

© 2021 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 24: 1-25, 2021.  
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.370>

## Viaje al centro de la mitocondria: importación de proteínas, sus alteraciones y enfermedades relacionadas

Maria Clara Avendaño-Monsalve<sup>1</sup>,  
José Carlos Ponce-Rojas<sup>2</sup> y Soledad Funes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México. <sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular, Celular y del Desarrollo, Universidad de California Santa Bárbara, E.E.U.U. E-mail: \*sfunes@ifc.unam.mx

### RESUMEN

Las mitocondrias son organelos fascinantes, no solo porque son el sitio en donde se genera la energía de las células, sino por su relevancia en procesos y patologías de interés médico. La gran mayoría de las proteínas que constituyen el proteoma mitocondrial están codificadas en el núcleo y se traducen por ribosomas citosólicos, por lo que deben ser identificadas correctamente para ser distribuidas e insertadas en cada uno de los subcompartimentos mitocondriales. En este artículo realizamos una descripción de las maquinarias de importación mitocondrial, además de las diferentes respuestas celulares que contrarrestan las alteraciones en los procesos de transporte de las proteínas o cuando existe una disfunción mitocondrial. Finalmente, mencionamos las enfermedades causadas por mutaciones en los complejos transportadores y de distribución de las proteínas de este organelo, que se han identificado hasta la fecha.

**Palabras clave:** importación; presecuencia; translocación de proteínas; estrés; mitocondriopatías.

### Journey to the center of mitochondria: Protein import, its alterations and related diseases

### ABSTRACT

Mitochondria are exciting organelles not only because they are in charge of the energy production within the cell, but also because of their relevance in processes and pathologies of medical interest. The vast majority of the proteins that constitute the mitochondrial proteome are encoded in the nucleus and translated by cytosolic ribosomes, hence these have to be correctly identified in order to be distributed and inserted in each of the mitochondrial subcompartments. In this review, we describe the mitochondrial import machineries, as well as the different cellular responses to alterations in protein transport processes or when a mitochondrial dysfunction arises. Lastly, we give an overview of the identified pathologies triggered by mitochondrial dysfunction derived from mutations in the components of the import and sorting machineries of the organelle.

**Keywords:** protein import; presequence; protein translocation; stress; mitochondriopathies.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LECA, último ancestro común eucarionte; RNAt, ácido ribonucleico de transferencia; RNAr, ácido ribonucleico ribosomal; RNAm, ácido ribonucleico mensajero; TOM, translocasa de la membrana externa; SAM, maquinaria de distribución y ensamblaje; VDAC, canal aniónico dependiente del voltaje; ERMES, estructuras de encuentro entre el retículo endoplásmico y la mitocondria; MIM, maquinaria de importación mitocondrial; TIM22, translocasa de la membrana interna mitocondrial 22; TIM23, translocasa de la membrana interna mitocondrial 23; PAM, motor asociado a la translocasa de presecuencias; MTS, secuencia de localización mitocondrial; MPP, peptidasa de procesamiento mitocondrial; UPRam, respuesta a proteínas desplegadas activada por localización incorrecta de proteínas; mtDNA, DNA mitocondrial; mPOS, estrés provocado por sobreacumulación de precursores mitocondriales; mTAD, degradación de proteínas mitocondriales asociada a la translocación; mitoCPR, respuesta a problemas de importación de proteínas a la mitocondria; ER-SURF, ruta de recuperación superficial del retículo endoplásmico; DCMA, cardiomiopatía dilatada con ataxia; SMDMDM, displasia espondilo metafísica de Megarbane-Dagher-Melki; DDS, síndrome de distonía y sordera; VAV, vectores adenovirales; SDO, sulfuro dioxigenasa; MNGIE, encefalopatía mitocondrial neuro-gastrointestinal; TALENS, nucleasas efectoras similares a activadores transcripcionales; OXPHOS, fosforilación oxidativa.

