

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů



Zuzana Drašnarová

Import proteinů do mitochondrií

Mitochondrial protein import

Bakalářská práce

Mgr. Pavel Doležal PhD.

Praha 2014

Děkuji mému školiteli Mgr. Pavlovi Doležalovi PhD. za rady, odborné konzultace a trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat rodině za morální podporu při psaní práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama za pomoci uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem. Souhlasím se zveřejněním této práce.

Praha, srpen 2014

Zuzana Drašnarová

Abstrakt

Většina mitochondriálních proteinů je syntetizována v cytoplasmě a poté musí být dopravena do vnější a vnitřní membrány nebo do mezimembránového prostoru a matrix. K transportu všech proteinů přes vnější membránu slouží TOM komplex. Odtud se osud jednotlivých populací proteinů liší: (i) sbalení β -barelových proteinů ve vnější membráně zprostředkovávají proteiny SAM komplexu, (ii) proteiny mezimembránového prostoru jsou po průchodu TOM komplexem zachyceny pomocí tzv. MIA dráhy, (iii) mitochondriální přenašeče vnitřní membrány vyžadují TIM22 a nakonec (iv) matrixové proteiny s částí proteinů vnitřní membrány jsou přeneseny komplexem TIM23. Zatímco transport přes vnější membránu nevyžaduje zdroj energie, přechod proteinů přes vnitřní mitochondriální membránu je závislý na ATP spotřebovaném mtHsp70 v rámci PAM komplexu a/nebo na membránovém potenciálu. Transportované proteiny mají targetovací sekvence, které jsou nutné pro rozpoznání transportovaného proteinu receptorovým proteinem na vnější membráně.

Klíčová slova: import, protein, mitochondrie, translokáza, membrána, matrix, mezimembránový prostor

Abstrakt

Most of mitochondrial proteins are synthesized in the cytoplasm and after that transported to the outer or the inner membrane or to the intermembrane space and the mitochondrial matrix. All mitochondrial proteins cross the outer membrane via the TOM complex. From here different populations of proteins follow distinct transport routes: (i) β -barel proteins are assembled in the outer membrane with the help the SAM complex, (ii) after the passage through the TOM complex the intermembrane space proteins are bound by the MIA pathway, (iii) the mitochondrial carrier proteins of the inner mitochondrial membrane require the activity of the TIM22 complex and finally (iv) the matrix proteins as well as the small sub-population of the inner membrane proteins are transported via the TIM23 complex. Whereas the transport across the outer mitochondrial membrane does not require the additional energy, the transport across the inner membrane depends on ATP and/or the membrane potential. The transported proteins carry targeting sequences which are recognized by the outer membrane receptors.

Key words: protein import, mitochondria, translocase, membrane, matrix, intermembrane space

Obsah

Obsah	1
Seznam zkratek.....	3
Úvod.....	4
Endosymbiotický původ mitochondrií, genom, struktura, funkce	5
Cytoplasmatické chaperony	6
Signální targetovací sekvence.....	7
N-terminální presekvence	7
C-terminální presekvence	8
Proteázy odstraňující targetovací sekvence.....	8
Vnitřní targetovací sekvence.....	8
Transport přes vnější membránu	9
TOM komplex	10
Tom40.....	10
Tom20 a Tom22.....	11
Malé Tom proteiny	11
SAM komplex	11
Sam50	11
Sam35	12
Sam37	12
ERMES komplex	12
Mezimembránový prostor mitochondrií	13
Tim9-Tim10 komplex.....	13
MIA dráha	13
Erv1.....	14
Proteázy mezimembránového prostoru.....	14
Vnitřní mitochondriální membrána	14
Tim22.....	15
Tim54.....	15

Tim18.....	15
Tim12.....	15
Transport přes vnitřní mitochondriální membránu	16
TIM23 komplex.....	16
Tim23.....	17
Tim17.....	17
Tim50.....	17
Tim21.....	17
Tim44.....	18
mtHsp70.....	18
Mge1.....	19
Pam18.....	19
Pam16.....	19
Pam17.....	19
Oxa1.....	20
Na TOM komplexu nezávislý transport	20
Bcl-2 rodina.....	20
Transport proteinů do mitosomu <i>Giardia intestinalis</i>	21
Závěr	22
Použitá literatura.....	23

Seznam zkratek

AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
ATOM	Archaic translocase of the Outer Mitochondrial membrane
ATP	Adenosintrifosfát
Bcl	B-cell lymphoma
ERMES	Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure
ERV	Essencial for Respiration and Viability
FAD	Flavinadenindinukleotid
GIP	General Import Por
IMP	Inner Membrane Protease
Mdm	Mitochondrial Distribution and Morphology
Mge	Mitochondrial GrpE
MIA	Mitochodnrial Import and Assembly
MIP	Mitochondial Intermediate Peptidase
Mmm	Maintenance of Mitochondrial Morphology
MPP	Mitochondrial Processing Peptidases
mtHsp70	Mitochondriální Heat Shock Protein
Omp	Outer Membrane Proteins
Oxa	Oxidase Assembly Protein
PAM	Protein Import Motor
POTRA	Polypeptide Transport-Associated
SAM	Sorting and assembly machinery
tBid	Truncated BH3-Interacting Domain death agonist
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TOM	Translocases of the Outer Membrane

Úvod

Přibližně 99 % mitochondriálních proteinů je kódováno v buněčném jádře. Tyto proteiny jsou syntetizovány cytoplasmatickými ribozomy a poté jsou transportovány do vnější membrány, mezimembránového prostoru, vnitřní membrány nebo mitochondriální matrix. Pro správné zacílení proteinům slouží targetovací presekvence, které bývají po transportu odštěpeny proteázou.

Tato práce si klade za cíl především stručně shrnout doposud známé poznatky o jednotlivých proteinech, které se tohoto transportu účastní, a popsat případné projevy nefunkčnosti těchto proteinů. Některé transportní proteiny mají své homology u bakterií, což podporuje teorii endosymbiotického vzniku mitochondrií.

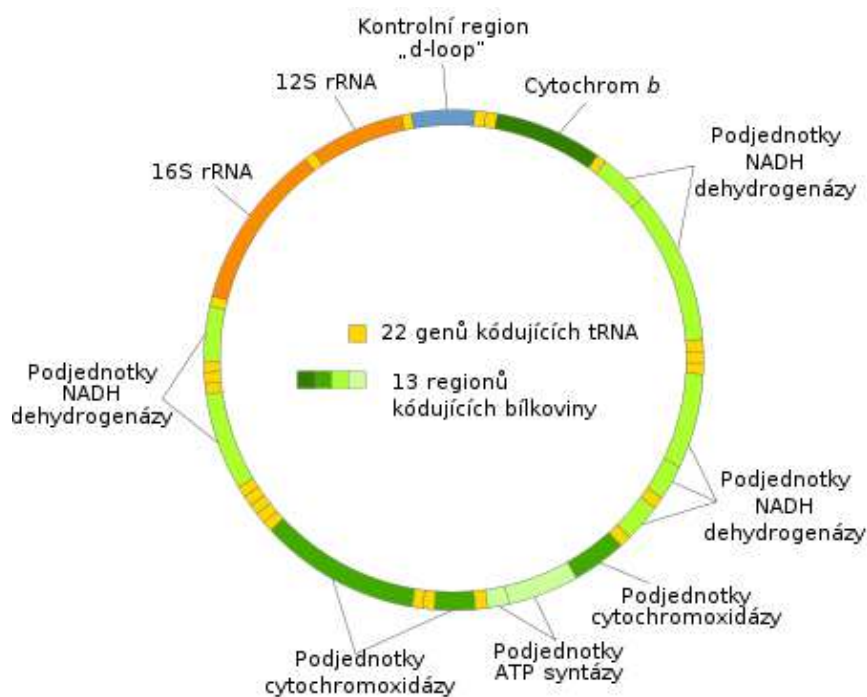
S transportem proteinů do mitochondrií se pojí i některé lidské choroby. Kupříkladu polymorfismus proteinu Tom40 je spojován s různým rizikem onemocnění známé jako Alzheimerova choroba. Defektní β -amyloidní proteiny se vážou na TOM kanál a negativně tak ovlivňují transport jiných proteinů do mitochondrie (Schapira, 2012).

