

Michał Wasilewski✉

Katarzyna Chojnacka

Agnieszka Chacińska

Laboratorium Biogenezy Mitochondriów, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

✉Laboratorium Biogenezy Mitochondriów, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, ul. Trojdena 4, 02-109 Warszawa; tel.: (22) 597 07 70, e-mail: mwasilewski@iimcb.gov.pl

Artykuł otrzymano 29 kwietnia 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 19 maja 2016 r.

Słowa kluczowe: degradacja białek, import białek, mitochondria, obróbka proteolityczna, składanie kompleksów białkowych

Wykaz skrótów: IM (ang. *inner membrane*) – błona wewnętrzna; IMS (ang. *intermembrane space*) – przestrzeń międzybłonowa; MIA (ang. *mitochondrial IMS import and assembly machinery*) – mechanizm importu i składania białek w przestrzeni międzybłonowej; MPP (ang. *mitochondrial processing peptidase*) – mitochondrialna peptydaza biorąca udział w usuwaniu presekwencji; OM (ang. *outer membrane*) – błona zewnętrzna; PAM (ang. *presequence translocase-associated motor*) – motor importowy związany z translokazą ścieżki presekwencyjnej; SAM (ang. *sorting and assembly machinery*) – mechanizm sortowania i składania; TIM22 (ang. *inner membrane carrier translocase*) – translokaza białek typu „carrier”; TIM23 (ang. *inner membrane presequence translocase*) – translokaza ścieżki presekwencyjnej; TOM (ang. *translocase of the outer mitochondrial membrane*) – translokaza błony zewnętrznej

STRESZCZENIE

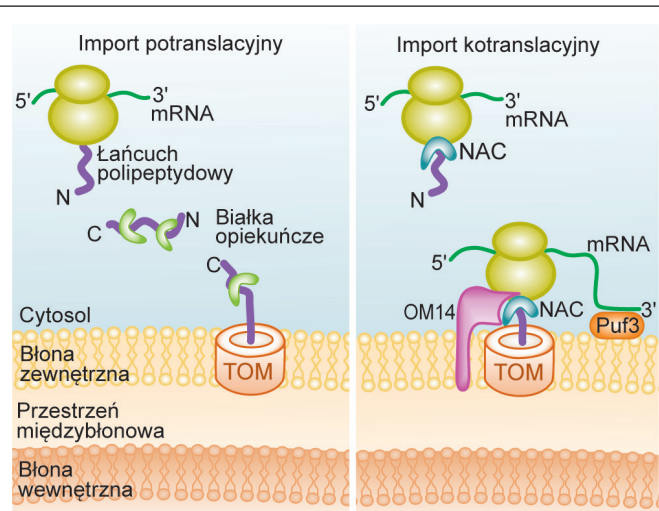
Mitochondria uczestniczą w wielu niezwykle ważnych procesach biologicznych, takich jak wytwarzanie energii, inne ścieżki biochemiczne oraz przekazywanie sygnałów w komórce. Proteom mitochondrialny, czyli zestaw wszystkich białek obecnych w mitochondriach, jest współtworzony przez około tysiąc białek, z których przytłaczająca większość (99%) powstaje w cytosolu na bazie matrycy genomowego DNA. Białka te są kierowane do mitochondriów i sortowane dzięki wyspecjalizowanym mechanizmom właściwym dla odpowiednich przedziałów mitochondrialnych. Białka mitochondrialne podlegają następnie modyfikacjom potranslacyjnym warunkującym ich dojrzewanie, a wiele z nich uczestniczy w tworzeniu kompleksów białkowych. Napływ nowych białek jest równoważony przez mechanizmy usuwające нефunkcjonalne białka. Artykuł jest poświęcony mechanizmom odpowiedzialnym za biogenezę białek mitochondrialnych, które mają kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek eukariotycznych.

WPROWADZENIE

Białka przeprowadzają większość z procesów chemicznych zachodzących w komórkach. Kontrola nad ich produkcją i homeostazą jest więc jednym z najważniejszych wyzwań dla organizmów żywych. W toku ewolucji wykształciły się złożone i ściśle kontrolowane procesy, które uczestniczą w powstawaniu, dojrzewaniu i degradacji białek. Powstanie przedziałów komórkowych narzuciło dodatkowy poziom komplikacji, ponieważ większość białek jest produkowana w cytosolu. Wiele białek jest transportowanych do docelowej lokalizacji. Jednym z przedziałów komórkowych, który ma decydującą rolę w funkcjonowaniu całej komórki, są mitochondria. Biogeneza białek mitochondrialnych jest szczególnie złożona, ponieważ mitochondria posiadają dwie błony, zewnętrzną (OM, ang. *outer membrane*) i wewnętrzną (IM, ang. *inner membrane*), które oddzielają od siebie przestrzeń międzybłonową (IMS, ang. *intermembrane space*) i macierz mitochondrialną. Ważną cechą charakterystyczną mitochondriów jest obecność własnego genomu. Koduje on jednak zaledwie 1% białek mitochondrialnych, zatem ogromna większość prekursorów białek mitochondrialnych jest produkowana w cytosolu na podstawie informacji zakodowanych w jądrowym DNA [1]. W efekcie prekursorzy mitochondrialni muszą korzystać z szeregu wyspecjalizowanych maszynarii, które kierują je do mitochondriów, a następnie segregują do właściwego przedziału. W mitochondriach prekursorzy białek dojrzewają dzięki modyfikacjom potranslacyjnym i często są włączane w zbudowane z wielu podjednostek kompleksy białkowe. Po wypełnieniu swoich funkcji, lub w wyniku uszkodzenia, białka podlegają ostatecznie degradacji i usunięciu. Poniższy artykuł przeglądowy ma na celu nakreślenie kluczowych osiągnięć kształtujących naszą wiedzę o procesach odpowiedzialnych za homeostazę białek mitochondrialnych.

IMPORT BIAŁEK DO MITOCHONDRIÓW

Import większości białek mitochondrialnych zachodzi potranslacyjnie, czyli już po zakończeniu ich syntezy przez rybosomy (Ryc. 1). We wszystkich znanych przypadkach prekursorzy białek są przenoszone przez OM za pośrednictwem kompleksu translokazy zewnętrznej błony mitochondrialnej (TOM, ang. *translocase of the outer mitochondrial membrane*) [2-8]. Import prekursorów białek przez kompleks TOM wymaga rozpoznania specyficznych sekwencji sygnałowych oraz skoordynowanych oddziaływań różnych elementów kompleksu TOM. Centralną podjednostką kompleksu TOM jest białko o topologii β -baryłki, Tom40, tworzące kanał błonowy, przez który prekursorzy białek są transportowane z cytosolu do wnętrza mitochondriów. Kompleks TOM jest również współtworzony przez podjednostki pomocnicze, które regulują jego strukturę i funkcję. Białka te dzielą się na dwie grupy: (i) podjednostki stałe kompleksu TOM, w skład których wchodzi centralny receptor Tom22 i małe białka Tom,



Rycina 1. Potrancyjny i kotranslacyjny import białek do mitochondriów. Prekursory białek mitochondrialnych powstają przy udziale rybosomów cytosolowych. Białka opiekuńcze biorą udział w imporcie potrancyjnym asystując przy przemieszczaniu się nowopowstałych prekursorów z rybosomów do kompleksu TOM. Import kotranslacyjny zakłada bezpośrednie przemieszczenie się łańcucha peptydowego na kompleks TOM. Rybosom jest związany z powierzchnią mitochondrialną przez białko OM14 oddziałujące z kompleksem towarzyszącym łańcuchowi peptydowemu NAC, oraz przez białko Puf3 oddziałujące z cząsteczką mRNA.