## INTRODUCCIÓN

**L**as mitocondrias son organelos esenciales para la gran mayoría de las células eucariontes. Están compuestas por dos membranas lipídicas, que a su vez delimitan dos espacios acuosos independientes: la matriz y el espacio intermembranal. La membrana interna mitocondrial, además, se pliega hacia el interior de la matriz formando estructuras que se conocen como crestas mitocondriales. La función más estudiada de estos organelos es la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, sin embargo, también llevan a cabo el metabolismo de los aminoácidos y de los lípidos (la beta oxidación) y la formación de centros hierro-azufre. Además, las mitocondrias están estrechamente relacionadas con la apoptosis y, por lo tanto, son uno de los elementos claves de la supervivencia celular.

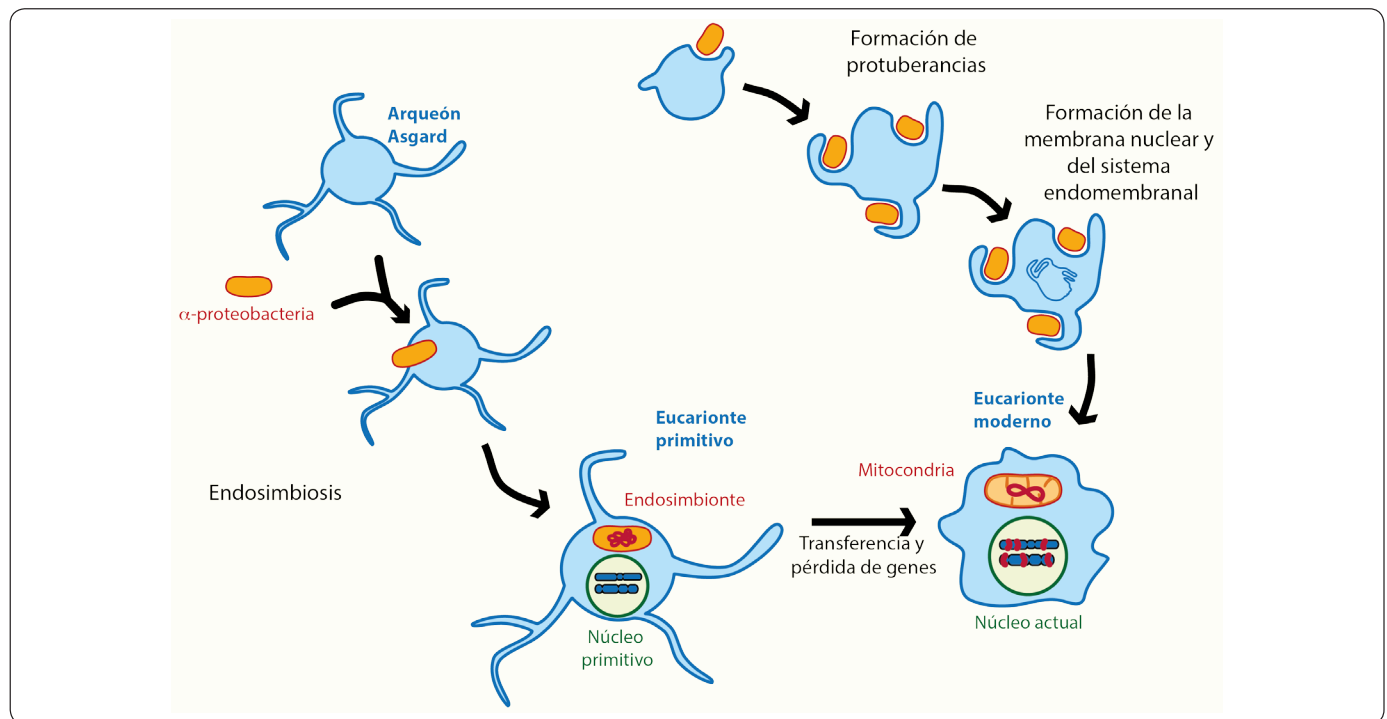
### Origen evolutivo de las mitocondrias

