

Univerza v Ljubljani

Fakulteta *za kemijo*
in kemijsko tehnologijo



Transport proteinov čez biološke membrane

Seminarska naloga pri predmetu Biološke membrane

Študijsko leto 2024/2025

Avtorji: Alliana Kolar, Ela Kovač, Kostadin Mitkov, Lana Kores, Luka Hafner

1. Uvod

Transport oziroma translokacija proteinov čez biološke membrane je celični proces, s katerim se proteini usmerjajo v specifične celične kompartmente ali izločajo iz celice. Vsi prokariotski in skoraj vsi evkariontski proteini se sintetizirajo na ribosomih v citoplazmi. Pri evkariontih je več kot tretjina proteinov usmerjena v organele, kot so endoplazmatski retikulum (ER), peroksisomi, mitohondriji in plastidi, medtem ko je pri bakterijah ocenjen delež proteinov, ki se izločijo v periplazemski ali zunajcelični prostor približno 8 %. Translokacija proteinov je pomembna za usmerjanje sekretornih in membranskih proteinov, vzdrževanje celične organizacije in komunikacije med celicami in okoljem [1].

2. Transport proteinov čez membrano ER in čez plazemsko membrano

2.1 Uvod

Transport proteinov čez membrano ER pri evkariontih je odločilen korak v biosintezi mnogih proteinov [2]. Te proteine lahko razdelimo v dve skupini: na topne proteini, kot so tisti, ki se izločijo iz celice ali lokalizirajo v lumen ER in na membranske proteine, kot so proteini v plazemski membrani ali v membranah drugih organelov sekretorne poti. Pri prokariotih poteka transport proteinov neposredno čez plazemske membrane in prav tako predstavlja pomemben korak v biosintezi izločenih ter membranskih proteinov. Topni proteini se popolnoma prenesejo čez membrano in na N-koncu vsebujejo signalno zaporedje, katerega glavna značilnost je kratek hidrofobni segment, dolg 7-12 aminokislinskih ostankov. Membranski proteini pa imajo različne topologije z enim ali več transmembranskimi segmenti, pri čemer vsak izmed segmentov vsebuje okoli 20 hidrofobnih aminokislinskih ostankov [3],[4].

Obe vrsti proteinov uporabljata enak mehanizem za translokacijo čez membrane: kanal za translokacijo proteinov s hidrofیلno notranjostjo. Ta kanal ima v primerjavi s kanalom, ki prenaša ione in majhne molekule, lastnost, da se lahko odpre v dveh smereh. Najprej se odpre pravokotno na ravnino membrane in tako omogoči prehod polipeptidnega segmenta, nato pa se odpre znotraj membrane in tako omogoči lateralni izstop transmembranskega segmenta membranskega proteina v lipidno fazo [5].

2.2 Struktura translokacijskega kanala

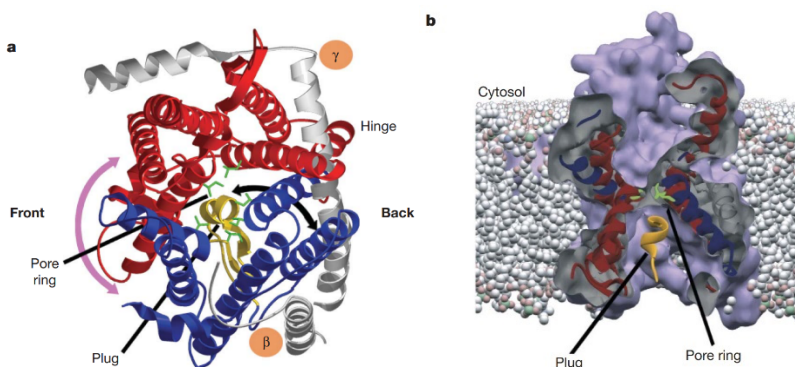
Translokacijski kanal je sestavljen iz ohranjenega heterotrimernega membranskega proteinskega kompleksa, ki se pri evkariontih imenuje kompleks Sec61, pri bakterijah in arhejah pa kompleks SecY. α in γ podenoti izkazujeta pomembno ohranjenost zaporedja in obe podenoti sta nujni za delovanje kanala in preživetje celice. β podenote pa niso esencialne. α podenota tvori poro kanala in obdaja polipeptidno verigo med njenim prehodom čez membrano [6].

Kristalna struktura arhejskega kompleksa SecY je omogočila pomemben vpogled v to, kako α podenota tvori kanal [6]. Struktura kanala je najverjetneje enaka pri vseh organizmih, saj so dokazali veliko homologijo med zaporedji ter veliko podobnost med 2D strukturami določenimi

z elektronskim mikroskopom [7]. Če kanal pogledamo iz citosola v notranjost organela, ima obliko kvadrata (slika 1a). α podenota je razdeljena na dve polovici, ki sta sestavljeni iz transmembranskih segmentov 1-5 in 6-10. Zanka med transmembranskima segmentoma 5 in 6 na zadnji strani α podenote deluje kot lateralna vrata, saj omogoča, da se α podenota odpre na sprednji strani. γ podenota z enim transmembranskim segmentom povezuje obe polovici α podenote na zadnji strani. β podenota vzpostavlja stik le s perifernim delom α podenote, kar verjetno pojasnjuje, zakaj ni nujna za delovanje kompleksa [4].

Deset vijajnic α podenote tvori poro v obliki peščene ure, ki je sestavljena iz citoplazemskega in zunajceličnega dela (slika 1b). Citoplazemski del je prazen, v sredini zunanega dela pa je kratka α -vijajnica oziroma čep (*ang.* plug) [6]. Cisteini, ki so del čepa, tvorijo disulfidni mostiček *in vivo*, kar omogoči, da se čep pomakne proti zadnji strani kanala. Tako se lahko α -podenota odpre, kar omogoči vstop polipeptidne verige v kanal [8]. Kanal je v dinamičnem ravnotežju, pri čemer se čep giblje med zaprtim in odprtim položajem. V praznem kanalu je ravnotežje nagnjeno k zaprtemu stanju, ko se na kanal veže signalno zaporedje oziroma transmembranski segment, pa se ravnotežje pomakne proti odprtemu stanju. Ko je signalno zaporedje vstavljeno v kanal, se lahko polipeptidna veriga pomakne čez poro in prepreči, da bi se čep vrnil v svoj zaprti položaj [3]. V sredini kanala se nahaja tudi porni obroč (*ang.* pore ring), ki je sestavljen iz šestih hidrofobnih aminokislinskih ostankov, ki so pri številnih vrstah izolevcini. Porni obroč deluje kot tesnilo, ki tesno objame translocirajočo polipeptidno verigo, s čimer preprečuje prehod ionov in drugih majhnih molekul med translokacijo proteinov [6].

Poleg premika čepa je za translokacijo polipeptidne verige potrebna tudi razširitev pore kanala, saj je premer pornega obroča premajhen, da bi omogočal prehod iztegnjene polipeptidne verige. Širjenje kanala se lahko zgodi preko premika heliksov, na katere so vezani aminokislinski ostanki pornega obroča. Prožne, z glicinom bogate aminokislinske sekvence v citosolnih zankah med transmembranskimi segmenti 4 in 5 ter 9 in 10 omogočajo kanalu, da se prilagodi premiku teh heliksov [3].

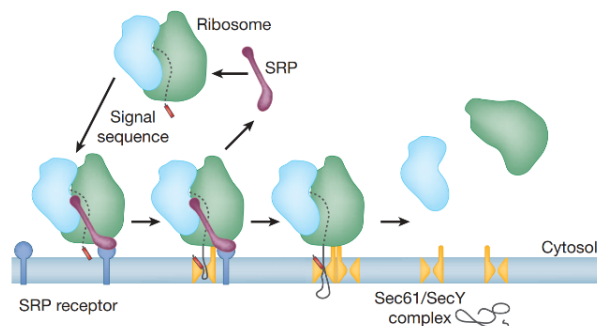


Slika 1: Struktura translokacijskega kanala SecY iz arheje *Methanococcus jannaschii*. a: Pogled iz citosolne strani. α -podenota je sestavljena iz dveh polovic - transmembranskih segmentov 1-5 in 6-10 (označene z modro in rdečo), kjer zanka med transmembranskima segmentoma 5 in 6 na zadnji strani podenote deluje kot lateralna vrata in omogoča, da se α -podenota odpre na sprednji strani (vijolična dvosmerna puščica). β - in γ -podenoti sta prikazani s sivo barvo. V zaprtem kanalu se čep (označen z rumeno) nahaja v središču α -podenote. Premik čepa proti zadnjemu delu (črna dvosmerna puščica) omogoči odprtje kanala. Aminokislinski ostanki pornega obroča so označeni z zeleno. b: Prečni prerez kanala s stranskega pogleda [4].

Translokacijski kanal Sec61 ali SecY sam po sebi predstavlja pasivno poro, zato mora interagirati z ostalimi partnerji, ki zagotavljajo gonilno silo za translokacijo proteinov. Glede na vrsto

partnerja so znani trije načini delovanja kanala - kotranslacijska translokacija, katere mehanizem je enak pri evkariontih in prokariontih ter posttranslacijska translokacija, katere mehanizem se med evkarionti in prokarionti razlikuje. Pri kotranslacijski translokaciji ribosom nadaljuje s sintezo polipeptida, ki se hkrati prenaša čez translokacijski kanal. Pri posttranslacijski translokaciji pa pride do translokacije šele po zaključeni sintezi proteina [4].

2.3 Kotranslacijska translokacija pri evkariontih in prokariontih



Slika 2: Model kotranslacijske translokacije sekretornega proteina pri evkariontih ali prokariontih [4].