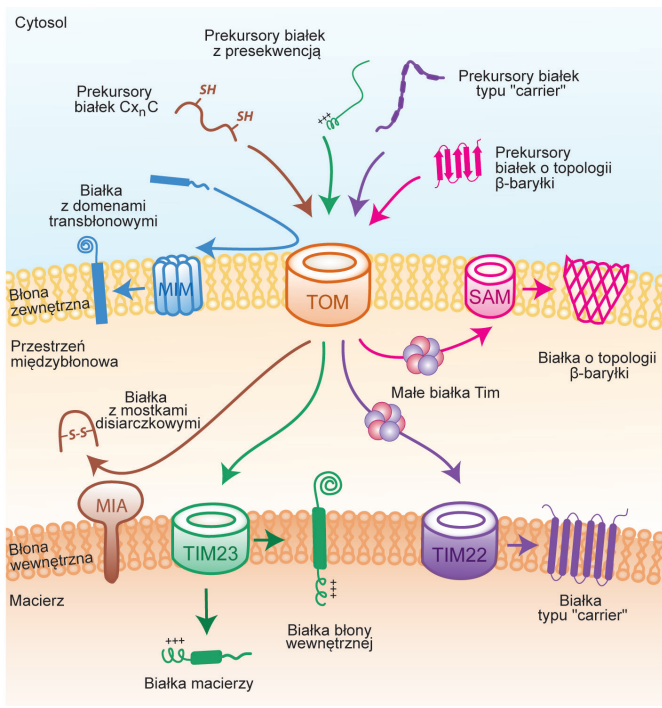
których zadaniem jest regulacja dynamiki kompleksu; (ii) luźno związane z kompleksem TOM peryferyczne białka receptorowe Tom70 i Tom20. To właśnie Tom70 i Tom20 jako pierwsze oddziałują z prekursorami białek, kiedy te docierają do mitochondriów. Rozpoznają one różne klasy importowanych białek na podstawie odmiennych cech ich struktury i kierują je na odpowiednie ścieżki biogenezy. Przemieszczanie się prekursorów białek przez kompleks TOM odbywa się dzięki sekwencyjnemu wiązaniu z domenami Tom5, Tom40 i Tom22 o zwiększającym się powinowactwie do prekursorów. Aktywność kompleksu TOM jest dodatkowo kontrolowana przez modyfikacje potrancyjne takie jak fosforylacja [6]. Tom70 może być fosforylowany przez kinazę białkową A, co hamuje jego aktywność i ogranicza import do mitochondriów prekursorów zależnych od tego receptora. Z kolei fosforylacja centralnego receptora Tom22 przez kinazę kazeinową 2 ułatwia składanie kompleksu TOM. Powyższe przykłady ukazują w jaki sposób kontrola importu białek mitochondrialnych jest włączona do ścieżek sygnałowych, które łączą procesy zachodzące w mitochondriach z innymi procesami komórkowymi. Nie wiadomo, czy również i inne translokazy mitochondrialne mogą być regulowane w podobny sposób.

Etap poprzedzający translokację przez kompleks TOM jest stosunkowo słabiej poznany. Prekursory mitochondrialne pozostają w cytoplazmie przez czas, jaki jest potrzebny, aby przemieścić się z rybosomów cytoplazmatycznych do powierzchni mitochondriów. W cytoplazmie są one utrzymywane w formie rozfałdowanej lub tylko częściowo sfaldowanej dzięki wiązaniu z cytosolowymi białkami opiekuńczymi, zapobiegającymi ich agregacji. Klasycznym przykładem prekursorów, które wymagają obecności białek opiekuńczych są białka przenośnikowe wewnętrznej

błony mitochondrialnej typu „carrier”, takie jak translokator ADP/ATP. Te transbłonowe, silnie hydrofobowe białka wymagają współdziałania białek opiekuńczych Hsp70 i Hsp90, które wiążą się z ich regionami hydrofobowymi i umożliwiają ich przedostanie się do receptora Tom70 kosztem hydrolizy ATP [9]. W trakcie tranzytu przez cytosol prekursorzy białek mitochondrialnych podlegają kontroli przez system degradacji białek zależny od ubiquityny i proteasomu. Co ciekawe, zwiększona obecność prekursorów w cytosolu odgrywa ważną rolę w zwrotnym przekazywaniu informacji o funkcjonalnym stanie mitochondriów [10]. Czas, jaki prekursorzy białek spędzają w cytosolu zależy prawdopodobnie od lokalizacji rybosomów odpowiedzialnych za translację danego transkryptu. Część prekursorów białek pomija ten etap, ponieważ mogą być one importowane kotranslacyjnie, a niektóre z nich, takie jak fumaraza i Sod2, wręcz wymagają aktywnej translacji do wydajnej translokacji. Wiele transkryptów kodujących białka mitochondrialne jest zlokalizowanych w bezpośrednim sąsiedztwie mitochondriów, za co odpowiadają takie białka jak Tom20 oraz białko wiążące mRNA Puf3 [11,12]. Dokowanie rybosomów do mitochondriów odbywa się prawdopodobnie przy udziale związanego z rybosomami kompleksu NAC (ang. *nascent chain associated complex*) i mitochondrialnego białka OM14 (Ryc. 1) [13-15]. Z kolei bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy rybosomami cytosolowymi a translokazami wykazano blokując rybosomy z nieukończonymi polipeptydami na skutek braku kodonu STOP w mRNA, tzw. „non stop” mRNA. Cząsteczki „non stop” mRNA nie tylko blokują działanie rybosomów, ale dodatkowo powodują zablokowanie kompleksów TOM przez łańcuchy polipeptydowe uwięzione w rybosomach. Komórki posiadają mechanizmy pozwalające na degradację zarówno wadliwego mRNA jak i pochodzących od niego polipeptydów [16,17]. Wydaje się prawdopodobne, że synteza i import białek mitochondrialnych podlegają koordynacji, co umożliwia zachowanie funkcjonalnej sieci mitochondrialnej.