Se ha calculado que el origen de las células eucariontes data de entre 1,000 y 1,900 millones de años (Eme, Sharpe, Brown & Roger, 2014). El surgimiento de estas células ha sido tema de numerosos debates científicos, en particular sobre el tipo de organismos que se asociaron y las presiones evolutivas que favorecieron este proceso. Durante mucho tiempo se pensó que las mitocondrias se originaron por la endosimbiosis de una  $\alpha$ -proteobacteria con un protoeucarionte como lo propuso originalmente Lynn Margulis (Sagan, 1993). Sin embargo, hipótesis subsecuentes propusieron que el hospedero de la

$\alpha$ -proteobacteria podría haber sido un integrante del dominio Archea (Martin & Müller, 1998). Datos filogenéticos recientes sugieren fuertemente que el hospedero de esta endosimbiosis pertenecía a un arqueón del clado Asgard y que estos procariontes actuales son los familiares más cercanos a los eucariontes (**Figura 1, lado izquierdo**; Tria *et al.*, 2021; Williams, Cox, Foster, Szöllösi & Embley 2020; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Es posible que el hospedero original no haya sido un arqueón simple, sino un organismo quimérico con gran diversidad genética resultado de interacciones endosimbióticas transitorias anteriores o de eventos masivos de transferencia lateral de genes. En los últimos años, se han postulado diversas hipótesis que explican el establecimiento de la integración física de dos o más células en una y, por lo tanto, el origen de las células eucariontes. En general, en todos los modelos postulados se considera que las interacciones metabólicas entre las células procariontes involucradas favorecieron su asociación permanente con el hospedero. Sin embargo, además de los modelos clásicos de endosimbiosis, actualmente se han planteado mecanismos de fagocitosis o incluso de formación de protuberancias “de adentro hacia afuera” a través de las cuales se explica con mayor parsimonia la formación de la membrana nuclear y del sistema de endomembranas (**Figura 1, lado derecho**; Baum & Baum, 2014; Eme, Spang, Lombard, Stairs & Ettema, 2017; López-García & Moreira, 2020; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Como se puede apreciar, aún existen grandes incógnitas sobre el origen de las células eucariontes, algunas de ellas se podrán resolver tal vez al obtener mayor información sobre el grupo de las Asgard arqueas, tanto sobre la diversidad dentro de este grupo como de los mecanismos que les permiten establecer relaciones físicas con otros procariontes.

Independientemente de la identidad del hospedero o de su grado de complejidad estructural (por ejemplo, la existencia de otros organelos membranales), esta asociación endosimbiótica dio origen a un ancestro del que se propone derivan todos los eucariontes actuales y que se conoce como el último ancestro común eucarionte o LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor, por sus siglas en inglés, Eme *et al.*, 2017; Gray, 2012).

Uno de los desafíos más grandes con el establecimiento de LECA, además de coexistir y organizar el desarrollo celular de dos entidades independientes para asegurar la herencia de esta relación, fue la conservación, la transmisión, la coordinación y la lectura de dos genomas diferentes. Estos dos genomas son el del hospedero que se convirtió en el genoma nuclear y el del huésped que se convirtió en el genoma mitocondrial (Gray, 2015; Karakaidos & Rampias, 2020). Posteriormente, ocurrió una migración del material genético del huésped hacia el genoma del hospedero. Durante esta transferencia ha ocurrido un proceso de continua coevolución entre ambos genomas: a) se perdieron genes irrelevantes para el metabolismo del huésped en su nueva situación de organelo; b) se eliminaron genes con información redundante como procesos metabólicos repetidos;



**Figura 1. Origen de la célula eucarionte.** Existen dos modelos que explican el origen de las células eucariontes: el primero, del lado izquierdo, es la endosimbiosis; propone que el ancestro de un arqueón Asgard engulló una  $\alpha$ -proteobacteria para dar lugar a las células eucariontes actuales; el segundo, del lado derecho, indica que el ancestro eucarionte internalizó, mediante protuberancias de su membrana, la  $\alpha$ -proteobacteria. Sin importar el modelo, la transferencia de los genes desde la  $\alpha$ -proteobacteria, actual mitocondria, al núcleo del hospedero, fue un proceso consecuente. Elaboración personal.