Pri kotranslacijski translokaciji je glavni partner ribosom. Ta način translokacije se pojavlja v vseh celicah in je ključen tako za translokacijo sekretornih proteinov kot tudi za integracijo večine membranskih proteinov. Proces se začne s fazo usmerjanja, kjer signalno sekvenco na rastoči polipeptidni verigi prepozna delec za prepoznavo signala (*ang.* signal-recognition particle, SRP) in kompleks ribosoma ter nastajajoče polipeptidne verige usmeri na njegov

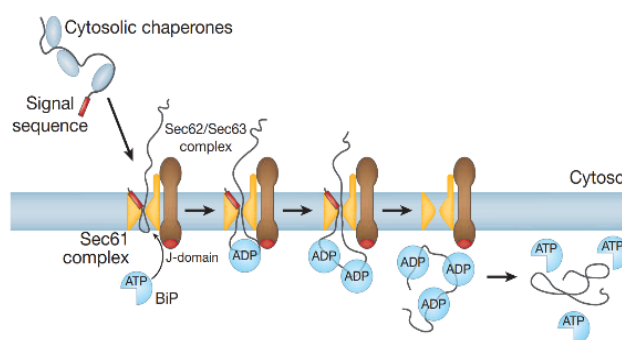
membranski SRP receptor (slika 2) [9],[10]. Ko se ribosom veže na translokacijski kanal, se podaljšujoča se polipeptidna veriga prenese iz ribosoma v kanal, pri čemer hidroliza GTP med translacijo zagotavlja energijo za translokacijo polipeptidne verige. Signalna sekvenca se med translokacijo na določeni točki odcepi [11]. V primeru translokacije membranskih proteinov nekateri odseki polipeptidne verige ne vstopijo v kanal, temveč bočno izstopijo iz stika med ribosomom in kanalom v citosol [12].

2.4 Posttranslacijska translokacija pri evkariontih

Mehanizem posttranslacijske translokacije pri evkariontih je značilen za proteine, ki se prenesejo v lumen ER. Proteini imajo manj hidrofobno signalno zaporedje, zaradi česar lahko med sintezo uidejo interakciji s SRP [13].

Mehanizem posttranslacijske translokacije je bil določen pri *S. cerevisiae* [14], verjetno pa je podoben tudi pri višjih evkariontih.

Translokon Sec61 se poveže še z enim membranskim proteinskim kompleksom, tetramernim kompleksom Sec62/Sec63 ter z luminalnim šaperonom BiP, ki je član družine ATPaz Hsp70. Translokacija se začne z vezavo translokacijskega substrata



Slika 3: Model posttranslacijske translokacije pri evkariontih [4].

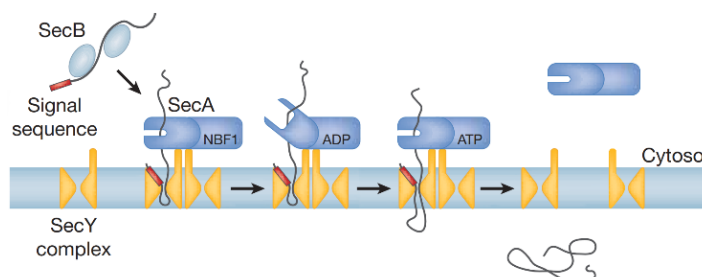
na kanal (slika 3). V tem koraku se tudi vsi citosolni šaperoni sprostijo s substrata. Ko je polipeptidna veriga vstavljena v kanal, se zaradi Brownovega gibanja lahko giblje v obe smeri, vendar njena vezava na BiP znotraj lumna ER prepreči gibanje nazaj v citosol. Na ATP vezan BiP interagira z J-domeno proteina Sec63, kar povzroči hitro hidrolizo ATP in zaprtje žepa kanala okoli translokacijske verige. Šaperon BiP ima nizko vezavno specifičnost, kar mu omogoči interakcijo z različnim polipeptidnim segmentom, ki izstopi iz kanala v lumen ER. Ko se

polipeptidna veriga pomakne dovolj globoko v lumen ER, se nanjo veže naslednja molekula BiP. Ta postopek se ponavlja, dokler celotna veriga popolnoma ne preide čez kanal v lumen ER. Na koncu zamenjava ADP z ATP odpre vezavni žep in sprosti BiP [3].

2.5 Posttranslacijska translokacija pri prokariontih

Mehanizem posttranslacijske translokacije pri prokariontih je značilen za sekretorne proteine.

Translokacijski kanal se poveže s citosolno ATPazo SecA. SecA ima več domen, med katerimi sta najpomembnejši domeni za vezavo nukleotidov (NBF1 in NBF2), ki vežeta polipeptidno verigo in se med ciklom hidrolize ATP premikata druga glede na drugo [4]. Translokacija substratov se prične z njihovo vezavo na



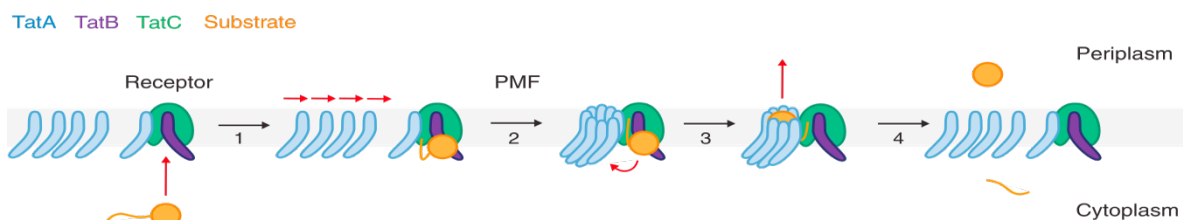
Slika 4: Model posttranslacijske translokacije pri prokariontih [4].

citosolni šaperon SecB (slika 4) [15]. Nato SecA prepozna signalno zaporedje, interagira s SecB in veže polipeptidno verigo. Nato jo vstavi v kanal SecY in poteče translokacija verige s ciklom hidrolize ATP, ki omogoča delovanje SecA. Po končani translokaciji signalno zaporedje odcepi specifična signalna peptidaza, SecA pa se odcepi iz membranskega kanala in vrne v citosol [16].

2.6 Sekretorna pot dveh argininov

Sekretorna pot dveh argininov (Tat) je prisotna pri večini prokariontov. Prav tako je prisotna v kloroplastih, kjer prenaša proteine v tilakoide. Njena vloga je prenos zvitih proteinov, ki potrebujejo vezane kofaktorje ali oligomerizacijo za delovanje, čez membrano [17, 18]. Signalna zaporedja Tat se nahajajo na N-koncu proteinov in so sestavljena iz pozitivno nabite N-končne domene N, hidrofobne domene H in C-končne domene C z Ala-x-Ala cepitvenim mestom. Na N- Substrati Tat imajo N-končno signalno zaporedje, ki vsebuje par sosednjih argininov. Na N-končni strani signalnega zaporedja vsebuje kanonični motiv z dvema argininoma S-R-R-x-F-L-K, kjer je x polaren aminokislinski ostanek. Signalno zaporedje Tat je daljše od signalnega zaporedja Sec. Poleg tega je bolj hidrofobno in lahko vsebuje bazične amniokislinske ostanke navzgor od motiva A-x-A, kar otežuje, da bi se ti proteini usmerili v sekretorno pot Sec [18].

Natančen mehanizem delovanja Tat ni znan. Poleg tega se med organizmi razlikuje število sodelujočih proteinov in njihova funkcija. Splošen mehanizem je, da proteine s prepoznavnim zaporedjem veže membranski kompleks TatBC pri *E. coli* in v tilakoidni membrani, ter kompleksa TatAdCd ali TatAyCy pri *B. subtilis* (slika 5). Po vezavi tarčnega proteina TetA tvori kompleks, ki omogoča prehod tarčnega proteina čez membrano. Ni še jasno ali TetA omogoči prehod proteinov čez membrano s tem, da tvori poro ali ošibi membrano. Znano je, da je za translokacijo potreben protonski gradient. Ko tarčni protein preide membrano se signalno zaporedje odcepi in s tem se tarčni protein sprosti [18, 19].



Slika 5: Model translokacije sekretorne poti dveh argininov. Substrat se veže na kompleks TatBC. To sproži oligomerizacijo TatA, ki tvori poro. Substrat se prenese čez membrano skozi poro. Substrat se nato sprosti s cepitvijo signalnega zaporedja [20].