ŚCIEŻKI SORTOWANIA BIAŁEK W MITOCHONDRiach

Ścieżka biogenezy, której podlega konkretny prekursor białka, jest określona przez specyficzne sygnały zakodowane w jego strukturze (Ryc. 2). Większość białek mitochondrialnych jest importowana dzięki klasycznej ścieżce wymagającej obecności specyficznego sygnału zlokalizowanego na N-końcu białka, zwanego presekwencją [3,4,6,18,19]. Jest to amfipatyczna helisa, która ulega odcięciu wewnątrz macierzy mitochondrialnej w trakcie dojrzewania białka. Po przekroczeniu OM białka zawierające presekwencję są rozpoznawane przez translokazę wewnętrznej błony mitochondrialnej (TIM23, ang. *inner membrane presequence translocase*) (Ryc. 2). Pierwszą z podjednostek kompleksu TIM23, która przechwytuje prekursor wyłaniający się z kompleksu TOM, jest białko Tim50. Białko to wspomaga translokację presekwencji do kanału kompleksu TIM23 tworzonego przez podjednostki Tim23 i Tim17. Translokacja przez TIM23 wymaga obecności potencjału elektrochemicznego wewnętrznej błony mitochondrialnej, który umożliwia elektroforetyczne przemieszczenie się dodatnio naładowanej presekwencji przez kanał translokazy. Całkowite przemieszczenie się białka do macierzy mitochondrialnej jest możliwe dzięki zaangażowaniu motoru importowego PAM



Rycina 2. Klasyczne ścieżki importu białek do mitochondriów. Komplex TOM stanowi wspólny element dla wielu ścieżek importu białek. Prekursory białek zakotwiczone N-końcem w OM są wbudowywane w błonę przez kompleks MIM. Prekursory białek IMS bogatych w reszty cysteinowe wykorzystują „pulpkę oksydacyjną” tworzoną przez ścieżkę MIA, która wprowadzając mostki disiarczkowe do prekursorów inicjuje ich fałdowanie. Komplex TIM23 uczestniczy w imporcie prekursorów białek macierzy i IM posiadających presekwencję. Prekursory białek typu „carrier” IM są importowane przy udziale małych białek opiekuńczych Tim i translokazy TIM22. Prekursory białek o topologii β-baryłki również oddziałują z białkami Tim i są integrowane z OM przez kompleks SAM.

(ang. *presequence translocase-associated motor*), który łączy się z kompleksem TIM23. Centralną podjednostką PAM jest mitochondrialne Hsp70, które narzuca kierunkowe przemieszczanie się prekursorów białkowych dzięki cyklicznemu wiązaniu i hydrolizie ATP [3,4,6,18,19].

Translokaza TIM23 uczestniczy również w biogenezie białek IM, które posiadają presekwencję i przynajmniej jedną domenę transbłonową. Wczesne etapy biogenezy tych białek do momentu przemieszczenia przez kompleks TIM23 są podobne do klasycznej ścieżki presekwencyjnej. Pełne przemieszczenie się prekursora do macierzy jest blokowane przez hydrofobową domenę zlokalizowaną poniżej presekwencji służącą jako sygnał „stop-transfer”. W biogenezie tych białek uczestniczy kompleks TIM23^{SORT}, który jest wyspecjalizowany w sortowaniu białek do błony [3,6,19]. Nie łączy się on z kompleksem PAM natomiast posiada dodatkową podjednostkę Tim21. Białko Tim21 umożliwia również bezpośrednie połączenie pomiędzy TIM23^{SORT} a kompleksami III i IV łańcucha oddechowego, co może wskazywać na koordynację importu białek z biogenezą kompleksów błonowych. Za lokalizację białek do macierzy lub IM odpowiada więc kombinacja sygnałów rozszyfrowywana przez elementy ścieżki presekwencyjnej.

Większość białek mitochondrialnych kierowanych do OM i IM oraz do IMS nie posiada presekwencji. Do takich białek należą białka typu „carrier”, białka o topologii

β-baryłki i rozpuszczalne białka bogate w cysteiny zlokalizowane w IMS. Rodzina białek typu „carrier”, do której zalicza się translokator ADP/ATP, transportuje metabolity i jony w poprzek IM. Prekursory białek typu „carrier” są rozpoznawane przez Tom70, a całkowita translokacja przez kompleks TOM jest ułatwiana dzięki wiązaniu prekursorów po wewnętrznej stronie błony przez kompleksy białek opiekuńczych tworzone przez małe białka Tim [4,18]. Wiązanie z małymi białkami Tim chroni silnie hydrofobowe prekursory przed niechcianymi oddziaływaniami przy przekraczaniu IMS oraz umożliwia ich dokowanie do translokazy białek typu „carrier” (TIM22, ang. *inner membrane carrier translocase*), która jest wyspecjalizowana w integracji do błony białek o wielu domenach transbłonowych. Rdzeń kompleksu TIM22 stanowi dimer Tim22 oraz towarzyszące mu Tim54, Tim18 i Sdh3, które odgrywają rolę w składaniu kompleksu TIM22 oraz w dokowaniu kompleksów białek opiekuńczych i prekursorów [4, 18]. Podobnie jak w przypadku ścieżki presekwencyjnej również import prekursorów białek typu „carrier” jest wspierany przez potencjał elektrochemiczny wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Małe białka opiekuńcze Tim biorą również udział w imporcie białek błonowych o topologii β-baryłki, takich jak poryny i białko Tim40, które w komórkach grzybów i zwierząt występują wyłącznie w OM [2,4,20]. Wprowadzenie białek o topologii β-baryłki do błony następuje od strony IMS po uprzednim przekroczeniu OM za pośrednictwem kompleksu TOM. W IMS prekursory białek o topologii β-baryłki są rozpoznawane przez małe białka Tim i kierowane do kompleksu maszynierii sortowania i składania (SAM, ang. *sorting and assembly machinery*) w OM. Komplex SAM rozpoznaje prekursory dzięki sygnałowi beta zakodowanemu w ich C-terminalnej części i wbudowuje je do błony [21]. Komplex SAM uczestniczy również we wczesnych etapach składania kompleksów zawierających białka o topologii β-baryłki, takich jak kompleks TOM. Współdziała przy tym z wielofunkcyjnymi białkami takimi jak Mdm10 i Mdm12, które dodatkowo uczestniczą w kontroli architektury mitochondriów i ich kontaktach z siateczką śródplazmatyczną [22].

Wiele białek rezydujących w IMS odznacza się charakterystycznymi motywami zawierającymi cysteiny, które są dobrze zachowane ewolucyjnie. Cysteiny te są zredukowane dopóki prekursory białek przebywają w cytosolu, natomiast w IMS ulegają szybkiemu utlenieniu za pośrednictwem mechanizmu importu i składania białek w przestrzeni międzybłonowej (MIA, ang. *mitochondrial IMS import and assembly machinery*) (Ryc. 2) [23,24]. Umożliwia to fałdowanie białek i ich uwięzienie w IMS. Utlenienie reszt cysteinowych następuje dzięki skoordynowanej aktywności dwóch niezbędnych komponentów ścieżki MIA - Mia40 i Erv1, a poprawność utworzonych mostków disiarczkowych podlega kontroli przez zredukowaną pulę glutationu, która ogranicza tworzenie nefunkcjonalnych stanów pośrednich utlenienia [25,26]. Dzięki temu ścieżka MIA może działać nawet w redukującym środowisku IMS, która dzięki nieograniczonemu przepływowi małych metabolitów przez OM utrzymuje potencjał redoks zbliżony do cytosolu. Mia40 rozpoznaje prekursory białkowe natychmiast po ich translokacji przez kompleks TOM dzięki hydrofobowemu sygnałowi MISS/ITS (ang. *Mitochondria IMS-sorting signal/*

IMS-targeting signal) zawierającemu cysteiny [27-29]. Mia40 jest integralnym białkiem IM, co nasuwa pytanie, w jaki sposób białka prekursorowe wchodzą w kontakt z Mia40, zwłaszcza biorąc pod uwagę tworzenie przez IM grzebieni zwanych *crisetae*. Proces ten jest możliwy dzięki lokalizacji Mia40 w peryferycznej strefie IM w pobliżu OM i kompleksu TOM dzięki oddziaływaniu z białkiem Mic60 [29]. Współdziałanie Mic60, Mia40 i TOM jest przykładem ciekawego mechanizmu, w którym poprawne zlokalizowanie Mia40 w sąsiedztwie kompleksu TOM wpływa pozytywnie na aktywność całej ścieżki MIA. Mechanizm ten może być bardziej rozpowszechniony, ponieważ Mic60 jest centralną podjednostką kompleksu MICOS (ang. *mitochondrial contact site and cristae organizing system*) odpowiedzialnego za wyjątkową architekturę IM, który oddziałuje z wieloma kompleksami białkowymi w obu błonach mitochondrialnych [22,29-33].