Mezi další onemocnění patří Mohr-Tranebjaerg syndrom (syndrom dystonie-hluchota, MTS/DFN1). Jedná se o mutaci proteinů Tim8 a Tim13, které se řadí mezi malé Tim proteiny. Kvůli této mutaci není vložen do vnitřní membrány protein Tim23 a tím je snížen transport proteinů oxidativní fosforylace, a tak i produkce energie (Roesch et al., 2002).

Mnoho proteinů je esenciálních (viz níže), a proto jsou mutace v těchto genech prenatálně letální. Není známo mnoho nemocí způsobených neesenciálními defektními transportními proteiny, a proto je toto téma předmětem dalších výzkumů.

Endosymbiotický původ mitochondrií, genom, struktura, funkce

Mitochondrie je semiautonomní organela eukaryotických buněk. Má dvě membrány, vnější a vnitřní, vlastní genom a dělí se nezávisle na buňce. Předpokládá se, že k endosymbióze bakterie, ze které vznikla mitochondrie, došlo asi před 1,2 miliardy let (Shih and Matzke, 2013). Po této události se většina původního bakteriálního genomu přesunula do jádra a současný mitochondriální genom (viz obrázek 1) tak kóduje přibližně pouze 1 % původního bakteriálního genomu (van der Laan et al., 2006). Z tohoto důvodu se musel vytvořit systém translokáz a signálních presekvenčí, aby se jádrem kódované proteiny dostaly do mitochondrie.

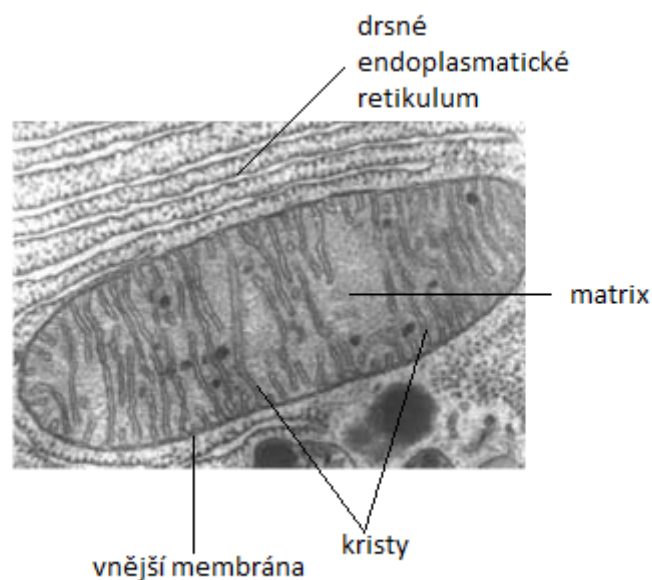


Obrázek 1 - Schéma lidské mitochondriální DNA, kóduje 13 proteinů a má 22 pro tRNA, zdroj: http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA

Endosymbiotickou teorii podporuje fakt, že mitochondrie má dvě membrány jako gramnegativní bakterie, nebo prokaryotický typ ribozomů. V mitochondrii najdeme množství proteinů, které jsou jasněho bakteriálního původu, přesto pouze omezený počet z nich nese jasnou příbuznost k α -proteobakteriím, předpokládaným předkům mitochondrie (viz níže).

Mitochondrie u většiny organismů syntetizuje ATP pomocí proteinu ATP syntázy. Proteiny dýchacího řetězce transportují z matrix do mezimembránového prostoru protony a tím vzniká membránový potenciál nutný pro syntézu ATP, který je rovněž důležitý pro transport proteinů do mitochondrie (viz níže).

Vnitřní membrána vytváří tzv. kristy, které vybíhají do mitochondriální matrix (viz obrázek 2). Tímto způsobem lze efektivně zvětšit povrch vnitřní membrány, protože právě zde jsou umístěny transmembránové domény proteinů dýchacího řetězce.



Obrázek 2 - Elektronový snímek mitochondrie popisující vnější membránu a vnitřní membránu, která tvoří kristy. Okolo mitochondrie se nachází cytoplazma a drsné endoplasmatické retikulum, zdroj: http://web.alsa.org/site/PageServer?pagename=ALSA_Mitochondria

Cytoplasmatické chaperony

Pro transport proteinů jsou nutné cytoplasmatické chaperony, především Hsp70 (Heat Shock Protein), případně Hsp90 u savčích buněk. Tyto chaperony se naváží na preprotein již při jeho syntéze a dopraví ho až k mitochondriálnímu receptoru Tom70 (viz níže). Role jiných než chaperonových cytoplasmatických

faktorů při importu proteinů do mitochondrií dosud není příliš známá (Young et al., 2003).

Signální targetovací sekvence

Proteiny cílené do mitochondrie jsou syntetizovány na cytoplasmatických ribozomech. Mají proto signální targetovací presekvence, které jim pomáhají dostat se na místo určení. Zpravidla se tato aminokyselinová sekvence nachází na N-konci, ale existuje i pár proteinů, které mají C-terminální signální sekvenci, např. DNA helikáza. Proteiny cílené do vnější nebo vnitřní mitochondriální membrány mají vnitřní hydrofobní sekvence, které je ukotvují v membráně (Wickner and Lodish, 1985).

N-terminální presekvence

N-terminální signální presekvence má povahu amfipatického helixu. Je přibližně dvacet až šedesát aminokyselin dlouhá a bohatá především na arginin, leucin a serin (viz obrázek 3). Polární část tohoto helixu je kladně nabitá, tudíž může interagovat s negativně nabitými fosfolipidy na povrchu membrány. Záporně nabitě aminokyseliny se v této presekenci nacházejí jen velmi zřídka (Heijne, 1986). N-terminální presekveni rozpoznávají povrchové receptory Tom20 a Tom22 (viz níže). V mitochondriální matrix bývá presekvence odstraněna proteázami (viz níže).