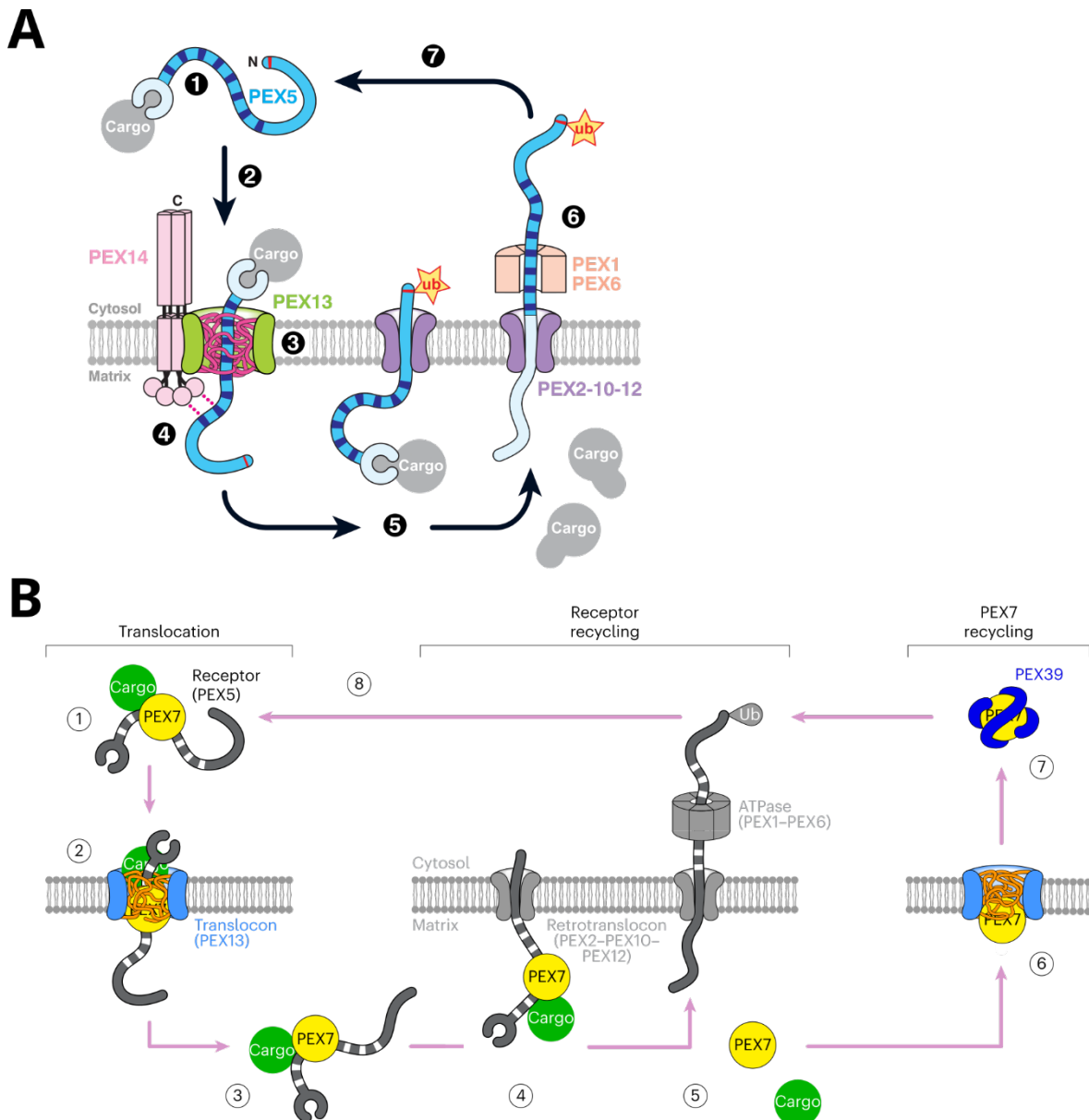
3. Transport proteinov v peroksisome

Peroksisomi so organeli, ki so obdani z enojno membrano. Prisotni so v skoraj vsaki evkariotski celici. Njihova glavna vloga je β -oksidacija maščobnih kislin in razgrajevanje reaktivnih kisikovih spojin. Geni za vse peroksisomske proteine, tako matrične kot membranske, so zapisani v jedrni DNA. Posledično jih ribosomi sintetizirajo v citosolu, nakar se morajo proteini peroksisomskega matriksa transportirati čez membrano peroksisoma v njegov matriks. Proteini, ki se transportirajo v mitohondrij, kloroplaste ali endoplazmatski retikulum, so v delno razviti konformaciji. To konformacijo vzdržujejo šaperoni in faktorji, ki so vključeni v transport teh proteinov. Proteini peroksisomskega matriksa se lahko pred transportom v citosolu zvijejo v svojo aktivno obliko in vežejo potrebne kofaktorje. Sklepa se, da se lahko transportirajo čez membrano tudi oligomeri proteinov [21].

Peroksini so skupina proteinov, ki so vključeni v biogenezo peroksisomov in sestavljajo sistem za transport proteinov v peroksisomski matriks. Proteini, ki se transportirajo v peroksisomski matriks imajo lahko dve različni prepoznavni zaporedji: peroksisomsko prepoznavno zaporedje tipa 1 ali peroksisomsko prepoznavno zaporedje tipa 2 (PTS1 ali PTS2). Konsenzno zaporedje PTS1 je (SAC)-(KRH)-(LM). Konsenzno zaporedje PTS2 je R-(LIVQ)-X-X-(LIVQH)-(LSGA)-X-(HQ)-(LA). V peroksisomski matriks se lahko transportirajo tudi proteini, ki nimajo peroksisomskega prepoznavnega zaporedja. Cu/Zn superoksid dismutaza 1 se pred transportom veže na šaperon za superoksid dismutazo, ki vsebuje PTS1 in se tako transportira skupaj z njim. Ostale proteine brez prepoznavnega zaporedja, ki se transportirajo v peroksisome, kot so acil-CoA oksidaza v *S. cerevisiae*, prepozna N-končna domena PEX5 [21, 22].

PEX5 prepozna PTS1 s C-končno PTS1 prepoznavno domeno. Z N-končno domeno interagira z ostalimi proteini PEX. PEX5, na katerega je vezan protein s PTS1, rekrutirata peroksisomalna membranska proteina PEX13 in PEX14 (slika 6). PEX5 nato prenese vezan protein skozi poro, ki jo tvorijo PEX13. Notranjost pore je prepletena z YG domenami PEX13 proteinov, ki so bogate z Tyr in Gly. Prenos skozi poro goni interakcija lumenske domene PEX14 in WxxxF/Y motivov PEX5. V lumnu peroksisoma PEX5 vstavi svoj N-konec skozi membransko poro, ki jo tvori ubikvitin ligazni kompleks. Tega sestavljajo PEX2, PEX10 in PEX12. N-konec PEX5 se v citosolu nato monoubikvitinira, kar omogoči da se PEX5 s pomočjo AAA ATPaze sestavljene iz PEX1 in PEX6 vrne v citosol, kjer se deubikvitinira. Da lahko PEX5 potuje skozi membransko poro se mora razviti. Posledično se tovor odstrani s PEX5 in ostane v lumnu peroksisoma. Proteine s

PTS2 prepozna adapterski protein PEX7, ki se nato veže na PEX5 ali njegov paralog. Transport nadalje poteka podobno kot transport proteinov s PTS1 [23].

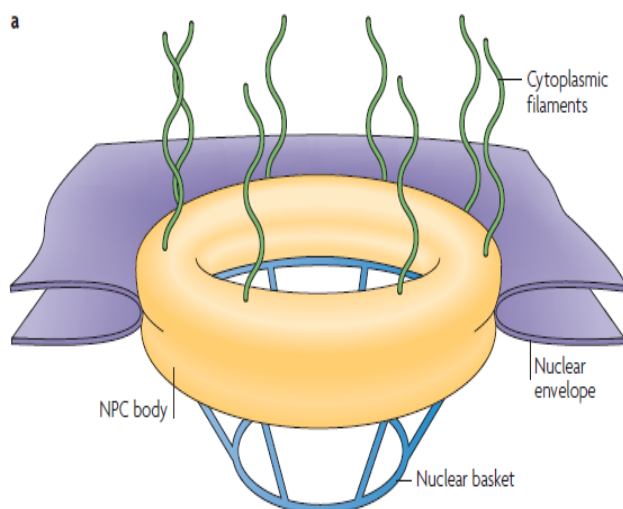


Slika 6: Model translokacije proteinov v lumen peroksisomov. (A) PEX5 v citosolu prepozna in veže proteine, ki imajo prepoznavno zaporedje PTS1. PEX13 in PEX14 rekrutirata PEX5 z vezanim tovorom na membrano peroksisoma. PEX5 s tovorom preide poro, ki jo tvorijo PEX13. PEX5 vsebuje številne WxxxF/Y motive, ki tvorijo omogočijo spontan prehod v poro. Na notranji strani pore so YG domene PEX13, ki so bogate z Tyr in Gly aminokislinskimi ostanki. Na lumenski strani membrane PEX5 tvori ugodne interakcije s PEX14, ki pomagajo pri prehodu iz pore v lumen. Iz lumenske strani PEX5 vstavi svoj N-konec skozi poro, ki jo tvori ubikvitin ligazni kompleks iz proteinov PEX2, PEX10 in PEX12. Ko N-konec PEX5 pride na citosolno stran ubikvitin ligaznega kompleksa, ga ta monoubikvitinira. Monoubikvitiniran PEX5 nato AAA ATPazni kompleks, ki ga tvorita PEX1 in PEX6, povleče skozi poro. Pri tem se PEX5 postopoma razvija, da lahko preide skozi poro. Ob razvitju C-končne PTS1 vezavne domene, se tovor sprost v lumen peroksisoma. PEX5 se v citosolu ponovno zveže in deubikvitinira. PEX5 je nato pripravljen za ponovni cikel traslokacije. (B) PEX7 v citosolu prepozna in veže proteine, ki imajo prepoznavno zaporedje PTS2. Ob temu PEX7 veže še PEX5, njegovo izoobliko ali paralog (odvisno od kraljestva organizma). Translokacija naprej poteka enako kot pri translokaciji proteinov s prepoznavnim zaporedjem PTS1, le da PEX7 služi kot adapterski protein med tovorom in receptorjem. Ko se receptor razvije med prenosom nazaj v citosol, se sprostita PEX7 in tovor. PEX7 preide nazaj v notranjost pore, ki jo tvori PEX13. Iz citosolne strani se na PEX7 veže PEX39, ko je ta še večinoma v pori. S tem se prekinejo ugodne interakcije med PEX7 in YG domenami PEX13. Tako PEX7 lahko nato izstopi iz pore v citosol, kjer lahko ponovno veže protein, ki ima prepoznavno zaporedje PTS2 [23, 24].