y c) se establecieron sistemas bidireccionales de comunicación entre el núcleo y la mitocondria que coordinan la expresión genética de ambos genomas de acuerdo con las necesidades metabólicas de la célula (Bock, 2017). Actualmente, no se conoce totalmente cómo ocurre el proceso de migración de los genes mitocondriales al núcleo; sin embargo, se sabe que de forma natural el mtDNA puede escapar del organelo y convertirse en material genético nuclear o ser usado para la reparación de roturas del DNA de cadena doble en el núcleo (Bock, 2017; Portugez, Martin & Hazkani-Covo, 2018). Existen algunos estudios en levaduras donde se usan marcadores de selección que son transformados en la mitocondria y, de esta forma, es posible calcular la tasa de migración al núcleo, luego de colocar a las levaduras en un medio selectivo; con esta aproximación se ha podido estimar que para los genes mitocondriales la tasa es de  $2 \times 10^{-5}$ , sugiriendo que este proceso continúa ocurriendo (Thorsness & Fox, 1990). Sin embargo, existen genes que son retenidos en el genoma mitocondrial, particularmente aquellos que codifican para proteínas hidrofóbicas, aparentemente, porque representa una desventaja energética importar este tipo de proteínas desde el citosol (Björkholm, Harish, Hagström, Ernst & Andersson, 2015).

Los genomas mitocondriales actuales tienen estructuras muy diversas, algunos son lineales y otros circulares, algunos

contienen intrones y otros no, pero todos se componen de un número muy reducido de genes que generalmente codifican para proteínas hidrofóbicas de la cadena respiratoria, RNAt y RNAr (Burger, Gray & Franz Lang, 2003; Ghiselli *et al.*, 2021). Estos genes codifican tan solo el 1% del proteoma mitocondrial, lo que implica que el 99% restante se encuentra codificado en el genoma nuclear (Song, Hermann & Becker, *et al.*, 2021). Esta cantidad masiva de genes codificados en el núcleo son transcritos y posteriormente traducidos por ribosomas citosólicos. Por lo tanto, una necesidad adicional de la endosimbiosis fue el establecimiento de sistemas de reconocimiento y transporte de proteínas desde el citosol hasta la mitocondria (Herrmann, 2003). Es decir, establecer en las proteínas cuyo destino funcional es la mitocondria, una secuencia señal que sea reconocida tanto por las chaperonas en el citoplasma como por los receptores en el organelo, que aseguren su correcta entrega. En consecuencia, las proteínas mitocondriales son sintetizadas en el citosol como proteínas precursoras (también conocidas como proteínas sustrato o proteínas cliente) que únicamente alcanzan su plegamiento funcional al ser localizadas en su destino final (Becker, Song & Pfanner, 2019; Schmidt, Pfanner & Meisinger, 2010). El objetivo de este artículo es: (a) describir las maquinarias que se encargan del transporte de las proteínas mitocondriales y el tipo de secuencia señal que es reconocida por cada una