Obrázek 3 - Targetovací presekvence - příklad amfipatického helixu proteinu superoxid dismutáza, zdroj: (Panneerselvam et al., 2012)

C-terminální presekvence

C-terminální presekvence je stejně jako N-terminální presekvence amfipatický pozitivně nabitý helix, který slouží proteinu k transportu do mitochondrie. Translokovaný protein s C-terminální targetovací sekvencí však membránami prochází v opačném směru, tedy směrem od C-konce k N-konci. Nezáleží na tom, na jakém konci se tato presekvence nachází – platí, že po jejím odstranění protein není rozpoznán receptorovými proteiny na povrchu membrány a není tudíž importován. Proteáza MPP (viz níže) štěpí tyto C-koncové presekvence (Lee et al., 1999).

Proteázy odstraňující targetovací sekvence

V mitochondriální matrix a v mezimembránovém prostoru se nacházejí proteázy, které mají za úkol odstraňovat N-koncové (respektive C-koncové) targetovací sekvence. V mezimembránovém prostoru se jedná o AAA a IMP proteázy (viz níže). V mitochondriální matrix se nachází MPP (Mitochondrial Processing Peptidases) rozpoznávající aminokyselinu arginin (R) na -2 nebo -3 pozici od místa štěpení (Mach et al., 2013), a MIP (Mitochondrial Intermediate Peptidase), které rozeznávají aminokyselinovou sekvenci (FXXSXXXX) mezi místem štěpení a N-koncem maturovaného proteinu. C-koncové presekvence zřejmě štěpí pouze MPP. Poté, co se protein dostane do místa určení, není targetovací sekvence třeba, proto je zde odstraňována proteázami (Gakh et al., 2002).

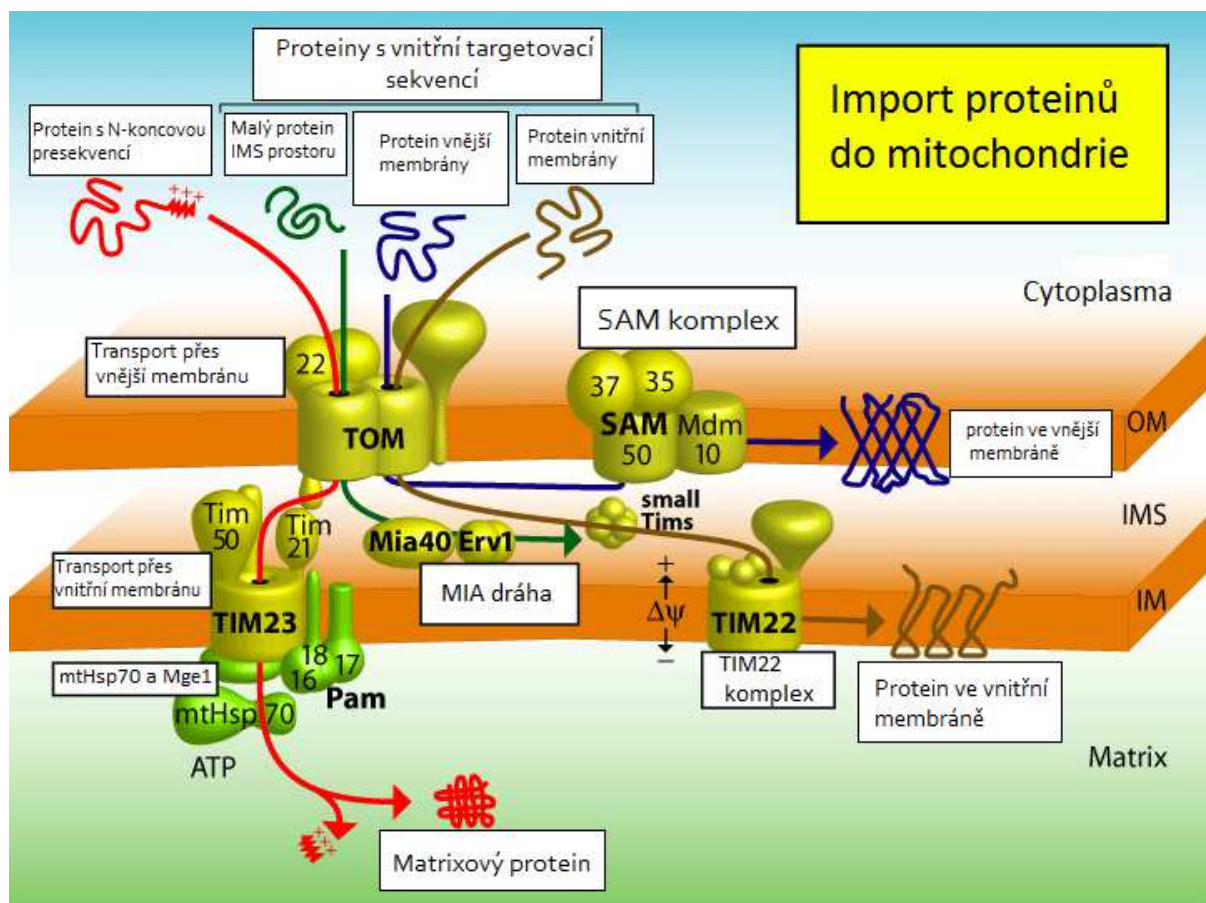
Vnitřní targetovací sekvence

Uvnitř proteinu mohou být vnitřní targetovací sekvence, které z proteinu nejsou proteolyticky odstraňovány, ale zůstávají uvnitř jako součást transmembránové domény proteinu. Na obou stranách této sekvence bývají krátké úseky tvořené pozitivně nabitými aminokyselinami, které interagují s negativně nabitými fosfolipidy a pomáhají tak tuto část proteinu držet v membráně (Fölsch et al., 1996).

Transport přes vnější membránu

Proteiny cílené do vnější membrány, mezimembránového prostoru, vnitřní membrány nebo mitochondriální matrix prochází TOM komplexem (Translocases of the Outer Membrane). Ten se skládá ze dvou primárních receptorových proteinů označených jako Tom20 a Tom70, které asociují s jádrem TOM komplexu a které bývá označováno jako tzv. GIP (General Import Pore) (van der Laan et al., 2006).

Tom proteiny jsou poměrně konzervované, protein Tom40 najdeme v podstatě u všech eukaryot, ostatní proteiny TOM komplexu, jak jsou zde popsány, se nacházejí pouze u hub a živočichů (Kato and Mihara, 2008).



Obrázek 4 - Schéma proteinů účastnících se importu proteinů do mitochondrie. OM – vnější membrána, IMS – mezimembránový prostor, IM – vnitřní membrána, zdroj: <http://www.biochemie.uni-freiburg.de/ag/pfanner>

Všechny proteiny procházejí TOM komplexem, pokud jsou cílené do vnější membrány, jsou přeneseny na SAM komplex. MIA dráha pomáhá při sbalování

proteinům mezimembránového prostoru, například malým Tim proteinům a cytochromům. Pokud se jedná o protein vnitřní membrány, je z TOM komplexu přenesen na TIM22 nebo TIM23 komplex. Je-li protein transportován do mitochondriální matrix, interaguje s receptory TIM23 komplexu, který ho pak následně transportuje do matrix za pomoci mtHsp70 a PAM komplexu (viz obrázek 4).

TOM komplex

V roce 1998 bylo publikováno vyizolování TOM komplexu a jeho následná rekonstrukce. Zjistilo se, že tento rekonstruovaný TOM komplex napomáhá importu mezimembránového proteinu, cytochrom c syntázy. Vyizolovaný komplex rovněž iniciuje import N-koncové targetovací sekvence matrixových preproteinů. Navíc se ukázalo, že v planární lipidové dvojvrstvě se TOM komplex může chovat jako napětím ovládaný kanál (Künkele et al., 1998).