Ścieżka MIA może mieć również pewien wpływ na akumulację w mitochondriach niektórych białek spoza IMS. Do takich białek należą Tim22, p53, Mrp10 i Ape1, które na różnych etapach importu do IM lub macierzy mitochondrialnej oddziałują z Mia40 [34-37].

Podsumowując, sygnały zawarte w strukturze prekursorów białek są odkodowywane przez specyficzne translokazy, co pozwala na właściwą lokalizację białek w mitochondriach (Ryc. 2). Translokazy mitochondrialne są wielofunkcyjnymi kompleksami, które realizują szereg zadań takich jak (i) rozpoznawanie prekursorów białek (funkcja receptora), (ii) ich translokacja przez błony (funkcja kanału), (iii) integracja z błoną (funkcja integrazy) oraz przeciwdziałanie spontanicznym i niekorzystnym oddziaływaniom prekursorów białek (funkcja opiekuńcza). Utrzymanie prawidłowej funkcji translokaz mitochondrialnych jest więc konieczne do zachowania równowagi białkowej i integralności mitochondriów.

POBOCZNE ŚCIEŻKI IMPORTU I ICH ODDZIAŁYWANIA Z GŁÓWNYMI TRANSLOKAZAMI

Oprócz głównych ścieżek importu, które tworzą opisane wcześniej TIM23, TIM22, SAM oraz MIA, coraz więcej danych wskazuje na obecność specyficznych mechanizmów wyspecjalizowanych w imporcie niewielkich klas czy nawet pojedynczych rodzajów białek. Przykładem takich mechanizmów może być biogeneza białek OM o pojedynczej α -helikalnej domenie transbłonowej [2,20]. W odróżnieniu od wspomnianych już białek o topologii β -baryłki większość z nich jest wbudowywana od strony cytoplazmatycznej, nie wymaga więc transportu do IMS. Rola kompleksu TOM w imporcie tej klasy białek wymaga prawdopodobnie utworzenia innego rodzaju kanału niż ten używany przez pozostałe ścieżki importu. Rozfałdowanie β -baryłki tworzącej kanał białka Tom40, konieczne do poziomego uwolnienia prekursora do błony, byłoby zbyt kosztownie energetycznie. Bardziej prawdopodobne jest więc tworzenie kanału pomiędzy kilkoma podjednostkami Tom40, który z łatwością mógłby uwalniać białka do błony poprzez rozdysocjowanie podjednostek. Taki mechanizm został zaproponowany na podstawie doświadczeń z białkami fuzyjnymi zablokowanymi w kompleksie TOM [38]. Możliwe są rów-

nież inne scenariusze, w których białka korzystają jedynie z zewnętrznej powierzchni kompleksu TOM na styku z błoną lub są wbudowywane w błonę niezależnie od niego.

W przypadku niektórych białek, których domena transbłonowa znajduje się na N-końcu, takich jak Tom20 i Tom70, integracja z błoną jest ułatwiana przez insertazę Mim1 (Ryc. 1) [39-41]. Ciekawym przykładem importu prekursorów kotwiczonych na N-końcu jest białko OM45. W przeciwieństwie do wszystkich innych opisanych przypadków OM45 znajduje się po wewnętrznej stronie OM. Aby osiągnąć tę wyjątkową topologię jest ono najpierw translokowane do IMS przez kompleks TOM, w czym uczestniczy również translokaza TIM23. Następnie insertaza Mim1 inkorporuje białko OM45 do właściwego kompleksu w OM [8]. W przypadku białek zakotwiczonych w błonie C-końcem jak dotychczas nie stwierdzono udziału analogicznych czynników białkowych i wydaje się, że to skład lipidowy błony może odgrywać w tym procesie decydującą rolę [42-44]. Interesujący jest także przypadek białka Tom22, kotwiczono domena na C-końcu, którego integracja z błoną wymaga zarówno obecności kompleksu TOM jak i SAM [45]. Białka błonowe o C-końcowej domenie transbłonowej występują w wielu innych przedziałach komórkowych. Ich integracja z błoną, niezależnie od końcowej lokalizacji, zachodzi w siateczce śródplazmatycznej skąd białka trafiają do docelowych przedziałów na drodze transportu pęcherzykowego. Transport nowo wyprodukowanych białek z rybosomów do błony siateczki śródplazmatycznej odbywa się przy udziale mechanizmu GET (ang. *Golgi to ER traffic*), ale jak dotychczas nie wykazano jego udziału w biogenezie białek mitochondrialnych [46]. Nasuwa się pytanie, w jaki sposób białka mitochondrialne o C-końcowej domenie transbłonowej są odróżniane od pozostałych białek o podobnej topologii. Podsumowując, biogeneza białek OM przebiega wieloma ścieżkami, które nie są jeszcze w pełni opisane. Dziedzina ta jest bardzo atrakcyjna ze względu na mnogość procesów w których uczestniczy OM, takich jak kontrola architektury mitochondriów, mitofagia, biogeneza białek czy programowana śmierć komórkowa.

Podobnie jak w przypadku OM, także w IMS są zlokalizowane białka, których import różni się od klasycznych ścieżek. Dotyczy to na przykład mitochondrialnych liaz hemowych, których import jest prawdopodobnie napędzany poprzez ich silne oddziaływanie z innymi białkami w IMS oraz ich fałdowaniu [47]. Z kolei białka Ups1 i Ups2 biorące udział w transporcie lipidów są importowane do IMS dzięki oddziaływaniu z białkiem Mdm35 [48]. Inny przykładem jest białko Sod1 odpowiedzialne za obronę przed reaktywnymi formami tlenu w cytosolu, którego niewielka subpopulacja rezyduje również w IMS. Translokacja Sod1 do IMS zależy częściowo od białka opiekuńczego Ccs1 odpowiedzialnego za wprowadzenie jonów miedzi koniecznych do poprawnego sfałdowania białka, a częściowo od białka Mia40 i kompleksu MICOS. W przytoczonych przykładach kierunkowe przemieszczanie się białek do IMS jest wspomagane przez ich fałdowanie po wewnętrznej stronie błony, co uniemożliwia ich cofnięcie do cytosolu. Niedawne odkrycia sugerują, że proces ten może być odwrócony. Niektóre rozpuszczalne białka IMS ulegają rozfałdowaniu, a następnie są uwalniane z mitochondriów za pośrednic-

twem białka Tom40 i degradowane w cytosolu przez proteasom [49]. Odwrócona translokacja białek mogłaby służyć inaktywacji mitochondriów w warunkach obniżonego zapotrzebowania na energię na drodze wydajnego usuwania części proteomu mitochondrialnego.