4. Jedrni prenos

Jedro evkariontske celice je obdano z dvoslojno jedrno ovojnico, ki predstavlja selektivno pregrado med genetskim materialom in citoplazmo. Kljub tej fizični ločitvi pa med jedrom in citoplazmo poteka dinamična izmenjava makromolekul, ki je ključna za celične procese, kot so izražanje genov, prenos signalov in uravnavanje celičnega cikla. To izmenjavo omogoča kompleksen sistem jedrnega prenosa, ki vključuje približno 60 različnih proteinov, od katerih ima vsak svojo specifično funkcijo. Osrednji del tega sistema je jedrni porni kompleks (NPC), ki je zgrajen iz proteinov, imenovanih nukleoporini. NPC deluje kot selektivna pregrada, ki omogoča prehod le določenim molekulam, medtem ko večjim preprečuje pasivno difuzijo. V povprečni sesalski celici se nahaja med 2000 in 5000 takšnih kompleksov, ki se nahajajo tam, kjer se notranja in zunanja membrana jedrne ovojnice spojata [25].

NPC ima votlo valjasto strukturo s premerom približno 1200 Å, višino okoli 800 Å in maso okoli 120 MDa. Sestavljajo ga tri glavne strukture: osrednje jedro, ki tvori selektivno pregrado, osem filamentov, ki segajo v citoplazmo, ter osem filamentov na jedrni strani, ki tvorijo košarico podobno strukturo. Celoten kompleks ima osemkratno rotacijsko simetrijo vzdolž osrednjega kanala, kar pomeni, da so vsi nukleoporini prisotni v večkratnikih števila osem. Vsak NPC je sestavljen iz približno 1000 proteinskih podenot, ki vključujejo več kopij približno 34 različnih nukleoporinov. Približno deset teh vsebuje dolge, neurejene odseke z FG (fenilalanin-glicin) ponovitvami, ki tvorijo selektivno pregrado in omogočajo interakcije s transportnimi proteini.



Slika 7: Jedrni porni kompleks. Jedrni porni kompleks sestavljajo trije glavni deli: osrednje jedro, citoplazemske filamente in jedrno košaro [26].

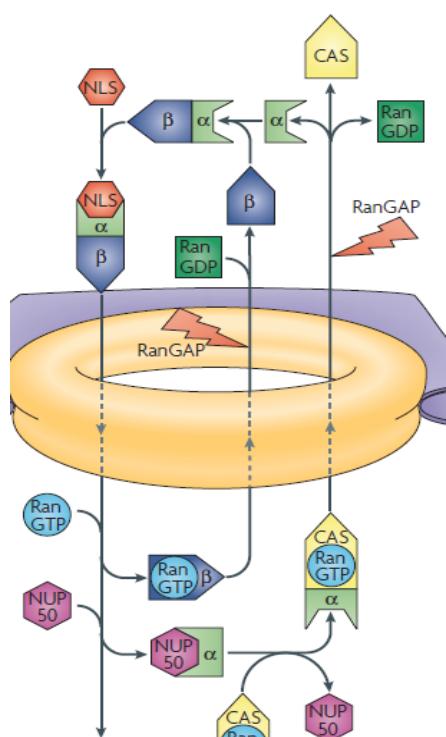
Nukleoporini imajo raznolike funkcije: nekateri delujejo kot sidrišča v membrani, drugi gradijo ogrodje NPC-ja, tretji povezujejo njegove dele, medtem ko FG-nukleoporini tvorijo funkcionalno pregrado in sodelujejo pri prenosu. Njihove strukture vključujejo α -vijačne solenoide in β -propelerje, ki omogočajo stabilnost in prožnost celotnega kompleksa [26].

Drug pomemben del sistema jedrnega prenosa so karioferini. Gre za proteine, ki prenašajo tovor skozi jedrni porni kompleks – bodisi v jedro bodisi iz njega v

citoplazmo. Ti proteini so evolucijsko ohranjeni od kvasovk do človeka in imajo ključno vlogo v številnih celičnih procesih. Karioferine delimo v tri glavne skupine: importini prenašajo tovor v jedro, eksportini ga prenašajo iz jedra v citoplazmo, biportini pa omogočajo prenos v obe smeri. Za vezavo in sproščanje tovora se karioferini zanašajo na GTPazo RanGTP. Po velikosti so precej veliki (okoli 1000 aminokislinskih ostankov) in imajo značilno α -vijačno solenoidno strukturo. Njihova konkavna, kislja površina omogoča interakcijo z RanGTP in tovorom, medtem ko konveksna površina vsebuje hidrofobne žepke, ki se vežejo na FG ponovitve v NPC-ju [27].

Obstaja več poti za uvoz proteinov v jedro, ki uporabljajo različne prenašalce, vendar si delijo številne skupne značilnosti. Vse temeljijo na usklajenem zaporedju interakcij med proteini, s pomočjo katerih se tovor prepozna v citoplazmi, prenese skozi jedrni porni kompleks in sprostí v jedro. Pri vsakem uvoznem mehanizmu so proteinski tovari označeni s kratkimi zaporedji, imenovanimi jedrni lokalizacijski signali (NLS), ki omogočajo njihovo usmerjanje v jedro. Pri številnih jedrnih proteinih jedrni lokalizacijski signali sestavljajo eno ali dve kratki zaporedji, ki sta bogati s pozitivno nabitima aminokislinama lizinom in argininom. Obstajajo različni tipi NLS signalov, od katerih vsak prepozna določen transportni sistem. Najbolj klasična in preučevana pot uvoza jedrnih proteinov vključuje importin- β , ki deluje kot prenašalec in omogoča vnos širokega spektra tovorov. Ta pot je bila temeljito raziskana z biokemijskimi, genetskimi, celično-biološkimi in strukturnimi pristopi [26].

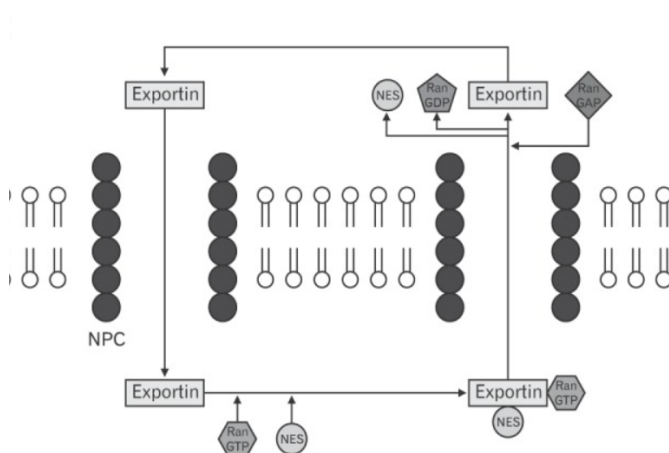
Cikel uvoza proteinov v jedro temelji na natančno usklajenem zaporedju interakcij, ki morajo biti strogo nadzorovane tako prostorsko kot časovno. Ključno vlogo pri tem ima molekularno prepoznavanje – prenašalci morajo prepoznati svoj tovor, hkrati pa razlikovati med jedrom in citoplazmo. Te interakcije usmerja nukleotidno stanje proteina Ran, ki kroži med vezanim GTP in vezanim GDP.



Slika 8: Mehanizem uvoza proteinov skozi jedrni porni kompleks. Prikazan je proces uvoza proteinov z jedrnim lokalizacijskim signalom (NLS), ki ga posredujeta importina α in β . Transport je odvisen od gradienta RanGTP/RanGDP [26].

Njegovo stanje uravnava dve pomembni molekuli: RanGEF, ki se nahaja v jedru in pretvarja RanGDP nazaj v RanGTP, ter RanGAP, ki je prisoten v citoplazmi in spodbuja razgradnjo RanGTP v RanGDP [27].

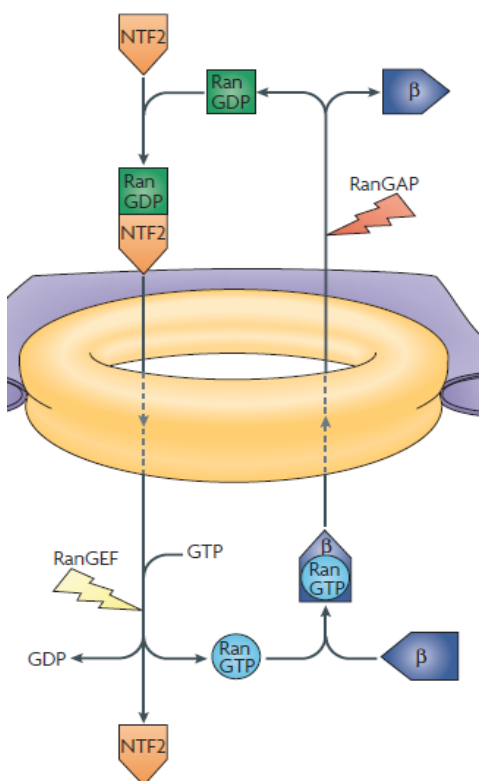
Uvozni kompleks nastane v citoplazmi, kjer se tovorni protein z jedrnim lokalizacijskim signalom veže z importinom- α in importinom- β . Ta kompleks nato prehaja skozi NPC v jedro. Ko se kompleks znajde v jedru, se RanGTP veže na importin- β in ga loči od importina- α . Nato se tudi tovor s signalom NLS sprostí iz importina- α . Importin- α se nato ponovno izvozi v citoplazmo s pomočjo svojega izvoznega faktorja CAS, ki skupaj z njim tvori kompleks z RanGTP. V citoplazmi RanGAP sproži hidrolizo GTP, kar omogoči sprostitev importinov, ki so tako pripravljeni na nov cikel prenosa. Nekateri nukleoporini, kot je NUP50, pomagajo pri sprostitvi tovara iz kompleksa in delujejo kot nekakšni molekularni zadrževalniki, ki preprečujejo nepotrebne oziroma neučinkovite prenose [26].



Slika 9: Mehanizem izvoza proteinov iz jedra. Diagram prikazuje, kako se proteini z NES izvažajo iz jedra skozi NPC s pomočjo exportina in RanGTP. V citoplazmi RanGAP spodbuja pretvorbo RanGTP v RanGDP, kar sproži sprostitvev tovora [28].