Receptorový protein Tom70 rozpoznává především vnitřní hydrofobní signál uvnitř proteinu, naopak Tom20 a Tom22 rozpoznává signál na N-koncové části preproteinu (van der Laan et al., 2006).

Po rozpoznání N-terminální targetovací presekvence proteiny Tom20 a Tom22 dochází k vytvoření interakce mezi preproteinem a kanálem Tom40. Proteiny cílené do vnitřní a vnější membrány se po translokaci tímto kanálem navážou na chaperony Tim9 a Tim10 v mezimembránovém prostoru (Brix et al., 1999).

Tom40

Tom40 je β -barelový protein tvořící vlastní kanál TOM komplexu. Je tvořen devatenácti β -listy a jedním helixem na N-konci, který se nachází uvnitř β -barelového póru. Tento helix je pravděpodobně zodpovědný za rozpoznávání mitochondriální targetovací presekvenci (Gessmann et al., 2011). Kvartérní uspořádání Tom40 proteinů se projevuje tvorbou dvou- nebo tří-kanálových struktur. Je zajímavé, že mutantní mitochondrie organismu *Saccharomyces cerevisiae*

s defektem proteinu Tom20 tvoří TOM komplex s dvěma kanály. Pro stabilní organizaci těchto kanálových jednotek, tvořených proteinem Tom40, do větších sestav TOM komplexu jsou bezpodmínečně nutné receptorové proteiny Tom20 a Tom22 (Becker et al., 2005; Model et al., 2002).

U organismu *Trypanosoma brucei* nebyl nalezen homolog proteinu Tom40. Autoři nedávné publikace identifikovali u *T.brucei* translokázu ATOM (the Archaic translocase of the Outer Mitochondrial membrane), která má jisté podobnosti s proteinem Tom40 a zároveň s bakteriální translokázou z rodiny Omp85. Zdá se však, že ATOM není mezičlánek mezi bakteriální a eukaryotickou translokázou, ale pouze velmi divergovaný Tom40 (Harsman et al., 2012; Žárský et al., 2012).

Tom20 a Tom22

Tom20 a Tom22 jsou receptorové proteiny, které rozeznávají N-terminální presekvenční proteiny. Tom20 pravděpodobně rozeznává hydrofobní a Tom22 hydrofilní povrch téže presekvenční (Yamano et al., 2008).

Malé Tom proteiny

Malé Tom proteiny, tedy konkrétně Tom5, Tom6 a Tom7, ve značné míře napomáhají skládání TOM komplexu a ovlivňují jeho stabilitu. Proteiny Tom5 a Tom7 jsou ve stálé interakci s TOM komplexem. Jádro TOM komplexu je neobyčejně stabilní, avšak při delecii proteinu Tom6 dochází k destabilizaci komplexu. Naopak při absenci proteinu Tom7 byla pozorována ještě větší stabilita TOM komplexu. Lze tedy tvrdit, že proteiny Tom6 a Tom7 mají antagonistickou funkci (Becker et al., 2011; Dekker et al., 1998; Meisinger et al., 2001).

SAM komplex

Sam50

Protein Sam50 je esenciální protein, který zprostředkovává vkládání a sbalování membránových proteinů, jako je např. Tom40, které nacházejí ve vnější mitochondriální membráně. Samotný Sam50 je β -barelový protein, jehož β -barelová

doména je konzervovaná napříč eukaryotickými organismy. Dále je tvořen tzv. POTRA (Polypeptide Transport-Associated) doménou, o které se dříve se myslelo, že slouží jako receptor pro rozpoznávání prekurzorového proteinu, ale zjistilo se, že je důležitá především pro uvolnění proteinu ze SAM komplexu (Stroud et al., 2011).

β -barelová doména proteinu Sam50 je homologní s doménou bakteriální translokázy Omp85, která Gram-negativním bakteriím slouží pro transport proteinů a lipidů do vnější membrány (Kozjak et al., 2003). Příbuznost proteinů Sam50 a Omp85 představuje jasný důkaz bakteriálního původu mitochondrií (Gentle et al., 2004).

Sam35

Druhým esenciálním proteinem SAM komplexu je protein Sam35, což je periferní protein, který se nachází na mitochondriálním povrchu. Spolu s proteinem Sam50 pomáhá sbalování transmembránových proteinů bohatých na β -listy, které se poté nacházejí ve vnější mitochondriální membráně (Milenkovic et al., 2004).

Sam37

Dalším proteinem SAM komplexu je protein Sam37, který bývá někdy označován jako Mas37. Tento protein není na rozdíl od proteinu Sam35 esenciální. Zdá se, že Sam37 ovlivňuje stabilitu SAM komplexu a pravděpodobně i nějak napomáhá jeho funkci. Také se jedná o periferní protein, který se nachází na povrchu mitochondrie (Chan and Lithgow, 2008).

ERMES komplex

ERMES komplex (Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure) je soubor proteinů, který slouží ke komunikaci mezi endoplasmatickým retikulem a mitochondrií. Bylo prokázáno, že po uvolnění vápenatých iontů z endoplasmatického retikula dochází ke zvýšení koncentrace těchto iontů i v mitochondrii. Přes ERMES komplex také dochází k výměně lipidů mezi endoplasmatickým retikulem a mitochondrií (Michel and Kornmann, 2012). ERMES

komplex tvoří proteiny Mdm10, Mdm12, Mmm1 a Mdm34, které mají kromě výše popsané funkce i funkci v transportu proteinů. Protein Mdm10 je porin ve vnější membráně, který stabilizuje proteiny SAM komplexu a interaguje s proteinem Tom40. Spolu s proteiny Mdm12 a Mmm1 napomáhá nejen sbalování β -barelových proteinů, ale, jak některé zdroje uvádějí, i uvolňování helikálních membránových proteinů do vnější mitochondriální membrány. Přesný mechanismus však dodnes není znám (Flinner et al., 2013; Thornton et al., 2010; Wideman et al., 2010).

Mezimembránový prostor mitochondrií

Kromě endoplasmatického retikula je mezimembránový prostor mitochondrií jediné místo, kde se v buňce nacházejí disulfidické můstky. Nacházejí se zde cytochromy, proteinové chaperony, proteázy a proteiny MIA dráhy, které preproteinům pomáhají zaujmout správnou konformaci díky své vlastnosti vázat cysteiny preproteinu (viz níže).

Tim9-Tim10 komplex

Proteiny Tim9 a Tim10 patří mezi malé Tim proteiny a slouží jako chaperony v mezimembránovém mitochondriálním prostoru. Dohromady tvoří hexamer, v němž se střídá vždy jeden protein Tim9 a jeden protein Tim10. Uvnitř takto vytvořeného cyklu se nacházejí helikální N-koncové a C-koncové části proteinů Tim9 a Tim10, které bývají označovány jako „chapadla“. Tyto „chapadlovité“ struktury jsou pravděpodobně zodpovědné za interakci s hydrofobními oblastmi transportovaného membránového proteinu, který je následně předán buď SAM nebo TIM22 komplexu (Baker and Webb, 2009).