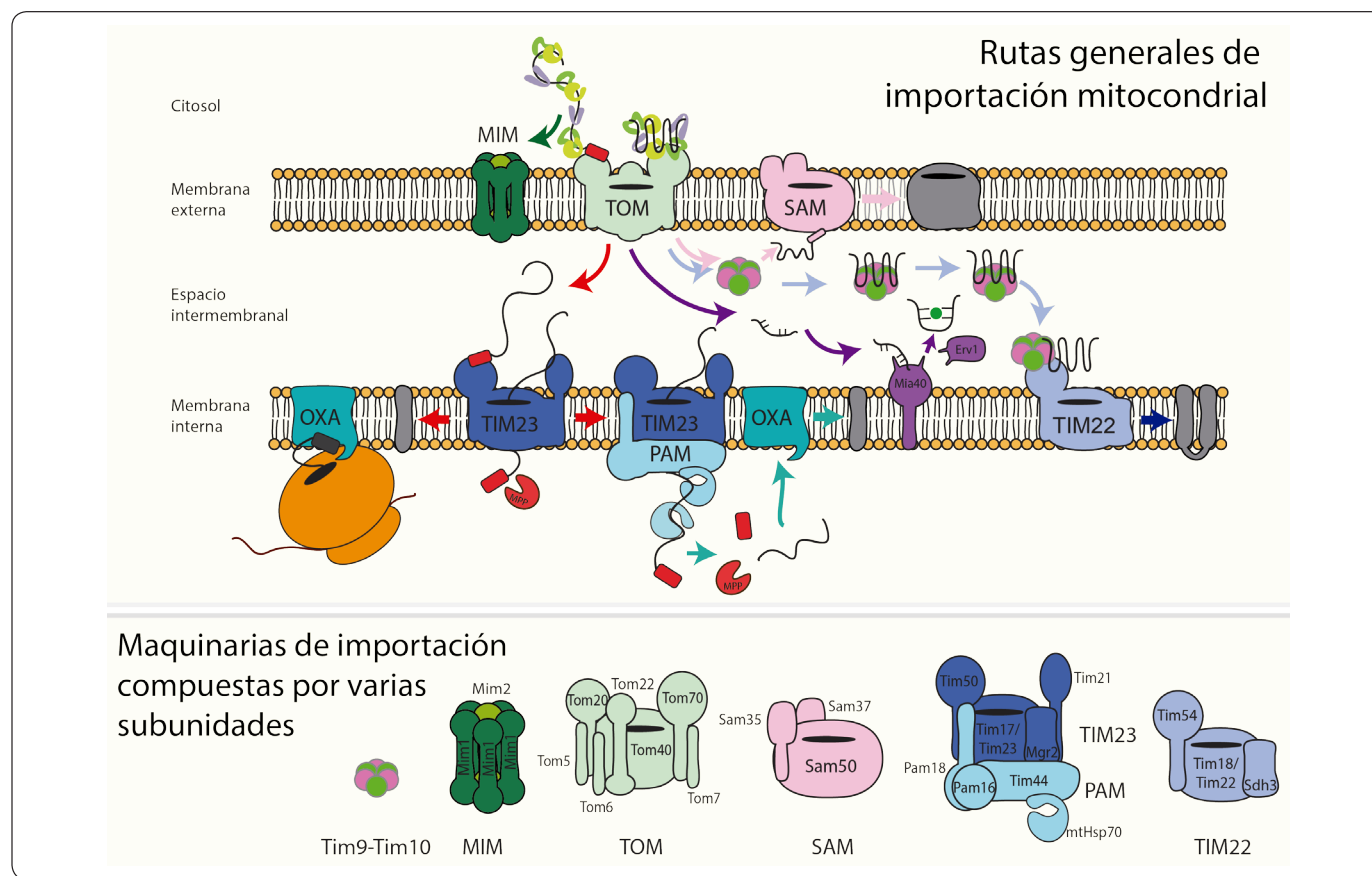
de estas maquinarias (b) detallar las respuestas celulares que se activan como resultado de las alteraciones de estos procesos de distribución; y (c) mencionar las enfermedades ocasionadas por mutaciones en los componentes de importación mitocondrial.

**MAQUINARIAS ENCARGADAS DE LA DISTRIBUCIÓN Y ENSAMBLAJE DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES**  
**El portal de entrada a la mitocondria TOM**

El complejo TOM (*Translocase of the Outer Membrane*, por sus siglas en inglés), localizado en la membrana externa mitocondrial, es el portal de entrada para casi todas las proteínas mitocondriales. TOM, está formado por tres receptores: Tom70, Tom20 y Tom22; tres subunidades pequeñas: Tom5, Tom6 y

Tom7, que juegan un rol importante durante la biogénesis y estabilidad del complejo, y Tom40, una proteína con estructura de barril-β que forma el poro por donde las proteínas mitocondriales son translocadas al interior del organelo (Figura 2, verde claro; Araiso *et al.*, 2019; Tucker & Park, 2019).