Izvoz iz jedra je strogo nadzorovan proces, ki omogoča prenos makromolekul, kot so proteini in RNA, iz jedra v citoplazmo. Ta mehanizem temelji predvsem na izvoznih proteinih, imenovanih eksportini, ki prepoznajo tovrne proteine s jedrnim izvoznim signalom (NES) – kratkimi zaporedji bogatimi z levcinom. V jedru eksportin tvori stabilen kompleks skupaj s tovorom in RanGTP. Ta kompleks se veže na FG-ponovitve v nukleoporinih jedrnega pornega kompleksa in se nato prenese v citoplazmo. Ko doseže citoplazemsko stran, RanGTP hidrolizira v RanGDP, kar

omogoča razgradnjo kompleksa in sprostitvev tovora v citoplazmo. Ta reakcija je pospešena s pomočjo RanGAP. Po sprostitvi se eksportin in RanGDP preneseta nazaj v jedro, kjer se cikel izvoza lahko ponovi. Celoten postopek je enosmeren in energijsko odvisen, saj ga poganja koncentracijski gradient RanGTP med jedrom in citoplazmo, ki zagotavlja pravilno smer prenosa [28].



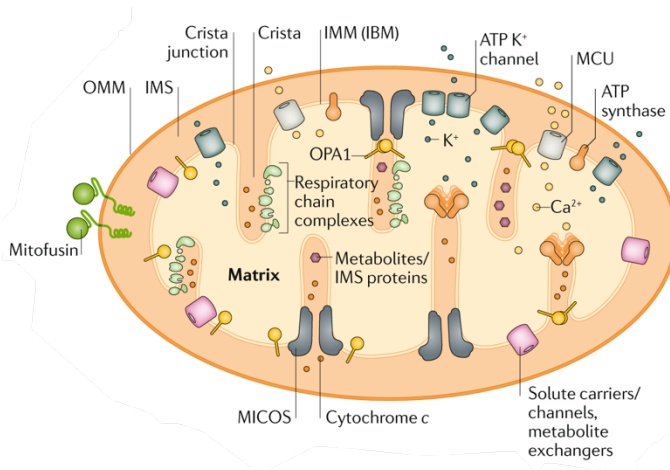
Slika 10: Kroženje proteina Ran med jedrom in citoplazmo [26].

Protein Ran kroži med jedrom in citoplazmo, pri čemer se njegovo nukleotidno stanje spreminja glede na lokacijo. Ker je RanGEF (gvanin nukleotidni izmenjevalni faktor) prisoten v jedru, RanGAP (protein, ki aktivira GTPazo) pa v citoplazmi, pride do stalnega prehajanja med RanGTP in RanGDP obliko. V citoplazmi se Ran nahaja v obliki RanGDP, ki se nato prenese v jedro s pomočjo nuklearnega transportnega faktorja 2 (NTF2). Tam RanGEF sproži zamenjavo GDP z GTP in tako nastane RanGTP, ki se veže na različne transportne faktorje, kot sta importin-β in CAS, ter se ponovno izvozi v citoplazmo. V citoplazmi RanGAP spodbudi hidrolizo GTP in ponovno pretvori Ran v obliko GDP. Struktura dveh zank v Ran proteinu, imenovanih switch I in switch II, se bistveno spremeni glede na to, ali je vezan GTP ali GDP. Te spremembe omogočajo, da Ran natančno usklajuje vezavo in sproščanje svojih partnerjev med ciklom jedrnega prenosa [26].

5. Prenos proteinov čez mitohondrijsko membrano

Mitohondrij je ključni celični organel, saj je glavni vir celične energije, ki jo proizvaja v obliki ATP. Poleg tega pa ima tudi pomembno vlogo pri celični signalizaciji in sodeluje v številnih kompleksnih celičnih procesih.

Mitohondrij obdaja dvojna membrana - notranja (inner mitochondrial membrane, IMM) in zunanja (outer mitochondrial membrane, OMM), ki skupaj uravnavata pretok snovi v in iz organela. OMM je bolj prepustna in omogoči prehod majhnih molekul do 5000 Da. Preko OMM pride do prenosa signalov v mitohondrije in iz njih. IMM je bolj selektivna, transport poteka s pomočjo transportnih proteinov. Sestavljena je iz notranje mejne membrane (IBM), ki se nahaja vzdolž zunanje membrane, in krist, ki pa so navznoter naguban del IMM. Čez IBM se prenašajo ioni, ATP, ADP in majhni metaboliti med citoplazmo in matriksom. V kristah pa v glavnem poteka oksidativna fosforilacija. Ta invaginacija membrane, ki oblikuje strukturo krist, preprečuje, da se vsebina krist sprosti v medmembranski prostor (IMS), ki se nahaja med obema mitohondrijskima membranama. Prav tako pa omogoča povečanje površine IMM (slika 11) [29].



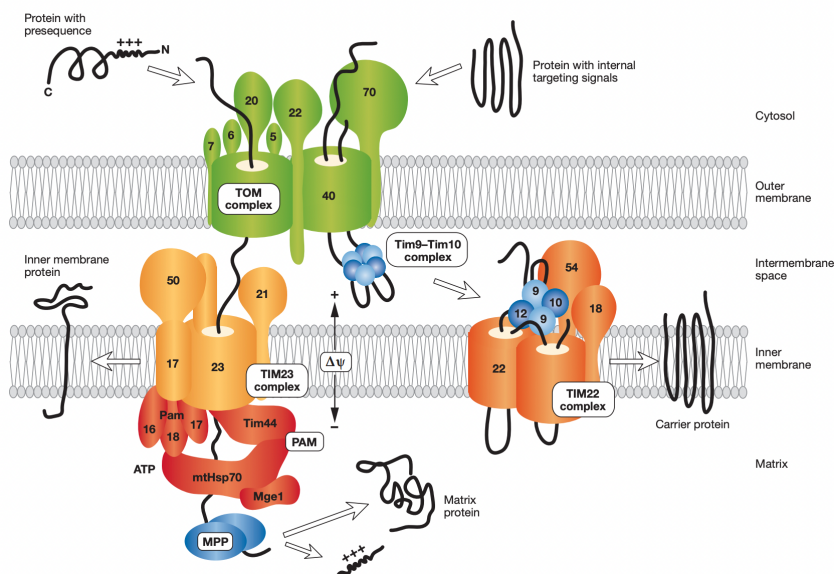
Slika 11: Struktura mitohondrija [1]

Da proteini vstopijo v mitohondrij, se najprej sintetizirajo na ribosomih v citosolu kot prekurzorji s signalnim zaporedjem, ki jih usmerja v kompartment mitohondrija. Vključena sta dva glavna mehanizma, ki sodelujeta pri prenosu proteinov čez membrano: TOM, pri kateremu gre za prenos čez zunanjo membrano in TIM, pri kateremu gre za prenos čez notranjo membrano [30].

TOM kompleks je vhodni kompleks za skoraj vse mitohondrijske proteine, ne glede na njihovo ciljno lokacijo znotraj organela. Sestavljajo ga receptorji Tom20, Tom22 in Tom70, kanalček Tom40, ter manjše podenote Tom5, Tom6 in Tom7. Tom20 prepozna proteine s pozitivno nabitim signalnim peptidom na N-koncu proteina, ki je namenjen v matriks mitohondrija. Tom70 sodeluje pri uvozu proteinov v IMM. Prepozna zaporedja znotraj prekurzorskega proteina, ki jih veže. Transmembranska domena Tom22 je bistvena za oligomerizacijo celotnega sistema TOM in povezovanje posameznih kanalčkov Tom40 s pripadajočimi podenotami [30]. Nekateri viri celo navajajo, da se prekurzorski proteini s pomočjo domene Tom22 prenesejo v kanalček Tom40 (Slika 12) [31].

Kanalček Tom40 ima premer približno 22 Å in prepušča nekatere prekursorske proteine le v delno razvitem stanju, prav tako ima preferenco do kationov. Njegova selektivnost in regulacija sta podprti z interakcijami s Tom22 in drugimi receptorji. Pomembno je tudi, da Tom40 omogoča enosmerni pretok – proteini vstopijo v mitohondrij in se ne vračajo v citosol. Ko pridejo proteini do kanalčka Tom40, se njihove poti ločijo glede na to, kje je njihova ciljna točka. Če jih proteolitično cepijo proteaze IMS, tam tudi ostanejo. Tisti prekursorji, ki pa so namenjeni v matriks ali IMM, pa nadaljujejo svojo pot čez notranjo membrano preko TIM kompleksov [30].