MIA dráha

MIA dráha (Mitochondrial Import and Assembly) zprostředkovává pomocí proteinu Mia40 zachycení proteinů v mezimembránového prostoru (např. malých Tim proteinů) po průchodu Tom40. Tvorbou disulfidického můstku mezi Mia40 a transportovaným prekurzorem se zabrání zpětnému úniku proteinu do cytoplasmy.

Přesun disulfidického můstku z Mia40 na přenášený protein potom zajistí rychlé sbalení proteinu (Chacinska et al., 2004).

Erv1

Erv1 (Essencial for Respiration and Viability) je FAD-dependentní sulfhydryl oxidáza, která hraje důležitou roli v oxidativním sbalování proteinů mezimembránového prostoru. Během uvolňování substrátu z Mia40 dochází k jeho reoxidaci pomocí Erv1, která přenáší elektrony až na cytochrom (Bien et al., 2010; Lee et al., 2000).

Proteázy mezimembránového prostoru

V mezimembránovém prostoru byla detekována AAA proteáza (ATPases associated with diverse cellular activities) a IMP proteáza (Inner Membrane Protease). AAA proteáza je zakotvena ve vnitřní mitochondriální membráně s funkční doménou v mezimembránovém prostoru. Tato proteáza funguje jako molekulární chaperon pro špatně sbalené proteiny v mezimembránovém prostoru. Pokud se však protein nesbalí správně, je degradován (Schreiner et al., 2012). IMP proteáza u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* rozpoznává čtyři známé proteiny – NADH:cytochrom b₅ reduktázu, cytochrom b₂, FAD-dependentní glycerol-3-fosfát dehydrogenázu a cytochrom c oxidázu. Proteáza IMP se skládá se tří podjednotek (Imp1p, Imp2p a Som1p), přičemž C-koncovou doménou interaguje s vnitřní membránou a N-koncovou doménou interaguje s preproteiny. Rozpoznává amfipatické presekvence, na prvním nebo třetím místě musí být malá nenabitá aminokyselina (Luo et al., 2006).

Vnitřní mitochondriální membrána

Pro vložení proteinů, zejména z rodiny „mitochondrial carrier protein“, do vnitřní mitochondriální membrány je využívám TIM22 komplex skládající se z proteinů Tim22, Tim54, Tim18 a Tim12. Jako zdroj energie slouží TIM22 komplexu membránový potenciál (Kovermann et al., 2002).

Tim22

Tim22 patří do rodiny Tim17 proteinů a tvoří samotný pór komplexu TIM22. Tyto kanálové struktury jsou v TIM22 komplexu vždy dvě. Tim22 specificky rozpoznává vnitřní targetovací sekvence v preproteinu, které kanál aktivují (Kovermann et al., 2002). Po navázání přenášeného proteinu na Tim22 dojde k jeho laterálnímu uvolnění do vnitřní membrány (Rehling et al., 2003).

Tim54

O proteinu Tim54 zatím není známo mnoho informací. Tim54 je protein ukotvený ve vnitřní membráně s velkou doménou v mezimembránovém prostoru, která má pravděpodobně za úkol vázat proteiny Tim9 a Tim10 s navázaným preproteinem. Mimo tuto funkci ještě napomáhá sbalení proteinu Tim18. Naopak pro sbalení proteinu Tim54 je nutný Tim10 (Wagner et al., 2008).

Tim18

Protein Tim18 je homologní s transmembránovou podjednotkou Sdh4 sukcinátdehydrogenázy. Funkce tohoto proteinu zůstává stále nejasná. Pravděpodobně nějakým způsobem napomáhá správnému sbalování proteinu Tim54, avšak mechanismus dosud není znám (Kulawiak et al., 2013; Wagner et al., 2008).

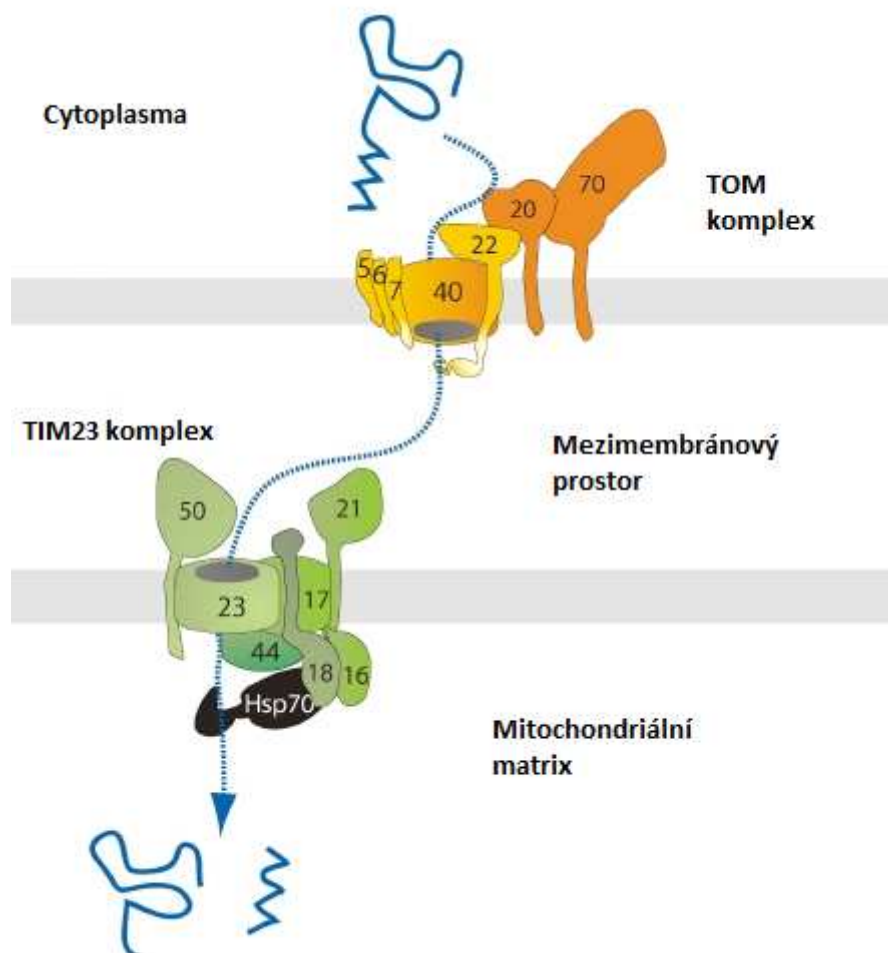
Tim12

Tim12 je esenciální protein komplexu TIM22, který řadíme mezi malé Tim proteiny. Specificky se váže na transmembránovou doménu preproteinů, má afinitu k lipidům vnitřní mitochondriální membrány a interaguje s proteiny Tim9, Tim10 a Tim22. Protein Tim12 funguje jako místo kontaktu translokovaného proteinu s Tim9-Tim10 komplexem. Zdá se, že protein Tim12 není ukotven ve vnitřní mitochondriální membráně, ale pouze periferně asociuje s TIM22 komplexem (Lionaki et al., 2008).