Los receptores de TOM están anclados en la membrana externa mitocondrial y exponen los dominios de unión a sustratos hacia el citosol. Estos receptores reciben a las proteínas mitocondriales mediante el reconocimiento de diversas secuencias señal. Mientras que Tom20 reconoce señales que dirigen proteínas hasta la matriz mitocondrial, Tom70 reconoce señales hidrofóbicas de proteínas cuyo destino es la membrana interna mitocondrial (Backes *et al.*, 2018; Brix, Dietmeier &



**Figura 2. Rutas de transporte de las proteínas mitocondriales.** Una vez que los precursores mitocondriales llegan hasta la periferia mitocondrial asociados a chaperonas, siguen diferentes rutas dependiendo del compartimento mitocondrial donde realizan su función. Las proteínas de la membrana externa mitocondrial tipo barril-β, atraviesan el complejo TOM y son recibidas por las pequeñas Tims que las dirigen al complejo SAM (flechas rosas). Las proteínas de la membrana externa mitocondrial, se anclan a la membrana directamente o utilizan el complejo MIM (flechas verde oscuro). Las proteínas del espacio intermembranal requieren de la proteína Mia40 para su importación (flechas moradas). Los precursores de la membrana interna mitocondrial que son transportadores de metabolitos usan el complejo TIM22 para su inserción, después de pasar por el complejo TOM (flechas azul claro). El complejo TIM23 participa en la importación de proteínas de la matriz mitocondrial (para esto se asocia con PAM) y de la membrana interna mitocondrial (flechas rojas). Finalmente, las proteínas sintetizadas en la mitocondria, son insertadas en la membrana interna mitocondrial por Oxa1. En el cuadro inferior se esquematizan las subunidades que constituyen cada uno de los complejos, sin embargo, los esquemas son sólo una representación gráfica. Los detalles estructurales se amplían en el texto y las Referencias. Elaboración personal.

Pfanner, 1997; Brix, Rudiger, Bukau, Scheneider-Mergener & Pfanner, 1999; Yamamoto *et al.*, 2009; Yamano *et al.*, 2008). Una vez que la proteína sustrato es reconocida por Tom20 o Tom70, esta es transferida al tercer receptor Tom22, cuyo papel es entregar a las proteínas al poro de translocación Tom40. Los sustratos cruzan la membrana externa mitocondrial a través de Tom40 y son recibidas en el espacio intermembranal por el extremo C-terminal de Tom22 (Mani, Rout, Desy & Schneider, 2017; Shiota, Mabuchi, Tanaka-Yamano, Yamano & Endo, 2011). De aquí en adelante, la proteína sustrato es entregada a otros complejos dentro de la mitocondria para su correcta distribución hacia el subcompartimento mitocondrial que será su destino final.

Recientemente, se han realizado esfuerzos por esclarecer la estructura y la estequiometría del complejo TOM en *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*, así como en *Homo sapiens* (Araiso *et al.*, 2019; Bausewein *et al.*, 2017; Tucker & Park, 2019; Wang *et al.*, 2020). De manera general, el complejo TOM es un dímero formado por dos poros Tom40 que están unidos por dos subunidades Tom22, las subunidades pequeñas Tom5, Tom6 y Tom7 se ubican en la periferia del poro de Tom40 de forma que Tom6 y Tom7 se encuentran en posiciones opuestas. Asimismo, se plantea la posibilidad de algunos estados de oligomerización del complejo TOM, al sugerir una transición de dímero a trímero (Araiso *et al.*, 2019; Shiota *et al.*, 2015) o incluso la formación de un tetrámero (Bausewein *et al.*, 2017; Tucker & Park, 2019; Wang *et al.*, 2020). Ninguna de las estructuras reportadas contiene a los receptores Tom20 y Tom70; por lo que, una de las preguntas abiertas más importantes en cuanto a la organización de este complejo es si la asociación de estas dos subunidades es transitoria, o si existen subtipos de complejos TOM, según la clase de precursores mitocondriales a importar.