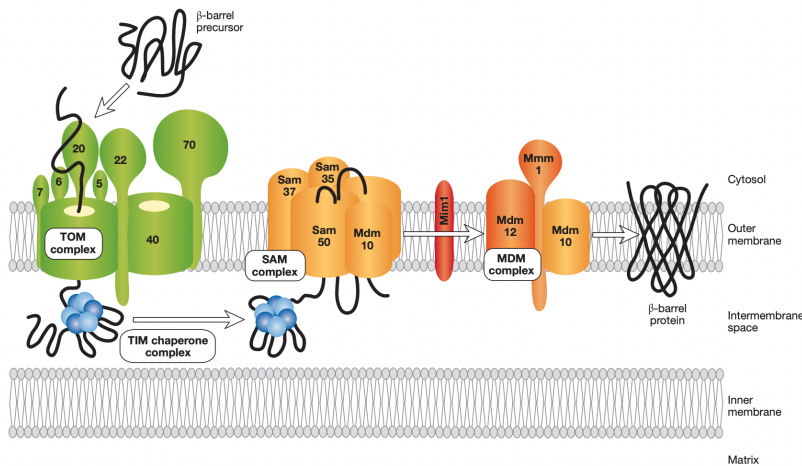
Ločimo dva TIM kompleksa, in sicer kompleks TIM23 in TIM22. TIM23 vključuje proteine Tim50, Tim21, Tim17, Tim23, kompleks PAM in peptidaza MPP. Naloga tega kompleksa je transport proteinov v matriks ali sidranje v IMM (slika 12). Prekursorske proteine prepozna protein Tim50, ko preidejo čez TOM kompleks. Proteina Tim17 in Tim23 omogočajo njihov transport, Tim21 pa pomaga pri tem. PAM, proteinski motor, ki ga poganja ATP, prenese prekursorje v matriks. Pozitivno nabite prekursorje, ki so tja namenjeni, odcepi MPP v aktivne proteine. Proteini sidrani v IMM pa imajo signal, ki ustavi prenos čez kanalček, zato se protein lateralno vstavi v membrano. Kompleks TIM22 pa sodeluje pri usmerjanju integralnih prenašalnih proteinov z α -vijačnico do IMM (slika 12). Pri sprostitvi prekursorskih proteinov iz kompleksa TOM pomaga šaperonski kompleks Tim9-Tim10 v IMS. Veže se na α -vijačna zaporedja, da protein dostavi kompleksu TIM22. Na šaperonski kompleks se vežejo prek adapterskega proteina Tim12. Osrednji del celotnega kompleksa TIM22 sestoji iz proteina Tim22 in podenot Tim18 in Tim54 (vloga slednjih dveh je neznana – najverjetneje stabilizirata celoten kompleks). Kar je zanimivo pri teh dveh kompleksih, je to, da je proces v IMM odvisen od membranskega potenciala, ki je edini vir energije prenosa. [30-32].



Slika 12: kompleksa TIM in TOM [32]

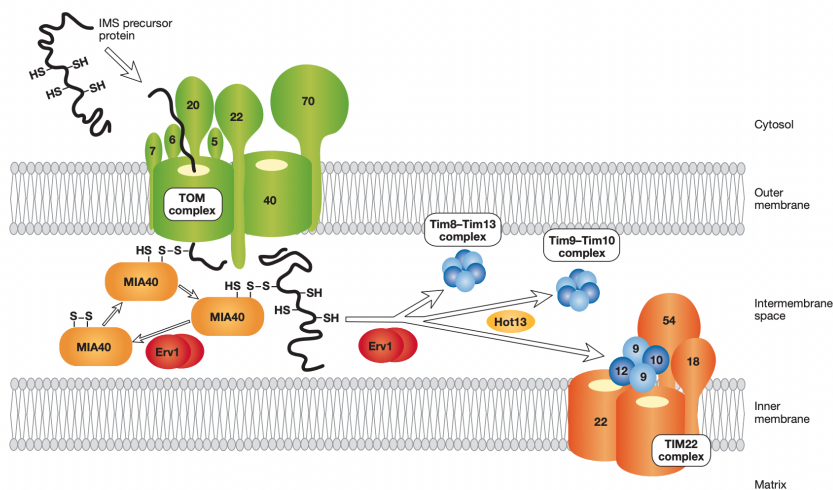
Poznamo pa še druge komplekse za transport proteinov čez mitohondrijsko membrano. Za prenos proteinov s topologijo β -sodčkov v OMM obstaja še dodaten kompleks – SAM. Za

njihovo biogenezo je potreben poseben mehanizem, ki je evolucijsko ohranjen, zato se ne prenašajo prek zgoraj omenjenih kompleksov. Tako kot ostali proteini, se tudi ti najprej prenesejo v IMS prek kompleksa TOM. Potem pa jih šaperonski kompleks TIM usmerja v kompleks SAM, s tem se prepreči agregacijo hidrofobnih peptidov v vodnem okolju IMS. Osrednji del kompleksa sestoji iz proteina Sam50, ki s svojo polipeptidno translokazno domeno prevzame protein iz šaperonskega kompleksa TIM. Kompleks tvorijo še proteini Sam37, Sam35 in Mdm10 [31]. Slednji sodeluje s kompleksom MDM, ki pa potem razvrsti proteine po OMM (slika 13) [32].



Slika 13: Transport prek kompleksa SAM [32]

Poznamo še en mehanizem, ki sodeluje pri transportu in razporejanju proteinov z disulfidnimi vezmi v IMS – pot MIA. Majhni proteini preprosto prehajajo čez kanalček TOM in se ujamejo v IMS. Mia40 prepozna hidrofobne regije prekursorov proteinov in se veže nanje prek mešanih disulfidnih vezi. S sulfidril oksidazo Erv1 prenese disulfidne vezi na prekursorske proteine, Erv1 pa ga potem nazaj reoksidira. Tako se tvorijo oligomerni kompleksi. V naslednji korakih se še predvideva, da nekateri TIM kompleksi (Hot13), ki so bogati s cisteinom, pomagajo pri končni sestavi proteinov (slika 14) [32].



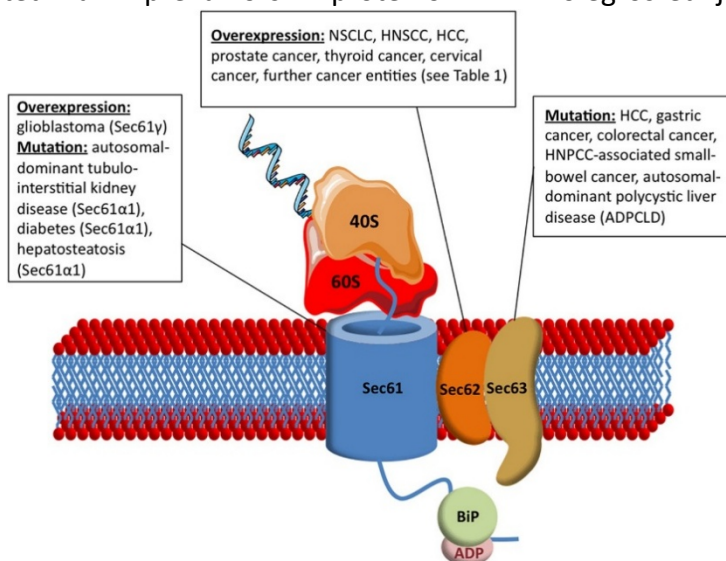
Slika 14: pot MIA [32]

6. S translokacijo proteinov povezane bolezni

Poznamo številne bolezni, ki so na tak ali drugačen način povezane s translokacijo proteinov. Lahko gre za okvaro v translokacijski mašineriji, nepravilnosti pri tovrstnem proteinu ali pa za neke tretje dejavnike, ki posredno vplivajo na spremenjen proces translokacije. V nadaljevanju so opisani nekateri primeri takšnih bolezni pri različnih vrstah transporta.

6.1 Policistična bolezen jeter (PLD)

Kompleksa Sec61 in Sec62/Sec63 se nahajata v membrani ER in imata osrednjo vlogo pri prenosu nastajajočih in na novo sintetiziranih prekurzorskih proteinov v ER. Poleg osrednje vloge pri prenosu proteinov so bile odkrite še dodatne funkcije proteinov Sec pri znotrajceličnem signaliziranju: Sec62 lahko povzroči ER-fagijo v procesu okrevanja celic po stresu ER, kanal Sec61 pa lahko deluje tudi kot pasivni kanal za uhajanje kalcija iz ER. Poleg tega so bile mutacije, amplifikacije in prekomerno izražanje genov *SEC* povezane z različnimi boleznimi, vključno z boleznimi ledvic in jeter, sladkorno boleznijo in rakom (slika 15) [33].



Slika 15: Bolezni povezane z geni *SEC* [33].

Policistična bolezen jeter (PLD) je klinično stanje, za katero je značilna prisotnost več kot 10 cist v jetrih. Gre za redko bolezen genetskega izvora, ki se lahko pojavi samostojno ali v povezavi s policistično boleznijo ledvic (PKD). Razvoj jetrnih cist je zapleten proces, ki vključuje več dejavnikov: genetske spremembe, malformacijo duktalne plošče, motnje v delovanju cilij, motnje v celični signalizaciji, delovanju hormonov in rastnih faktorjev, nepravilno proteostazo, povečano izločanje tekočine, fibrozo, spremembe v metabolizmu žolčnih kislin, povečano avtofagijo, spremembe v interakcijah celice z matriksom ter epigenetske spremembe. PLD se lahko pojavi kot izolirana manifestacija pri avtosomno dominantni PLD (ADPLD), kot ekstrarenalna manifestacija avtosomno dominantne PKD (ADPKD), ki je najpogostejša dedna nefropatija, ali redkeje pri avtosomno recesivni PKD (ARPKD). Z razvojem PLD so zato povezani različni geni [34].

Sec63 je bil prvi človeški protein Sec, ki so ga povezali s človeško boleznijo. ADPLD je lahko posledica mutacij v genu *SEC63* ali mutacij v genu *PRKCSH*, ki kodira za hepatocistin. Za *SEC63* so opisali dve mutaciji s premikom bralnega okvirja, dve mutaciji, ki sta uvedli prezgodnji stop kodon in dve drugi mutaciji, ki naj bi prekinili izrezovalna in spojitvena mesta, vse pa so povzročile izgubo funkcije gena. Nadaljnje študije so potrdile te rezultate in okrepile vlogo *SEC63* pri patogenezi ADPLD z motnjami v kotranslacijskem prenosu proteinov, kot sta policistina I in II, v ER. Proteina Sec63 in hepatocistin sodelujeta pri translokaciji čez membrano ER oz. pri procesiranju oligosaharidov na novo sintetiziranih glikoproteinov, kar nakazuje, da

sta glikozilacija in nadzor kakovosti ER osrednjega pomena za patologijo PLD. Verjetno je, da mutirana Sec63 in hepatocistin vplivata na posamezne proteine, ki posredujejo pri rasti in razmnoževanju žolčnih celic. Zaradi izgube Sec63 in/ali hepatocistina se ti proteini ne prenašajo (mutacije v genu *SEC63*) ali pa so napačno zviti, manj stabilni in dovzetni za razgradnjo (mutacije v genu *PRKCSH*). Pri ADPLD mutirana hepatocistin ali Sec63 torej oslabita normalno funkcijo procesiranja v ER in povzročita nadaljnjo dilatacijo intralobularnih žolčnih vodov ter s tem povečata cistogenezo [33, 35, 36].