Transport přes vnitřní mitochondriální membránu

TIM23 komplex

Samotný kanál TIM23 komplexu, který bývá někdy označován jako TIM23/17 komplex, je tvořen dvěma podjednotkami – proteiny Tim23 a Tim17. Oba proteiny patří do rodiny Tim17 proteinů. Tyto dva proteiny fungují i jako receptory a slouží k transportu proteinů přes vnitřní mitochondriální membránu. K samotnému transportu jsou však potřeba další proteiny TIM23 komplexu (viz obrázek 5, viz níže), PAM komplex i membránový potenciál (Milisav et al., 2001).



Obrázek 5 - Transport proteinu do mitochondriální matrix – preprotein je translokován skrz TOM komplex a poté přes TIM23/17 komplex. Transportu pomáhá molekulární motor mtHsp70. Zdroj: <http://www.lucasbrouwers.nl/blog/2010/02/evolving-molecular-machines/>

Tim23

Tim23 je ve vnitřní membráně zakotvený protein, který pomocí své mezimembránové domény funguje jako presekvenční receptor a dohromady s proteinem Tim17 tvoří samotný pór. Některé práce ukazují, že by Tim23 mohl mít dokonce jednu doménu zakotvenou ve vnější membráně a že by tak mohl mít kontakt s povrchem mitochondrie (Donzeau et al., 2000).

Zdá se, že jeho hlavní funkcí je rozeznat presekvenci preproteinu a poté transportovat preprotein přes vnitřní mitochondriální membránu do matrix mitochondrie (Lohret et al., 1997).

Tim17

Tim17 je protein, o kterém toho stále není moc známo. Má klíčovou roli v transportu preproteinů do mitochondriální matrix, stejně jako protein Tim23, protože společně vytvářejí membránový kanál. N-koncová transmembránová doména proteinu Tim17 je striktně konzervovaná a nezbytná pro funkci translokázy TIM23 (Meier et al., 2005).

Tim50

Protein Tim50 má dvě místa pro navázání presekvence, pravděpodobně pomáhá předání proteinu z TOM komplexu na TIM23 komplex a podílí se i na otevírání samotného TIM23 kanálu. Spekuluje se, zda by protein Tim50 mohl pomocí fosfatázové aktivity regulovat, skrze proteiny z rodiny Bcl-2 (viz níže), propustnost mitochondriální membrány. Ztráta proteinu Tim50 vede k mitochondriální dysfunkci, ztrátě integrity mitochondrií a k buněčné smrti (Guo et al., 2004; Rahman et al., 2014).

Tim21

Tim21 je protein s jednou transmembránovou doménou ve vnitřní mitochondriální membráně a s C-terminální doménou v mezimembránovém prostoru. Tim21 interaguje s proteiny TOM komplexu, konkrétně s Tom40 a Tom22.

Zdá se, že by protein Tim21 mohl stabilizovat interakce mezi TOM a TIM23 komplexem. Studie ukazují, že Tim21 není esenciální protein, dokonce se ukazuje, že není esenciální ani pro funkci TIM23 komplexu, což by jen potvrzovalo, že pouze zprostředkovává interakci mezi TOM a TIM23 komplexem (Mokranjac et al., 2005).

Tim44

Dříve se myslelo, že protein Tim44 má pouze funkci jako jakési lešení pro mitochondriální Hsp70 (mtHsp70), tj. udržuje jinak volně lokalizované mtHsp70 v blízkosti translokázy. Ukazuje se ale, že kromě mtHsp70 váže i proteiny PAM komplexu, tedy Pam16 a Pam18. Ukotvuje tyto tři proteiny k proteinu Tim17. V případě nefunkčního proteinu navíc dochází k tomu, že protein Pam17 není schopen se navázat na TIM23 komplex. Protein Tim44 je nezbytný zejména pro iniciaci translokace, pro její dokončení jsou nezbytné i další proteiny (viz níže) (Hutu et al., 2008; Schiller, 2009).

mtHsp70

Mitochondriální Hsp70 (Heat Shock Protein 70) je tzv. molekulární motor, který je zcela esenciální pro transport preproteinu přes vnitřní mitochondriální membránu. Po navázání ATP interaguje s proteinem Tim44 a váže translokovaný protein. Poté dochází k hydrolýze ATP a ke konformační změně mtHsp70 a tím mtHsp70 katalyzuje translokaci. Tato konformační změna mtHsp70 totiž způsobí fyzický pohyb preproteinu skrz TIM23 komplex. MtHsp70 oddisociuje a po výměně ADP za ATP se může znovu navázat na protein Tim44. Tuto výměnu má na starost protein Mge1 (viz níže) (Horst et al., 1996).

Ukazuje se, že mitochondriální chaperonový systém je homologní s chaperonovým systémem prokaryot a jeví jisté podobnosti s chaperonovým systémem eukaryotické buňky (Azem et al., 1997).

Mge1

Protein Mge1 se nachází v mitochondriální matrix. Stejně jako mtHsp70 je velmi důležitou složkou transportního systému přes vnitřní mitochondriální membránu. Protein Mge1 uvolňuje ADP z proteinu mtHsp70 a umožňuje tak navázání dalšího ATP proteinem mtHsp70 (Miao et al., 1997).

Pam18

Pam18, někdy označovaný jako Tim14, je také esenciální protein nutný pro úspěšnou translokaci preproteinu do mitochondriální matrix. Nachází se na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány. Jedná se o tzv. J-protein odvozený od bakteriálního DnaJ, který interaguje s DnaK, což je bakteriální homolog mtHsp70. Protein Pam18 stimuluje ATPázovou aktivitu proteinu mtHsp70 a tím stimuluje translokaci preproteinu (Li et al., 2004).

Pam16

Pam16 je protein důležitý pro vytvoření interakce mezi proteiny Tim44 a mtHsp70. Je lokalizovaný v matrix u vnitřní membrány. Zdá se, že protein Pam16 reguluje funkci proteinu Pam18. Oba jsou zapotřebí pro správnou činnost proteinu mtHsp70. Protein Pam16 se pravděpodobně vyvinul mutací J-domény Pam18 právě z důvodu nutné regulace komplexu Pam18-mtHsp70 (Frazier et al., 2004; Li et al., 2004).

Pam17

Pam17 je protein ukotvený ve vnitřní membráně a exponovaný do matrix. Je důležitý pro správnou organizaci Pam16-Pam18 komplexu a jeho asociaci s TIM23 komplexem a pro stimulaci mtHsp70, ale není esenciální. Podílí se pouze na transportu proteinů do mitochondriální matrix, nikoli do vnitřní membrány (Laan and Chacinska, 2005).

Oxa1

Oxa1 (Oxidase Assembly Protein1) je protein ve vnitřní mitochondriální membráně, který se skládá z membránového kanálu a pozitivně nabitého C-terminálního helixu, který má schopnost vázat mitochondriální ribozom. Ačkoliv molekulární mechanismus dodnes není znám, předpokládá se, že protein Oxa1 umísťuje proteiny z mitochondriální matrix do vnitřní membrány. Svou velikostí i vlastnostmi je protein Oxa1 podobný ostatním translokázám ve vnitřní membráně (Tim22 a Tim23 viz výše). Spekulovalo se, zda by protein Oxa1 mohl do vnitřní membrány umísťovat i jádrem kódované proteiny, které by byly nejprve translokovány do mitochondriální matrix a až poté zpětně vkládány do vnitřní membrány. Protein Oxa1 však pravděpodobně translokuje do vnitřní membrány opravdu pouze mitochondriálním genomem kódované proteiny, protože mutantní buňky bez C-terminální helikální domény proteinu Oxa1 byly defektní v biogenezi proteinů kódovaných mitochondrií. Stejnou funkci u bakterií plní protein YidC, který je homologní s proteinem Oxa1 (Krüger et al., 2012; Szyrach et al., 2003).