### Pequeñas Tims, chaperonas del espacio intermembranal independientes de ATP

Las pequeñas Tims (pTims) son chaperonas localizadas en el espacio intermembranal que se unen a los precursores mitocondriales, evitando así que sus residuos hidrofóbicos queden expuestos al ambiente hidrofílico (Petrakis, Alcock & Tokatlidis, 2009; Wiedemann, Pfanner & Chacinska, 2006). Adicionalmente, las pTims participan en dirigir a estos precursores hacia la membrana externa o interna mitocondriales, donde los complejos proteicos SAM y TIM22, respectivamente, los insertan y ensamblan. Entre los sustratos de las pTims están: i) los transportadores de metabolitos como el transportador ADP/ATP (Curran, Leuenberger, Oppliger & Koehler, 2002; Endres, Neupert & Brunner, 1999; Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1998; Vasiljev *et al.*, 2004); ii) las proteínas tipo barril- $\beta$  como Tom40 (Wiedemann *et al.*, 2004); y iii) la proteína Tim23, una subunidad del complejo TIM23 (Curran, Leuenberger, Oppliger & Koehler, 2002; Davis, Alder, Jensen & Johnson, 2007; Davis, Sepuri, Holder, Johnson & Jensen, 2000).

Las pTims son: Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 y Tim13, las cuales forman complejos hexaméricos alternados. Aunque el complejo funcional predominante es Tim9<sub>3</sub>-Tim10<sub>3</sub> que es esencial en la levadura *S. cerevisiae* (**Figura 2, hexámero verde y rosa**; Vergnolle *et al.*, 2005; Webb, Gorman, Lazarou, Ryan & Gulbis, 2006); existe también el complejo análogo Tim8<sub>3</sub>-Tim13<sub>3</sub>. Por otro lado, Tim12 forma un complejo con Tim9<sub>3</sub>-Tim10<sub>3</sub>, relevante para la unión con el complejo TIM22, que será mencionado más adelante (Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1998). Los complejos Tim9<sub>3</sub>-Tim10<sub>3</sub> y Tim8<sub>3</sub>-Tim13<sub>3</sub> pesan aproximadamente 60 kDa y su estructura está formada por  $\alpha$ -hélices cuya forma se asemeja a una propela de 6 palas, donde cada una de las palas es una proteína Tim (Baker *et al.*, 2009; Beverly, Sawaya, Schmid & Koehler, 2008; Webb *et al.*, 2006). Cada pTim tiene un motivo de cisteínas CX<sub>3</sub>CX<sub>n</sub>CX<sub>3</sub>C (donde 11 < n < 16), importante en la formación de dos puentes disulfuro relevantes para su función y su estructura (Koehler, 2004).

### Las proteínas con estructura barril- $\beta$ utilizan la vía de inserción mediada por SAM

Una particularidad de la mitocondria es la presencia de proteínas con estructura de barril- $\beta$  en la membrana externa mitocondrial. Este tipo de proteínas también están presentes en las bacterias Gram-negativas y en la membrana externa de los cloroplastos (Chaturvedi & Mahalakshmi, 2017). Algunos ejemplos de barriles- $\beta$  mitocondriales son el poro de translocación Tom40, la porina (también llamada VDAC), que es una proteína que permite el transporte de iones y metabolitos, la subunidad Mdm10 del complejo ERMES, involucrado en mediar contactos mitocondria-retículo endoplásmico (Fairman, Noinaj & Buchanan, 2011; Flinner *et al.*, 2013; Tucker & Park, 2019) y la subunidad Sam50 del complejo SAM, cuyo rol es la inserción de barriles- $\beta$  en la mitocondria.

Insertar y plegar barriles- $\beta$  en la membrana externa mitocondrial es un proceso costoso desde el punto de vista energético. El sistema de transporte de estos sustratos consta de tres pasos sucesivos que involucran a tres diferentes complejos proteicos (**Figura 2, flechas rosas**). En el primer paso, el precursor del barril- $\beta$  llega al complejo TOM para ingresar a la mitocondria. El segundo paso, ocurre cuando el sustrato alcanza el espacio intermembranal y se asocia al complejo Tim9<sub>3</sub>-Tim10<sub>3</sub> (Habib, Waizenegger, Lech, Neupert & Rapaport, 2005; Weinhäupl *et al.*, 2018). Finalmente, el tercer paso implica la entrega al complejo SAM del sustrato (*Sorting and Assembly Machinery*, por sus siglas en inglés), en la membrana externa mitocondrial (Gentle, Gabriel, Beech, Waller & Lithgow, 2004; Qiu *et al.*, 2013; Wenz *et al.*, 2015; Wiedemann *et al.*, 2003).