6.2 Cistična fibroza (CF)

Cistična fibroza (CF) je genetska bolezen, ki je na nek način posledica okvarjenega prenosa iz ER. Do CF pride, ko mutacije v genu *CFTR*, ki nosi zapis za regulator transmembranske prevodnosti pri cistični fibrozi (CFTR), preprečijo pravilno zvitje in transport proteina, kar povzroči hude motnje celičnega delovanja. CFTR je od cAMP odvisen ionski kanal, ki se nahaja v apikalni membrani epiteljskih celic. Do motenj v delovanju CFTR lahko v splošnem pride zaradi napak v sintezi proteina, njegovem zvitju, znotrajceličnem prenosu, odpiranju kanala, prepustnosti za kloridne ione ali stabilnosti plazmaleme. V vsakem primeru pride ob izgubi CFTR do motenj v transportu vode, kloridov in/ali bikarbonata, ki vodijo do motenj v delovanju določenih tkiv, vključno z: zmanjšano zmogljivostjo trebušne slinavke, povečano količino klorida v znoju, črevesno obstrukcijo in, kar je najpomembnejše, kronično pljučno okužbo, vnetjem in smrtjo zaradi dihalne odpovedi [37].

Zvitje proteina poteka kotranslacijsko. V zdravih celicah nastajajoč protein prepozna SRP in ga usmeri na translokon Sec61 v membrani ER. V ER se nato do konca zvije v 5 domen, od katerih je ena intrinzično neurejena. Proces se začne s hitrim zvitjem nukleotid-vezavne domene 1 (NBD1), na katero se nato sestavita dve transmembranski domeni (TMD), sledi pa jim NBD2. Zvitje proteinov nadzorujejo šaperoni in pravilno zviti proteini nadaljujejo pot v GA za nadaljnjo procesiranje. Zvitje NBD1 je moteno pri tako imenovani mutanti $\Delta F508$, najpogostejši mutaciji, ki povzroča cistično fibrozo (CF). $\Delta F508$ ukine tudi hidrofobni stik med NBD1 in TMD2, ki je potreben za transport in odpiranje kanala. Nepravilno zvit protein se zadrži v ER in nato razgradi, kar povzroči pomanjkanje CFTR v plazmali [37–39].

6.3 Progerija ali Hutchinson-Gilfordov sindrom progerije (HGPS)

Progerija ali Hutchinson-Gilfordov sindrom progerije (HGPS) je ena najhujših motenj med laminopatijami - heterogeno skupino genetskih bolezni, ki temelji na mutacijah v genu *LMNA* in genih, ki kodirajo interakcijske proteine. Gre za motnjo prezgodnjega staranja, za katero so značilni simptomi: pomanjkanje podkožne maščobe, plešavost, otekle žile, zaostanek v rasti, starostne pege, kontraktуре sklepov, osteoporoza, kardiovaskularna patologija ter smrt zaradi srčnega infarkta ali kapi v otroštvu. Povprečna pričakovana življenjska doba je približno 13 let [40, 41].

HGPS povzroči dominantna *de novo* mutacija v genu, ki kodira lamin A in se nahaja na poziciji 1q22. Mutacija je tiha, vendar uvede kriptično mesto izrezovanja, ki povzroči nastanek nenormalnega proteina – progerina, ki ne gre skozi običajno procesiranje. Običajno zrel lamin A nastane iz prekursorske molekule: prelamin A. Prelamin A ima na C-koncu motiv CaaX, ki ga

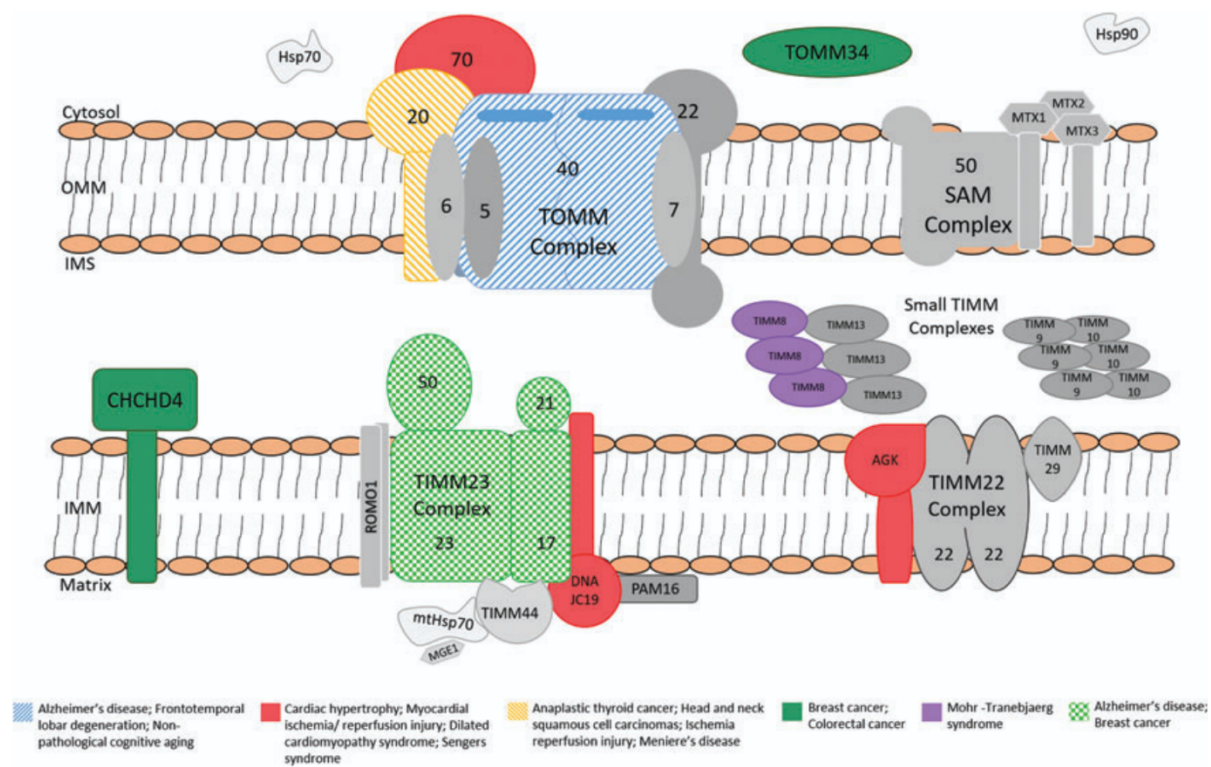
med posttranslacijskim procesiranjem prepozna encim farneziltransferaza (FTaza) in ga farnezilira na cisteinskem ostanku. Ko se ta reakcija izvede, se odstranijo zadnje tri aminokisline prelamina A (aaX) in pride do metilacije farneziliranega cisteina. Nato prelamin A z lateralnim transportom preide iz ER v notranjo jedrno membrano, kjer ga dokončno cepi cinkova metaloproteaza Zmpst24, ki odstrani zadnjih 15 aminokislin, ki vsebujejo farneziliran cistein, s C-konca proteina. V nasprotju s tem progerin nima mesta, ki bi ga Zmpst24 prepoznala, zato ne more opraviti končnega odcepa in protein ostane farneziliran in nepravilno zasidran v jedrni ovojnici. To ima vpliv na morfologijo in delovanje jedra, delovanje mitohondrijev, nukleocitoplazmatski transport proteinov in homeostazo telomer [41].

Selektivni prenos proteinov v jedro ali iz njega poteka čez NPC. Ena od najbolj očitnih celičnih sprememb v celicah HGPS je sprememba jedrne ovojnice, ki jo povzroči kopičenje progerina. S podrobnejšim pregledom je bilo ugotovljeno nenormalno nastajanje skupkov NPC. Iz teh opažanj so sklepali na možnost, da bi lahko bilo v celicah HGPS spremenjeno nukleocitoplazemsko prenašanje proteinov. Ugotovili so, da je bil v človeških fibroblastih HGPS zmanjšan jedrni import visokomolekularnih proteinov: E2-konjugacijskega encima Ubc9 in nukleoporina TPR. Z nadaljnjimi analizami so ugotovili, da je glavni vzrok za to okvaro neravnovesje v gradientu Ran-GTPaze, ki odločilno uravnava sestavo import-eksport kompleksov. Negativni učinek progerina se kaže tudi pri neklasični poti jedrnega importa, ki je odvisna od transportina-1 (TNPO-1). V celicah HGPS je opazna citoplazemska izolacija TNPO-1 z mrežo mikrotubulov, kar preprečuje jedrno translokacijo tovarnih proteinov, kot je nukleoporin Nup153. V povezavi s potjo jedrnega eksporta, ki je odvisna od eksportina 1 (XPO1), so pred kratkim dokazali, da je ta aktivnost v človeških fibroblastih HGPS nenormalno povečana zaradi prekomerne ekspresije XPO1. Povečan jedrni eksport vpliva na homeostazo proteinov, saj spreminja porazdelitev proteinov med jedrom in citoplazmo, kar lahko prispeva k patofiziologiji HGPS [41].