Białka kodowane przez genom mitochondrialny są produkowane przez rybosomy w macierzy mitochondrialnej i podlegają mechanizmowi integracji z IM. Choć nieliczna, około 1% proteomu mitochondrialnego, grupa ta pełni jednak istotną rolę w funkcjonowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Integracja tych białek z IM od strony macierzy nazywana jest „eksportem białek”. Bierze w niej udział szereg białek, z których najlepiej poznane jest Oxa1; jest to białko o sekwencji w wysokim stopniu zachowanej w ewolucji, występuje zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych [50]. Oxa1 tworzy kanał błonowy i jednocześnie oddziałuje z rybosomami macierzy, co wskazuje na kotranslacyjny przebieg integracji z błoną. Co ciekawe, Oxa1 może również wspomagać import białek produkowanych w cytosolu, takich jak transbłonowe białko Mdl1, należące do klasy transporterów ABC [51]. Mdl1 posiada trzy domeny, w skład których wchodzi po dwa regiony transbłonowe. Pierwsza i ostatnia domena jest integrowana z błoną przez kompleks TIM23, natomiast trzecia domena jest w całości importowana do macierzy w procesie zależnym od Hsp70. Następnie jest ona kierowana do Oxa1 i integrowana z błoną w procesie analogicznym do „eksportu białek”. Biogeneza Mdl1 jest więc przykładem połączenia dwóch niezależnych szlaków, TIM23 i Oxa1, w celu zapewnienia właściwej topologii białka o skomplikowanej strukturze.

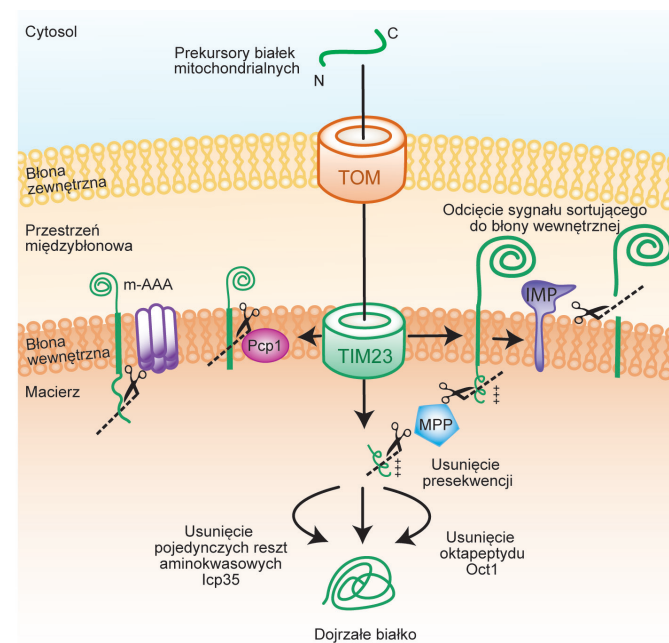
Inny przykład procesu eksportu z macierzy dotyczy białka Rieske, podjednostki kompleksu III łańcucha oddechowego, które jest zintegrowane z IM i eksponuje do IMS kluczową domenę zawierającą centrum żelazowo-siarkowe. Prekursor białka Rieske podlega najpierw importowi do macierzy mitochondrialnej, gdzie wiąże kofaktor, centrum żelazowo-siarkowe, dzięki czemu przyjmuje częściowo sfałdowaną konformację. Następnie jest ono wbudowywane w IM przez białko Bcs1, należące do wysoko zachowanej ewolucyjnie rodziny białek AAA+, której przedstawiciele pełnią wiele funkcji w komórce [52]. Mechanizm ten może więc świadczyć o istnieniu specyficznych mechanizmów importu dla poszczególnych białek mitochondrialnych.

DOJRZEWANIE BIAŁEK MITOCHONDRIALNYCH

Po osiągnięciu przez prekursor białkowy docelowej lokalizacji następuje etap dojrzewania białka, często połączony ze składaniem kompleksów białkowych. Dla dużej części białek importowanych przez kompleks TIM23 do macierzy lub IM oznacza to usunięcie presekweny przez mitochondrialną proteazę MPP (ang. *mitochondrial processing peptidase*) (Ryc. 3) [53,54]. Chociaż odcięcie presekweny nie jest funkcjonalnie powiązane z translokacją białka prekursorowego przez błonę, to następuje wkrótce po pojawieniu się N-końca w macierzy. W przypadku szeregu białek dochodzi do dalszej proteolizy przez dodatkowe proteazy Icp55 i Oct1 [55,56]. Ma to związek z regułą N-końca, która stanowi, że okres życia białka jest związany z resztą aminokwasową

eksponowaną na końcu N [57]. W niektórych przypadkach usunięcie presekweny przez MPP prowadzi do ekspozycji aminokwasu o właściwościach destabilizujących. Zarówno Icp55 jak i Oct1 mogą usuwać reszty aminokwasowe na kolejnych pozycjach prowadząc do odsłonięcia aminokwasu stabilizującego. Prowadzi to do stabilizacji białek mitochondrialnych i udowadnia, że zasada N-końca nie ogranicza się do bakterii i cytosolu komórek eukariotycznych, ale obowiązuje także w mitochondriach [55,56].

Dojrzewanie białek poprzez proteolizę zachodzi również w IMS. Znanych jest kilka przykładów rozpuszczalnych białek IMS, których prekursorzy posiadają presekwenę i hydrofobowy sygnał sortowania do IM. Odcięcie hydrofobowej domeny już po integracji białka z błoną uwalnia je do IMS. Najlepiej poznany przykładem jest cytochrom b_2 , którego proteoliza jest katalizowana przez peptydazę IMP (ang. *inner membrane peptidase*) [53,54]. Inne białka podlegające podobnemu procesowi to Ccp1 i Mgm1, które są trawione przez proteazę romboidalną Pcp1. Mgm1 jest GTPazą o dużym stopniu zachowania ewolucyjnego odpowiedzialną za fuzję mitochondriów. Podobnie jak u drożdży Mdm1, tak i u wyższych organizmów eukariotycznych jego ortolog Opa1 podlega trawieniu, w wyniku którego do IMS uwalniana jest forma rozpuszczalna białka. Proteaza odpowiedzialna za ten proces nie została jak dotąd bezdyskusyjnie zidentyfikowana, choć najwięcej danych wskazuje na białko i-AAA z rodziny AAA+ lub na metaloproteazę Oma1 [58]. Niezależnie od tego, która z proteaz odpowiada za cięcie Opa1, proces ten prowadzi do współistnienia rozpuszczalnej i zakotwiczonej w błonie formy białka. Równowaga po-



Rycina 3. Proteolityczna obróbka białek mitochondrialnych. Translokacja białek przez kompleks TIM23 zależy od N-końcowej presekweny, która ulega odcięciu w macierzy mitochondrialnej przez mitochondrialną peptydazę MPP. W niektórych przypadkach N-końcówce podlega dodatkowym modyfikacjom proteolitycznym przez peptydazy Icp35 i Oct1 wpływającym na stabilność dojrzałego białka. Białka z presekweną uwalniane poziomo do IM mogą podlegać trawieniu przez peptydazę błony wewnętrznej IMP, dzięki czemu odcinany jest sygnał hydrofobowy, a dojrzałe białko zostaje uwolnione do IMS. Dodatkowo peptydazy takie jak Pcp1 i m-AAA uczestniczą w specyficznej obróbce niektórych białek zakotwiczonych w IM lub obecnych w macierzy mitochondrialnej.

między obydwoma formami warunkuje prawidłowe działanie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie odpowiedniej morfologii sieci mitochondrialnej.