Na TOM komplexu nezávislý transport

Bcl-2 rodina

Bcl-2 je rodina proteinů, které v savčí buňce regulují programovanou buněčnou smrt a apoptotické děje. Celá rodina se podle funkce proto dělí na proapoptotické, např. Bax, a anti-apoptotické proteiny, např. samotný Bcl-2. Zřejmě se však mohou podílet na celkové regulaci permeability vnější membrány. Tohoto děje se účastní protein tBid, který se váže na vnější mitochondriální membránu, a poté monomerní Bax proteiny, které interagují s tBid, a oligomerizují ve vnější membráně. Přesný mechanismus tohoto děje však není znám. Mimo mitochondrie se proteiny Bcl-2 rodiny nacházejí i v cytoplasmě nebo endoplasmatickém retikulu (Lovell et al., 2008).

Transport proteinů do mitosomu *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis je anaerobní parazitický prvok z řádu diplomonád, který způsobuje nemoc zvanou giardióza. Dříve se myslelo, že organismus *Giardia intestinalis* zcela postrádá mitochondrie. Později se však ukázalo, že nese vysoce redukované mitochondriální organely s dvojitou membránou, které byly nazvány mitosomy (Tovar et al., 2003). Mitosom *G.intestinalis* neobsahuje žádnou DNA a pouze 20 různých proteinů (Jedelský et al., 2011), které jsou z cytoplasmy transportovány posttranslačně. Současná data ukazují, že membrány mitosomu nesou zřejmě nejjednodušší známý aparát pro import proteinů. U *G.intestinalis* byl objeven analog proteinu Tom40 (*GiTom40*), který je součástí TOM komplexu. Oproti vyšším eukaryotům má však tento TOM komplex menší velikost. Chaperony Cmp60 a Hsp70 a ko-chaperon Pam18 pravděpodobně pomáhají transportu přes membránu a sbalování proteinů uvnitř matrix. N-terminální targetovací sekvence odštěpuje protéza MPP typu (Šmíd et al., 2008). Stejně jako v mitochondriích i v mitosomech dochází k tvorbě Fe-S center. Proteiny, které se toho účastní, jsou u protist a ostatních eukaryot homologní (Sutak et al., 2004).

Závěr

Mitochondrie se na první pohled jeví jako velmi dobře prozkoumaná organela. Je znám její genom i proteom, ale o některých proteinech účastnících se transportu proteinů do mitochondrií se ví jen velmi málo, na což poukazuje i tato práce. V současné době probíhají výzkumy týkající se nejen mechanismu transportu proteinů do mitochondrií, ale i dynamiky tohoto děje. V každé tkáni plní mitochondrie svou specifickou úlohu a lze tedy předpokládat, že tento transport bude důmyslně regulován.

U organismu *Saccharomyces cerevisiae* je dnes známo pouze 31 proteinů mezimembránového prostoru (Vögtle et al., 2012). Předpokládá se, že budou objeveny nové proteiny, avšak jejich izolace z mezimembránového prostoru se potýká s mnoha příkořími. Během řady pokusů o charakterizaci tohoto mitochondriálního subkompartmentu byla asi největším problémem kontaminace matrixovými proteiny.

Na tuto bakalářskou práci bych proto ráda navázala výzkumem mezimembránového prostoru organismů *Giardia intestinalis* a *Trypanosoma brucei* a to konkrétně za pomoci proteinu MIA dráhy, *Erv1*, metodou *in situ* značení. Tato nová metoda se obejde bez technicky obtížné subfrakcionace mitochondrií a měla by tak vyřešit problém s kontaminací proteiny z matrix.

Použitá literatura

- Azem, a., Oppliger, W., Lustig, A., Jenö, P., Feifel, B., Schatz, G., and Horst, M. (1997). The Mitochondrial hsp70 Chaperone System: Effect of adenine nucleotides, peptide substrate, and mGrpE on the oligomeric state of mhsp70. *J. Biol. Chem.* 272, 20901–20906.
- Baker, M., and Webb, C. (2009). Structural and functional requirements for activity of the Tim9–Tim10 complex in mitochondrial protein import. *Mol. Biol. ...* 20, 769–779.
- Becker, L., Bannwarth, M., Meisinger, C., Hill, K., Model, K., Krimmer, T., Casadio, R., Truscott, K.N., Schulz, G.E., Pfanner, N., et al. (2005). Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: reconstituted Tom40 forms a characteristic TOM pore. *J. Mol. Biol.* 353, 1011–1020.
- Becker, T., Wenz, L.-S., Thornton, N., Stroud, D., Meisinger, C., Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2011). Biogenesis of mitochondria: dual role of Tom7 in modulating assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *J. Mol. Biol.* 405, 113–124.
- Bien, M., Longen, S., Wagener, N., Chwalla, I., Herrmann, J.M., and Riemer, J. (2010). Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol. Cell* 37, 516–528.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., and Pfanner, N. (1999). Distribution of Binding Sequences for the Mitochondrial Import Receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a Presequence-carrying Preprotein and a Non-cleavable Preprotein. *J. Biol. Chem.* 274, 16522–16530.
- Dekker, P.J.T., Ryan, M.T., Brix, J., Müller, H., Honlinger, A., and Pfanner, N. (1998). Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane: Molecular Dissection and Assembly of the General Import Pore Complex. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6515–6524.
- Donzeau, M., Káldi, K., Adam, a, Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W., and Brunner, M. (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* 101, 401–412.
- Flinner, N., Ellenrieder, L., Stiller, S.B., Becker, T., Schleiff, E., and Mirus, O. (2013). Mdm10 is an ancient eukaryotic porin co-occurring with the ERMES complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3314–3325.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W., and Stuart, R. a (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J.* 15, 479–487.

- Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., et al. (2004). Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 226–233.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 63–77.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., and Lithgow, T. (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* *164*, 19–24.
- Gessmann, D., Flinner, N., Pfannstiel, J., Schlösinger, A., Schleiff, E., Nussberger, S., and Mirus, O. (2011). Structural elements of the mitochondrial preprotein-conducting channel Tom40 dissolved by bioinformatics and mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 1647–1657.
- Guo, Y., Cheong, N., Zhang, Z., De Rose, R., Deng, Y., Farber, S. a, Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2004). Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *J. Biol. Chem.* *279*, 24813–24825.
- Harsman, A., Niemann, M., Pusnik, M., Schmidt, O., Burmann, B.M., Hiller, S., Meisinger, C., Schneider, A., and Wagner, R. (2012). Bacterial origin of a mitochondrial outer membrane protein translocase: new perspectives from comparative single channel electrophysiology. *J. Biol. Chem.* *287*, 31437–31445.
- Heijne, G. Von (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* *5*, 1335–1342.
- Horst, M., Oppliger, W., Feifel, B., Schatz, G., and Glick, B.S. (1996). The mitochondrial protein import motor: dissociation of mitochondrial hsp70 from its membrane anchor requires ATP binding rather than ATP hydrolysis. *Protein Sci.* *5*, 759–767.
- Hutu, D., Guiard, B., and Chacinska, A. (2008). Mitochondrial protein import motor: differential role of Tim44 in the recruitment of Pam17 and J-complex to the presequence translocase. *Mol. Biol. ...* *19*, 2642–2649.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* *23*, 3735–3746.

