leipe,D.D., Wolf,Y.I., Koonin,E.V., and Aravind,L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317, 41-72.
- Lev,S. (2004). The role of the Nir/rdgB protein family in membrane trafficking and cytoskeleton remodeling. *Exp. Cell Res.* 297, 1-10.
- Lev,S., Ben,H.D., Peretti,D., and Dahan,N. (2008). The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* 18, 282-290.
- Levine,T. and Loewen,C. (2006). Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 371-378.
- Linstedt,A.D., Foguet,M., Renz,M., Seelig,H.P., Glick,B.S., and Hauri,H.P. (1995). A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5102-5105.
- Loewen,C.J., Roy,A., and Levine,T.P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* 22, 2025-2035.
- Misumi,Y., Sohda,M., Tashiro,A., Sato,H., and Ikehara,Y. (2001). An essential cytoplasmic domain for the Golgi localization of coiled-coil proteins with a COOH-terminal membrane anchor. *J. Biol. Chem.* 276, 6867-6873.
- Motz,C., Martin,H., Krimmer,T., and Rassow,J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* 323, 729-738.
- Mukhopadhyay,R., Ho,Y.S., Swiatek,P.J., Rosen,B.P., and Bhattacharjee,H. (2006). Targeted disruption of the mouse *Asna1* gene results in embryonic lethality. *FEBS Lett.* 580, 3889-3894.
- Mullen,R.T. and Trelease,R.N. (2000). The sorting signals for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase are within its C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 275, 16337-16344.
- Ngosuwan,J., Wang,N.M., Fung,K.L., and Chirico,W.J. (2003). Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 278, 7034-7042.
- Nguyen,M., Millar,D.G., Yong,V.W., Korsmeyer,S.J., and Shore,G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 25265-25268.
- Nikawa,J., Murakami,A., Esumi,E., and Hosaka,K. (1995). Cloning and sequence of the SCS2 gene, which can suppress the defect of INO1 expression in an inositol auxotrophic mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 118, 39-45.
- Nishimura,A.L., Mitne-Neto,M., Silva,H.C., Richieri-Costa,A., Middleton,S., Cascio,D., Kok,F., Oliveira,J.R., Gillingwater,T., Webb,J., Skehel,P., and Zatz,M. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822-831.
- Nishimura,Y., Hayashi,M., Inada,H., and Tanaka,T. (1999). Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 21-26.

- Pedrazzini,E., Villa,A., and Borgese,N. (1996). A mutant cytochrome b5 with a lengthened membrane anchor escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 4207-4212.
- Pedrazzini,E., Villa,A., Longhi,R., Bulbarelli,A., and Borgese,N. (2000). Mechanism of residence of cytochrome b(5), a tail-anchored protein, in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 148, 899-914.
- Pennetta,G., Hiesinger,P.R., Fabian-Fine,R., Meinertzhagen,I.A., and Bellen,H.J. (2002). *Drosophila* VAP-33A directs bouton formation at neuromuscular junctions in a dosage-dependent manner. *Neuron* 35, 291-306.
- Platta,H.W. and Erdmann,R. (2007). The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett.* 581, 2811-2819.
- Rabu,C., Wipf,P., Brodsky,J.L., and High,S. (2008). A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 283, 27504-27513.
- Raue,U., Oellerer,S., and Rospert,S. (2007). Association of protein biogenesis factors at the yeast ribosomal tunnel exit is affected by the translational status and nascent polypeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 282, 7809-7816.
- Roberts,T.M. (2005). Major sperm protein. *Curr. Biol.* 15, R153.
- Ronchi,P., Colombo,S., Francolini,M., and Borgese,N. (2008). Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 181, 105-118.
- Russ,W.P. and Engelman,D.M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* 296, 911-919.
- Sanz,P. and Meyer,D.I. (1988). Signal recognition particle (SRP) stabilizes the translocation-competent conformation of pre-secretory proteins. *EMBO J.* 7, 3553-3557.
- Schuldiner,M., Collins,S.R., Thompson,N.J., Denic,V., Bhamidipati,A., Punna,T., Ihmels,J., Andrews,B., Boone,C., Greenblatt,J.F., Weissman,J.S., and Krogan,N.J. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507-519.
- Schuldiner,M., Metz,J., Schmid,V., Denic,V., Rakwalska,M., Schmitt,H.D., Schwappach,B., and Weissman,J.S. (2008). The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134, 634-645.
- Setoguchi,K., Otera,H., and Mihara,K. (2006). Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J.* 25, 5635-5647.
- Skehel,P.A., Fabian-Fine,R., and Kandel,E.R. (2000). Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1101-1106.
- Skehel,P.A., Martin,K.C., Kandel,E.R., and Bartsch,D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* 269, 1580-1583.
- Sollner,T., Whiteheart,S.W., Brunner,M., Erdjument-Bromage,H., Geromanos,S., Tempst,P., and Rothman,J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.
- Soussan,L., Burakov,D., Daniels,M.P., Toister-Achituv,M., Porat,A., Yarden,Y., and Elazar,Z. (1999). ERG30, a VAP-33-related protein, functions in protein transport mediated by COPI vesicles. *J. Cell Biol.* 146, 301-311.
- Stefanovic,S. and Hegde,R.S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128, 1147-1159.
- Sutton,R.B., Fasshauer,D., Jahn,R., and Brunger,A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Sweet,D.J. and Pelham,H.R. (1992). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system. *EMBO J.* 11, 423-432.
- Tarr,D.E. and Scott,A.L. (2005). MSP domain proteins. *Trends Parasitol.* 21, 224-231.

- Tovar,J., Leon-Avila,G., Sanchez,L.B., Sutak,R., Tachezy,J., van der Giezen,M., Hernandez,M., Muller,M., and Lucocq,J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172-176.
- Voeltz,G.K., Rolls,M.M., and Rapoport,T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3, 944-950.
- Weimbs,T., Low,S.H., Chapin,S.J., Mostov,K.E., Bucher,P., and Hofmann,K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3046-3051.
- Weir,M.L., Klip,A., and Trimble,W.S. (1998). Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* 333 (Pt 2), 247-251.
- Weir,M.L., Xie,H., Klip,A., and Trimble,W.S. (2001). VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 616-621.
- Wyles,J.P., McMaster,C.R., and Ridgway,N.D. (2002). Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 29908-29918.
- Yabal,M., Brambillasca,S., Soffientini,P., Pedrazzini,E., Borgese,N., and Makarow,M. (2003). Translocation of the C terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 3489-3496.
- Yamagata,A., Mimura,H., Sato,Y., Yamashita,M., Yoshikawa,A., and Fukai,S. (2010). Structural insight into the membrane insertion of tail-anchored proteins by Get3. *Genes Cells* 15, 29-41.
- Zhang,K. and Kaufman,R.J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66, S102-S109.