Proteoliza białek w trakcie ich dojrzewania jest również prowadzona przez enzymy zakotwiczone w IM od strony macierzy. Szczególnie istotna jest obróbka podjednostek rybosomu mitochondrialnego takich jak MrpL32, który jest trawiony przez proteazę m-AAA należącą do rodziny AAA+ [59]. Trawienie MrpL32 jest konieczne do prawidłowego funkcjonowania rybosomu i zaburzenie tego procesu jest związane z chorobami układu nerwowego. Tak więc proteolityczna obróbka białek mitochondrialnych jest prowadzona zarówno przez wyspecjalizowane enzymy jak i przez proteazy odpowiedzialne za degradację białek, takie jak AAA+.

SKŁADANIE BIAŁEK MITOCHONDRIALNYCH

Biogeneza białek mitochondrialnych uwięczona jest ich fałdowaniem i składaniem kompleksów zbudowanych z wielu podjednostek, takich jak chociażby kompleksy łańcucha oddechowego. Procesy te są wspomagane przez białka opiekuńcze, które odpowiadają za ich prawidłowy przebieg i chronią niedojrzałe białka przed agregacją i degradacją. W mitochondriach obecne są białka z głównych rodzin białek opiekuńczych znanych z cytosolu takich jak Hsp70, Hsp60 i Hsp100 (Hsp78 w mitochondriach) wykazujące specyficzność w stosunku do szerokiej gamy białek [60]. Znane są również bardziej specyficzne białka opiekuńcze, jak na przykład te odpowiedzialne za biogenezę centrów żelazowo-siarkowych [61]. Mniej wiadomo o fałdowaniu białek w IMS i tworzeniu z nich funkcjonalnych kompleksów. Ważną rolę odgrywa tam ścieżka MIA, która katalizuje fałdowanie białek wprowadzając do nich mostki disiarczkowe. Rola ścieżki MIA wykracza jednak poza te ramy, ponieważ znane są przykłady inicjacji fałdowania białek bez udziału oksydacji reszt tiolowych [62,63]. Inne białka, takie jak proteaza Yme1 współtworząca i-AAA, również mogą uczestniczyć w fałdowaniu białek w IMS [64]. Podwójna rola białek odpowiedzialnych za import lub kontrolę jakości białek z jednej strony, oraz ich fałdowanie z drugiej, wskazuje na silne, funkcjonalne powiązanie tych procesów.

IM jest niezwykle bogata w białka, które często tworzą skomplikowane kompleksy składające się z wielu podjednostek. W wielu przypadkach poszczególne kompleksy białkowe mogą oddziaływać ze sobą tworząc struktury o wyższym poziomie złożoności zwane superkompleksami. Dobrze opisanym przykładem tego zjawiska są superkompleksy łańcucha oddechowego czy oligomery kompleksu syntazy ATP [65,66]. Tworzenie takich struktur służy nie tylko wydajniejszemu upakowaniu kompleksów w błonie, ale ma również implikacje funkcjonalne. W przypadku syntazy ATP skupiska oligomerów nadają odpowiednią krzywiznę błonie, co pozwala na tworzenie grzebieni mitochondrialnych i tym samym na zwiększenie powierzchni IM [65]. Wiele kompleksów białkowych wykazuje niejednorodne rozmieszczenie w IM dzieląc się na te występujące w regionach błony bliskich OM i te rezydujące głównie w grzebieniach mitochondrialnych [67-69]. Niedawno zidentyfikowano kompleks białkowy MICOS odpowiedzialny

za ciągłość obu stref IM, który jest zaangażowany w utrzymanie charakterystycznej architektury IM oraz prawdopodobnie dynamiczną segregację kompleksów białkowych [29-33,70].

DEGRADACJA BIAŁEK MITOCHONDRIALNYCH

Uszkodzone, nieprawidłowo sfałdowane lub niewłaściwie zintegrowane z kompleksami docelowymi białka stanowią zagrożenie dla homeostazy komórkowej. Mitochondria nie są wyjątkiem od tej reguły. Do tej pory opisaliśmy procesy związane z transportem, sortowaniem, dojrzewaniem i składaniem białek mitochondrialnych w kompleksy. Nieprawidłowości na którymkolwiek z tych etapów prowadzą do gromadzenia się potencjalnie szkodliwych białek, które muszą być usuwane z mitochondriów [53,71,72]. Mitochondria dysponują szeregiem mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę jakości. W każdym z przedziałów mitochondrialnych działają proteazy odpowiedzialne za rozpoznanie i degradację błędnie sfałdowanych lub niewłaściwie rozmieszczonych białek. Są to enzymy oligomeryczne zależne od ATP o dużym stopniu zachowania ewolucyjnego, takie jak PIM1/Lon i ClpXP w macierzy mitochondrialnej, m-AAA w IM skierowane do macierzy i i-AAA w IM skierowane do IMS. Zarówno i-AAA jak i m-AAA mogą degradować białka błonowe jak i białka rozpuszczalne odpowiednio z IMS i macierzy. I tak nieprawidłowo sfałdowane małe białka Tim lub białka odpowiedzialne za transport lipidów Ups1/2 podlegają degradacji przez i-AAA [48,73]. Potwierdza to konieczność usuwania niedojrzałych białek z tłoczego środowiska mitochondriów.

Oprócz wymienionych proteaz w mitochondriach działają również inne peptydazy, takie jak Oma1 lub zlokalizowane w IMS Prd1 i Mop112, które dodatkowo zwiększają możliwości proteolitycznej obróbki białek [53,72]. Mitochondrialne systemy kontroli jakości białek są uzupełnione przez mechanizmy operujące na zewnątrz mitochondriów kontrolowane przez ubikwitylację [53,74]. W warunkach stresu białka OM eksponowane do cytosolu mogą być degradowane przez proteasom przy udziale kompleksu Cdc48, związanego z systemem kontroli jakości białek siateczki śródplazmatycznej [75-77]. Ponadto szereg ligaz ubikwitylowych jest związanych z OM [78,79]. W warunkach ograniczonego importu do mitochondriów proteasom może również kontrolować poziom mitochondrialnych prekursorów białek w cytoplazmie [10,53,74].