Chan, N., and Lithgow, T. (2008). The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 19, 126–136.

Jedelský, P.L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smíd, O., Hrdý, I., Sedinová, M., Marcinčiková, M., Voleman, L., Perry, A.J., et al. (2011). The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* 6, e17285.

Kato, H., and Mihara, K. (2008). Identification of Tom5 and Tom6 in the preprotein translocase complex of human mitochondrial outer membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 958–963.

Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Müller, H., Jensen, R.E., Wagner, R., and Pfanner, N. (2002). Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol. Cell* 9, 363–373.

Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 48520–48523.

Krüger, V., Deckers, M., Hildenbeutel, M., van der Laan, M., Hellmers, M., Dreker, C., Preuss, M., Herrmann, J.M., Rehling, P., Wagner, R., et al. (2012). The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 287, 33314–33326.

Kulawiak, B., Höpker, J., Gebert, M., Guiard, B., Wiedemann, N., and Gebert, N. (2013). The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 612–626.

Künkele, K., Heins, S., and Dembowski, M. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009–1019.

Laan, M. Van Der, and Chacinska, A. (2005). Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. ... *Cell. Biol. Vol.* 25, N.

Van der Laan, M., Rissler, M., and Rehling, P. (2006). Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS Yeast Res.* 6, 849–861.

- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W., and Stuart, R. a. (1999). The DNA Helicase, Hmi1p, Is Transported into Mitochondria by a C-terminal Cleavable Targeting Signal. *J. Biol. Chem.* 274, 20937–20942.
- Lee, J., Hofhaus, G., and Lisowsky, T. (2000). Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477, 62–66.
- Li, Y., Dudek, J., Guiard, B., Pfanner, N., Rehling, P., and Voos, W. (2004). The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J. Biol. Chem.* 279, 38047–38054.
- Lionaki, E., de Marcos Lousa, C., Baud, C., Vougioukalaki, M., Panayotou, G., and Tokatlidis, K. (2008). The essential function of Tim12 in vivo is ensured by the assembly interactions of its C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 283, 15747–15753.
- Lohret, T. a, Jensen, R.E., and Kinnally, K.W. (1997). Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *J. Cell Biol.* 137, 377–386.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135, 1074–1084.
- Luo, W., Fang, H., and Green, N. (2006). Substrate specificity of inner membrane peptidase in yeast mitochondria. *Mol. Genet. Genomics* 275, 431–436.
- Mach, J., Poliak, P., Matušková, A., Žárský, V., Janata, J., Lukeš, J., and Tachezy, J. (2013). An Advanced System of the Mitochondrial Processing Peptidase and Core Protein Family in *Trypanosoma brucei* and Multiple Origins of the Core I Subunit in Eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* 5, 860–875.
- Meier, S., Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2005). Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 7777–7785.
- Meisinger, C., Ryan, M., and Hill, K. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins,. ... *Cell. Biol.*
- Miao, B., Davis, J.E., and Craig, E. a (1997). Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 265, 541–552.

- Michel, A.H., and Kornmann, B. (2012). The ERMES complex and ER-mitochondria connections. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 445–450.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* *279*, 22781–22785.
- Milisav, I., Moro, F., Neupert, W., and Brunner, M. (2001). Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J. Biol. Chem.* *276*, 25856–25861.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kühlbrandt, W., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2002). Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol. Biol.* *316*, 657–666.
- Mokranjac, D., Popov-Celeketić, D., Hell, K., and Neupert, W. (2005). Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J. Biol. Chem.* *280*, 23437–23440.
- Panneerselvam, P., Singh, L.P., Ho, B., Chen, J., and Ding, J.L. (2012). Targeting of pro-apoptotic TLR adaptor SARM to mitochondria: definition of the critical region and residues in the signal sequence. *Biochem. J.* *442*, 263–271.
- Rahman, B., Kawano, S., Yunoki-Esaki, K., Anzai, T., and Endo, T. (2014). NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the presequence and Tim50 core domain. *FEBS Lett.* *588*, 678–684.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N., and Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* *299*, 1747–1751.
- Roesch, K., Curran, S.P., Tranebjaerg, L., and Koehler, C.M. (2002). Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 477–486.
- Shih, P.M., and Matzke, N.J. (2013). Primary endosymbiosis events date to the later Proterozoic with cross-calibrated phylogenetic dating of duplicated ATPase proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12355–12360.
- Schapira, A.H. V (2012). Mitochondrial diseases. *Lancet* *379*, 1825–1834.
- Schiller, D. (2009). Pam17 and Tim44 act sequentially in protein import into the mitochondrial matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 2343–2349.

- Schreiner, B., Westerburg, H., Forné, I., Imhof, A., Neupert, W., and Mokranjac, D. (2012). Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 23, 4335–4346.
- Stroud, D. a, Becker, T., Qiu, J., Stojanovski, D., Pfannschmidt, S., Wirth, C., Hunte, C., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N., et al. (2011). Biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. *Mol. Biol. Cell* 22, 2823–2833.
- Sutak, R., Dolezal, P., Fiumera, H.L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P.J., Müller, M., and Tachezy, J. (2004). Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10368–10373.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22, 6448–6457.
- Šmíd, O., Matušková, A., Harris, S.R., Kučera, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutejová, E., Hirt, R.P., Embley, T.M., et al. (2008). Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *trichomonas vaginalis* and *giardia intestinalis*. *PLoS Pathog.* 4, e1000243.
- Thornton, N., Stroud, D. a, Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., and Becker, T. (2010). Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of alpha-helical outer membrane proteins. *J. Mol. Biol.* 396, 540–549.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., and Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172–176.
- Vögtle, F.-N., Burkhart, J.M., Rao, S., Gerbeth, C., Hinrichs, J., Martinou, J.-C., Chacinska, A., Sickmann, A., Zahedi, R.P., and Meisinger, C. (2012). Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1840–1852.
- Wagner, K., Gebert, N., Guiard, B., Brandner, K., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Pfanner, N., and Rehling, P. (2008). The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4251–4260.
- Wickner, W., and Lodish, H. (1985). Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* (80-.). 230.

Wideman, J.G., Go, N.E., Klein, A., Redmond, E., Lackey, S.W.K., Tao, T., Kalbacher, H., Rapaport, D., Neupert, W., and Nargang, F.E. (2010). in the Assembly of Mitochondrial Outer Membrane Proteins in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 21, 1725–1736.

Yamano, K., Yatsukawa, Y.-I., Esaki, M., Hobbs, A.E.A., Jensen, R.E., and Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* 283, 3799–3807.

Young, J.C., Hoogenraad, N.J., and Hartl, F.U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112, 41–50.

Žárský, V., Tachezy, J., and Doležal, P. (2012). Tom40 is likely common to all mitochondria. *Curr. Biol.* 22, R479–81; author reply R481–2.