6.4 Mohr-Tranebjærgov sindrom (MTS)

Mohr-Tranebjærgov sindrom (MTS) je recesivna, na kromosom X-vezana sindromska izguba sluha, za katero je značilna gluhost v otroštvu, ki ji kasneje v življenju sledi progresivna degeneracija živčevja, ki prizadene možgane in optične živce. Globoka izguba sluha se običajno pojavi do 10. leta starosti, druge značilnosti sindroma pa se pokažejo pozneje v življenju, vključno s postopno izgubo vida, ki vodi v slepoto, nehotne mišične kontrakcije, mišična rigidnost oz. zakrčenost, agresivno vedenje, paranoja, motnje požiranja in demenca [42].

Vzrok bolezni je mutacija v genu *TIMM8A*, ki kodira ključno komponento mitohondrijskega sistema za import proteinov. TIMM8A služi kot translokaza notranje mitohondrijske membrane in skupaj s TIMM13 tvori 70 kDa-kompleks v mitohondrijskem medmembranskem prostoru (slika 16). Ta kompleks deluje kot šaperon za prekursorske proteine medmembranskega prostora in med drugim sodeluje pri importu TIMM23. V primeru mutacij je sestava kompleksa motena, uvoz TIMM23 pa zmanjšan. Ker je kompleks TIMM23 sestavni del importa vseh proteinov mitohondrijskega matriksa in številnih proteinov notranje mitohondrijske membrane, bi lahko bila motena biogeneza kompleksa TIMM23 glavni mehanizem za razvoj bolezni [42–44].



Slika 16: Bolezni povezane s prenosom proteinov čez mitohondrijske membrane [44].

Reference

- [1] D. Pei, R. E. Dalbey: Membrane translocation of folded proteins. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. July 1, 2022.
- [2] K. E. S. Matlack, W. Mothes, T. A. Rapoport: Protein Translocation: Review Tunnel Vision channel by an interaction between SRP and its mem-brane receptor. Targeting in posttranslational pathways also requires a signal sequence but does not require; 1998; Vol. 92.
- [3] A. R. Osborne, T. A. Rapoport, B. Van Den Berg: Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005, pp 529-550.
- [4] T. A. Rapoport: Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*. Nature Publishing Group November 29, 2007, pp 663-669.
- [5] K. S. Crowley, G. D. Reinhart, A. E. Johnson: The Signal Sequence Moves through a Ribosomal Tunnel into a Noncytoplasmic Aqueous Environment at the ER Membrane Early in Translocation; 1993; Vol. 73.
- [6] B. Van Den Berg, W. M. Clemons, I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison, T. A. Rapoport: X-ray structure of a protein-conducting channel; 2003.
- [7] C. Breyton, W. Haase, T. A. Rapoport, W. Kühlbrandt, I. Collinson: Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 2002, 418, 662-665.
- [8] C. R. Harris, T. J. Silhavy: Mapping an Interface of SecY (PrIA) and SecE (PrIG) by Using Synthetic Phenotypes and In Vivo Cross-Linking; 1999; Vol. 181.
- [9] M. Halic, R. Beckmann: The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd 2005, pp 116-125.
- [10] J. Lührink, I. Sinning: SRP-mediated protein targeting: Structure and function revisited. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. November 11, 2004, pp 17-35.
- [11] T. Connolly, R. Gilmore: Formation of a Functional Ribosome-Membrane Junction during Translocation Requires the Participation of a GTP-binding Protein; 1986; Vol. 103.
- [12] W. Mothes, S. U. Heinrich: Molecular Mechanism of Membrane Protein Integration into the Endoplasmic Reticulum; 1997; Vol. 89.
- [13] D. T. W. Ng, J. D. Brown, P. Walter: Signal Sequences Specify the Targeting Route to the Endoplasmic Reticulum Membrane.
- [14] Ratchet during Posttranslational Transport of Prepro- α Factor across the ER Membrane. *Cell* 1999, 97, 553–564.
- [15] L. L. Randall, T. B. Topping, S. J. S. Hardy, M. Y. Pavlov, D. V. Freistroffer, M. Ehrenberg: Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins; 1997; Vol. 94.
- [16] A. Economou, W. Wickner: SecA Promotes Preprotein Translocation by Undergoing ATP-Driven Cycles of Membrane Insertion and Deinsertion; 1994; Vol. 78.
- [17] B. C. Berks: The Twin-Arginine Protein Translocation Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 2015, 84, 843–864.

- [18] K. M. Frain, C. Robinson, J. M. Van Dijk: Transport of Folded Proteins by the Tat System. *Protein J.* 2019, 38, 377–388.
- [19] P. A. Lee, D. Tullman-Ercek, G. Georgiou: The Bacterial Twin-Arginine Translocation Pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006, 60, 373–395.
- [20] T. Palmer, B. C. Berks: The twin-arginine translocation (Tat) system. *Curr. Biol.* 2024, 34, R267–R268.
- [21] P. K. Kim, E. H. Hettema: Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. *J. Mol. Biol.* 2015, 427, 1176–1190.
- [22] T. Francisco, T. A. Rodrigues, A. F. Dias, A. Barros-Barbosa, D. Bicho, J. E. Azevedo: Protein transport into peroxisomes: Knowns and unknowns. *BioEssays* 2017, 39, 1700047.
- [23] M. L. Skowrya, P. Feng, T. A. Rapoport: Towards solving the mystery of peroxisomal matrix protein import. *Trends Cell Biol.* 2024, 34, 388–405.
- [24] M. L. Skowrya, T. A. Rapoport: Import mechanism of peroxisomal proteins with an N-terminal signal sequence. *Nat. Cell Biol.* 2025.
- [25] Alberts, Bruce, et al. “The Transport of Molecules between the Nucleus and the Cytosol.” *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition, Garland Science, 2002. [www.ncbi.nlm.nih.gov, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26932/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26932/).
- [26] Stewart, Murray. “Molecular Mechanism of the Nuclear Protein Import Cycle.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 3, Mar. 2007, pp. 195–208. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/nrm2114>.
- [27] Yang, Yang, et al. “Nuclear Transport Proteins: Structure, Function and Disease Relevance.” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 8, no. 1, Nov. 2023, pp. 1–29. [www.nature.com, https://doi.org/10.1038/s41392-023-01649-4](https://doi.org/10.1038/s41392-023-01649-4).
- [28] Kim, Yun Hak, et al. “The Molecular Mechanism for Nuclear Transport and Its Application.” *Anatomy & Cell Biology*, vol. 50, no. 2, June 2017, pp. 77–85. PubMed Central, <https://doi.org/10.5115/acb.2017.50.2.77>.
- [29] M. Giacomello, A. Pyakurel, C. Glytsou, in L. Scorrano, „The cell biology of mitochondrial membrane dynamics“, *Nat Rev Mol Cell Biol*, let. 21, št. 4, str. 204–224, apr. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0210-7.
- [30] W. Neupert in J. M. Herrmann, „Translocation of Proteins into Mitochondria“, *Annu Rev Biochem*, let. 76, št. 1, str. 723–749, jun. 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
- [31] M. Bohnert, N. Pfanner, in M. van der Laan, „A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins“, *FEBS Lett*, let. 581, št. 15, str. 2802–2810, jun. 2007, doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.004.
- [32] N. Bolender, A. Sickmann, R. Wagner, C. Meisinger, in N. Pfanner, „Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins“, *EMBO Rep*, let. 9, št. 1, str. 42–49, jan. 2008, doi: 10.1038/sj.embor.7401126.
- [33] M. Linxweiler, B. Schick, R. Zimmermann: Let’s talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017, 2, 1–10.

- [34] L. F. Norcia, E. M. Watanabe, P. T. Hamamoto Filho, C. N. Hasimoto, L. Pelafsky, W. K. de Oliveira, L. Y. Sasaki: Polycystic Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Hepatic Med. Evid. Res.* 2022, 14, 135–161.
- [35] J. P. H. Drenth, J. A. Martina, R. van de Kerkhof, J. S. Bonifacio, J. B. M. J. Jansen: Polycystic liver disease is a disorder of cotranslational protein processing. *Trends Mol. Med.* 2005, 11, 37–42.
- [36] N. Chandok: Polycystic liver disease: a clinical review. *Ann. Hepatol.* 2012, 11, 819–826.
- [37] S. J. Kim, W. R. Skach: Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Front. Pharmacol.* 2012, 3.
- [38] M. van Willigen, A. M. Vonk, H. Y. Yeoh, E. Kruisselbrink, B. Kleizen, C. K. van der Ent, M. R. Egmond, H. R. de Jonge, I. Braakman, J. M. Beekman, idr.: Folding–function relationship of the most common cystic fibrosis–causing CFTR conductance mutants. *Life Sci. Alliance* 2019, 2.
- [39] H. H. Kampinga, M. P. Mayer, A. Mogk: Protein quality control: from mechanism to disease. *Cell Stress Chaperones* 2019, 24, 1013–1026.
- [40] K. Piekarowicz, M. Machowska, V. Dzianisava, R. Rzepecki: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome—Current Status and Prospects for Gene Therapy Treatment. *Cells* 2019, 8, 88.
- [41] B. Cisneros, I. García-Aguirre, M. De Ita, I. Arrieta-Cruz, H. Rosas-Vargas: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Cellular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Arch. Med. Res.* 2023, 54, 102837.
- [42] F. Bahmad, S. N. Merchant, J. B. Nadol, L. Tranebjærg: OTOPATHOLOGY IN MOHR-TRANEBJÆRG SYNDROME. *The Laryngoscope* 2007, 117, 1202–1208.
- [43] J. A. MacKenzie, R. Mark Payne: Mitochondrial Protein Import and Human Health and Disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1772, 509–523.
- [44] T. Heinemeyer, M. Stemmet, S. Bardien, A. Neethling: Underappreciated Roles of the Translocase of the Outer and Inner Mitochondrial Membrane Protein Complexes in Human Disease. *DNA Cell Biol.* 2019, 38, 23–40.