Dojrzewanie białek mitochondrialnych w macierzy prowadzi do nieustannego gromadzenia się peptydów, które muszą być wydajnie usuwane. Jedną z peptydaz bezpośrednio zaangażowanych w ich trawienie jest Cym1/PreP. Peptydy mogą również być eksportowane na zewnątrz mitochondriów za pośrednictwem wyspecjalizowanego białka przenośnikowego w IM. Proces ten odgrywa również rolę w aktywacji odpowiedzi komórki na stres mitochondrialny [80].

Kolejny stopień w hierarchii kontroli jakości to usuwanie mitochondriów łącznie z całym garniturem białek na ścieżce mitofagii. Proces ten dotyczy uszkodzonych mitochondriów, które są rozpoznawane i selektywnie degradowane

w autolizosomie [53,71,81]. Informacja o funkcjonalności mitochondriów jest integrowana na powierzchni błony zewnętrznej, która posiada receptory odpowiedzialne za inicjowanie procesów autofagii. W pierwszym rzędzie usuwane są zdepolaryzowane mitochondria, które są identyfikowane przy udziale ligazy ubikwitylowej E3 Parkin i kinazy PINK1. Mutacje tych białek są związane z rodzinnymi formami choroby Parkinsona [82].

PODSUMOWANIE

Powyższa praca przeglądowa podsumowuje osiągnięcia stojące przed niezwykle ciekawą i intensywnie rozwijaną dziedziną jaką jest biogeneza mitochondriów. Mitochondria biorą udział w wielu kluczowych przemianach metabolicznych i szlakach przekazywania sygnałów w komórce. Produkcja, import i dojrzewanie białek mitochondrialnych mają więc trudną do przecenienia rolę w podtrzymywaniu życia organizmów eukariotycznych. Wadliwa biogeneza białek mitochondrialnych, jak i zaburzenia kontroli ich jakości, rzutują na homeostazę białek w całej komórce. Mitochondria mogą więc uczestniczyć w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych, które cechuje zaburzona równowaga białkowa. Procesy odpowiedzialne za import i dojrzewanie białek oraz ich degradację nie powinny być rozpatrywane w oderwaniu od siebie. Uczestniczą one bowiem w tworzeniu równowagi i zaburzenie któregokolwiek z procesów wpływa na pozostałe. Dogłębne poznanie tych procesów zarówno na poziomie mechanistycznym jak i prawidłowe osadzenie ich w kontekście wielostronnych zależności w obrębie całej komórki jest konieczne dla zrozumienia dysfunkcji mitochondriów w procesach patologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13207-13212
- Becker T, Bottinger L, Pfanner N (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem Sci* 37: 85-91
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644
- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 723-749
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 655-667
- Schulz C, Schendzielorz A, Rehling P (2015) Unlocking the presequence import pathway. *Trends Cell Biol* 25: 265-275
- Sokol AM, Sztolsztener ME, Wasilewski M, Heinz E, Chacinska A (2014) Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS Lett* 588: 2484-2495
- Wenz LS, Opalinski L, Wiedemann N, Becker T (2015) Cooperation of protein machineries in mitochondrial protein sorting. *Biochim Biophys Acta* 1853: 1119-1129
- Zara V, Ferramosca A, Robitaille-Foucher P, Palmieri F, Young JC (2009) Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90. *Biochem J* 419: 369-375
- Topf U, Wrobel L, Chacinska A (2016) Chatty Mitochondria: Keeping balance in cellular protein homeostasis. *Trends Cell Biol* DOI: 10.1016/j.tcb.2016.03.002

- Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T, Gerber AP, Pines O, Rapaport D, Arava Y (2010) Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 30: 284-294
- Quenault T, Lithgow T, Traven A (2011) PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol* 21: 104-112
- Funfschilling U, Rospert S (1999) Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell* 10: 3289-3299
- Lesnik C, Cohen Y, Atir-Lande A, Schuldiner M, Arava Y (2014) OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports cotranslational import into mitochondria. *Nat Commun* 5: 5711
- Yogev O, Karniely S, Pines O (2007) Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo. *J Biol Chem* 282: 29222-29229
- Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21: 1833-1856
- Izawa T, Tsuboi T, Kuroha K, Inada T, Nishikawa S, Endo T (2012) Roles of dom34:hbs1 in nonstop protein clearance from translocators for normal organelle protein influx. *Cell Rep* 2: 447-453
- Dudek J, Rehling P, van der Laan M (2013) Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* 1833: 274-285
- Mokranjac D, Neupert W (2010) The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1045-1054
- Dukanovic J, Rapaport D (2011) Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808: 971-980
- Kutik S, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Kruger V, Prinz C, Meisinger C, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Wiedemann N (2008) Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* 132: 1011-1024
- Horvath SE, Rampelt H, Oeljeklaus S, Warscheid B, van der Laan M, Pfanner N (2015) Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria. *Protein Sci* 24: 277-297
- Herrmann JM, Riemer J (2012) Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. *J Biol Chem* 287: 4426-4433
- Stojanovski D, Bragoszewski P, Chacinska A (2012) The MIA pathway: a tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1142-1150
- Bien M, Longen S, Wagener N, Chwalla I, Herrmann JM, Riemer J (2010) Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol Cell* 37: 516-528
- Stojanovski D, Milenkovic D, Muller JM, Gabriel K, Schulze-Specking A, Baker MJ, Ryan MT, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A (2008) Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase. *J Cell Biol* 183: 195-202
- Milenkovic D, Ramming T, Muller JM, Wenz LS, Gebert N, Schulze-Specking A, Stojanovski D, Rospert S, Chacinska A (2009) Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell* 20: 2530-2539
- Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Tokatlidis K (2009) A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol* 187: 1007-1022
- von der Malsburg K, Muller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, Hutu DP, Zerbes RM, Schulze-Specking A, Meyer HE, Martinou JC, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, van der Klei IJ, Pfanner N, Chacinska A, van der Laan M (2011) Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell* 21: 694-707
- Alkhaja AK, Jans DC, Nikolov M, Vukotic M, Lytovchenko O, Ludewig F, Schliebs W, Riedel D, Urlaub H, Jakobs S, Deckers M

- (2012) MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol Biol Cell* 23: 247-257
31. Harner M, Korner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W (2011) The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J* 30: 4356-4370
 32. Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, Devay RM, Lackner LL, Westermann B, Schuldiner M, Weissman JS, Nunnari J (2011) A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol* 195: 323-340
 33. Pfanner N, van der Laan M, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, Darshi M, Deckers M, Hoppins S, Icho T, Jakobs S, Ji J, Kozjak-Pavlovic V, Meisinger C, Odgren PR, Park SK, Rehling P, Reichert AS, Sheikh MS, Taylor SS, Tsuchida N, van der Bliek AM, van der Klei IJ, Weissman JS, Westermann B, Zha J, Neupert W, Nunnari J (2014) Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol* 104: 1083-1086
 34. Barchiesi A, Wasilewski M, Chacinska A, Tell G, Vascotto C (2015) Mitochondrial translocation of APE1 relies on the MIA pathway. *Nucleic Acids Res* 43: 5451-5464
 35. Longen S, Woellhaf MW, Petrungraro C, Riemer J, Herrmann JM (2014) The disulfide relay of the intermembrane space oxidizes the ribosomal subunit mrp10 on its transit into the mitochondrial matrix. *Dev Cell* 28: 30-42
 36. Wrobel L, Trojanowska A, Sztolszterer ME, Chacinska A (2013) Mitochondrial protein import: Mia40 facilitates Tim22 translocation into the inner membrane of mitochondria. *Mol Biol Cell* 24: 543-554
 37. Zhuang J, Wang PY, Huang X, Chen X, Kang JG, Hwang PM (2013) Mitochondrial disulfide relay mediates translocation of p53 and partitions its subcellular activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 17356-17361
 38. Harner M, Neupert W, Deponce M (2011) Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria. *EMBO J* 30: 3232-3241
 39. Becker T, Pfannschmidt S, Guiard B, Stojanovski D, Milenkovic D, Kutik S, Pfanner N, Meisinger C, Wiedemann N (2008) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J Biol Chem* 283: 120-127
 40. Hulett JM, Lueder F, Chan NC, Perry AJ, Wolynec P, Likic VA, Gooley PR, Lithgow T (2008) The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *J Mol Biol* 376: 694-704
 41. Popov-Celeketi J, Waizenegger T, Rapaport D (2008) Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* 376: 671-680
 42. Kemper C, Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, 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
 43. Krumpe K, Frumkin I, Herzig Y, Rimon N, Ozbalci C, Brugger B, Rapaport D, Schuldiner M (2012) Ergosterol content specifies targeting of tail-anchored proteins to mitochondrial outer membranes. *Mol Biol Cell* 23: 3927-3935
 44. Setoguchi K, Otera H, Mihara K (2006) Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J* 25: 5635-5647
 45. Stojanovski D, Guiard B, Kozjak-Pavlovic V, Pfanner N, Meisinger C (2007) Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins. *J Cell Biol* 179: 881-893
 46. Hegde RS, Keenan RJ (2011) Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 787-798
 47. Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11752-11757
 48. Potting C, Wilmes C, Engmann T, Osman C, Langer T (2010) Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J* 29: 2888-2898
 49. Bragoszewski P, Wasilewski M, Sakowska P, Gornicka A, Bottinger L, Qiu J, Wiedemann N, Chacinska A (2015) Retro-translocation of mitochondrial intermembrane space proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 7713-7718
 50. Hennon SW, Soman R, Zhu L, Dalbey RE (2015) YidC/Oxa1 Family of Insertases. *J Biol Chem* 290: 14866-14874
 51. Bohnert M, Rehling P, Guiard B, Herrmann JM, Pfanner N, van der Laan M (2010) Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Curr Biol* 20: 1227-1232
 52. Wagener N, Neupert W (2012) Bcs1, a AAA protein of the mitochondria with a role in the biogenesis of the respiratory chain. *J Struct Biol* 179: 121-125
 53. Anand R, Langer T, Baker MJ (2013) Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1833: 195-204
 54. Mossmann D, Meisinger C, Vogtle FN (2012) Processing of mitochondrial presequences. *Biochim Biophys Acta* 1819: 1098-1106
 55. Vogtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139: 428-439
 56. Vogtle FN, Prinz C, Kellermann J, Lottspeich F, Pfanner N, Meisinger C (2011) Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol Biol Cell* 22: 2135-2143
 57. Varshavsky A (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci* 20: 1298-1345
 58. Rugarli EI, Langer T (2012) Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 31: 1336-1349
 59. Quiros PM, Langer T, Lopez-Otin C (2015) New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 345-359
 60. Voos W (2013) Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1833: 388-399
 61. Stehling O, Wilbrecht C, Lill R (2014) Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 100: 61-77
 62. Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Martinelli M, Sideris DP, Katrakili N, Tokatlidis K (2009) MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol* 16: 198-206
 63. Weckbecker D, Longen S, Riemer J, Herrmann JM (2012) Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria. *EMBO J* 31: 4348-4358
 64. Schreiner B, Westerburg H, Forne I, Imhof A, Neupert W, Mokranjac D (2012) Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell* 23: 4335-4346
 65. Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-Gomez JD, Kuhlbrandt W (2012) Structure of the yeast F1F0-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13602-13607
 66. Wittig I, Schagger H (2009) Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787: 672-680
 67. Stoldt S, Wenzel D, Hildenbeutel M, Wurm CA, Herrmann JM, Jakobs S (2012) The inner-mitochondrial distribution of Oxa1 depends on the growth conditions and on the availability of substrates. *Mol Biol Cell* 23: 2292-2301
 68. Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS (2006) Dynamic sub-compartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175: 237-247
 69. Wurm CA, Jakobs S (2006) Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* 580: 5628-5634
 70. Zerbes RM, van der Klei IJ, Veenhuis M, Pfanner N, van der Laan M, Bohnert M (2012) Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol Chem* 393: 1247-1261

71. Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD (2012) Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci* 37: 284-292
72. Tatsuta T, Langer T (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* 27: 306-314
73. Baker MJ, Mooga VP, Guiard B, Langer T, Ryan MT, Stojanovski D (2012) Impaired folding of the mitochondrial small TIM chaperones induces clearance by the i-AAA protease. *J Mol Biol* 424: 227-239
74. Livnat-Levanon N, Glickman MH (2011) Ubiquitin-proteasome system and mitochondria - reciprocity. *Biochim Biophys Acta* 1809: 80-87
75. Cohen MM, Leboucher GP, Livnat-Levanon N, Glickman MH, Weissman AM (2008) Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell* 19: 2457-2464
76. Escobar-Henriques M, Westermann B, Langer T (2006) Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J Cell Biol* 173: 645-650
77. Heo JM, Livnat-Levanon N, Taylor EB, Jones KT, Dephore N, Ring J, Xie J, Brodsky JL, Madeo F, Gygi SP, Ashrafi K, Glickman MH, Rutter J (2010) A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol Cell* 40: 465-480
78. Benard G, Neutzner A, Peng G, Wang C, Livak F, Youle RJ, Karbowski M (2010) IBRDC2, an IBR-type E3 ubiquitin ligase, is a regulatory factor for Bax and apoptosis activation. *EMBO J* 29: 1458-1471
79. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8: e1000298
80. Haynes CM, Ron D (2010) The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123: 3849-3855
81. Yamano K, Matsuda N, Tanaka K (2016) The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Rep* 17: 300-316
82. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 31: 763-780

Mitochondrial proteins – import, export, degradation

Michał Wasilewski✉, Katarzyna Chojnacka, Agnieszka Chacińska

Laboratory of Mitochondrial Biogenesis, International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw, 4 Trojdena St., 02-109 Warsaw, Poland

✉e-mail: mwasilewski@iimcb.gov.pl

Key words: mitochondria, protein assembly, protein degradation, protein import, protein processing

ABSTRACT

Mitochondria participate in plethora of vital processes in the cell such as energy production, other biochemical pathways and signaling. Over a thousand proteins co-operate to form the proteome of mitochondria. A great majority of mitochondrial precursor proteins are encoded in nuclear DNA and produced in the cytosol. They are targeted to mitochondria and sorted to distinct sub-compartments of mitochondria with the help of specialized translocase machineries. Biogenesis of mitochondrial proteins is completed through precursor maturation events and complex assembly. Mitochondrial homeostasis also requires the presence of clearance mechanisms for degradation of non-functional proteins. In the present review, we summarize the most important aspects of mitochondrial protein biogenesis.