SAM está formado por tres subunidades, Sam35, Sam37 y Sam50. La subunidad Sam50 es el núcleo del complejo y adopta una estructura barril- $\beta$  (Kozjak *et al.*, 2003; Stroud *et al.*, 2011). El modelo actual establece que Sam50 utiliza

su propia estructura para facilitar el plegamiento de otros barriles-β (Hohr *et al.*, 2018; Noinaj *et al.*, 2013). Sam35 y Sam37 son subunidades periféricas de SAM que se anclan a la membrana externa mitocondrial y quedan expuestas hacia el citosol. Sam35 funciona como receptor para los sustratos barril-β, mediante el reconocimiento de las señales-β en su extremo C-terminal (**Figura 3, caja rosa**; Chan & Lithgow, 2008; Habib *et al.*, 2007; Milenkovic *et al.*, 2004). Por su parte, Sam37 promueve la liberación de los barriles-β en la membrana externa mitocondrial una vez que han sido plegados correctamente (Chan & Lithgow, 2008). Adicionalmente, Sam37 promueve la asociación transitoria que ocurre entre TOM y SAM durante la biogénesis de los barriles-β (Qiu *et al.*, 2013; Wenz *et al.*, 2015). Esta asociación es una estrategia que minimiza el tiempo de exposición de los sustratos hidrofóbicos en el medio acuoso del espacio intermembranal. Finalmente, se ha sugerido que Sam37 podría funcionar, de manera similar a como lo hace Tom70, como un receptor para proteínas mitocondriales que deben ser translocadas al interior del organelo (Gratzer *et al.*, 1995; Ponce-Rojas *et al.*, 2017). La eliminación simultánea del gen *SAM37* con *TOM70* genera un fenotipo letal en la levadura

*S. cerevisiae*, lo cual sugiere que los dos receptores tienen papeles funcionales al menos, parcialmente redundantes. Sin embargo, también se ha observado que la asociación de Sam37 a TOM modifica ligeramente la afinidad de Tom70 por sus sustratos (Gratzer *et al.*, 1995). Por lo que es necesario realizar estudios adicionales para determinar hasta qué punto las funciones de Sam37 y Tom70 se sobrelapan, así como para determinar cómo la acción de uno modifica la especificidad del otro, durante el reconocimiento de las proteínas mitocondriales.

**El complejo MIM inserta proteínas con cruces transmembranales a la membrana externa mitocondrial**

Además de los barriles-β, existen proteínas mitocondriales con topología distinta en la membrana externa mitocondrial, ancladas por medio de uno o varios cruces transmembranales. Los cruces pueden localizarse tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal de las proteínas. Recientemente, se ha descrito que el complejo MIM (*Mitochondrial Import Machinery*, por sus siglas en inglés) promueve la inserción de este tipo de proteínas (**Figura 2, flecha verde oscuro**; Becker *et al.*, 2011; Papic, Krumpel, Dukanovic, Dimmer & Rapaport,

Tipo de señal	Maquinarias	Destino
<b>Secuencias señal editables</b> (Presecuencias α-hélices anfífilas)	TOM TIM23 PAM	Matriz
Ancla hidrofóbica Señal de transferencia detenida	TOM TIM23	Membrana interna Espacio intermembranal
Señal bipartita	TOM TIM23	Espacio intermembranal
<b>Señales no editables</b>		
Señal tipo presecuencia no editable	TOM TIM23	Membrana interna
Señales internas hidrofóbicas	TOM TIM22	Membrana interna
Señal β	TOM SAM	Membrana externa
Señal de anclaje en el N-terminal	Receptores TOM MIM	Membrana externa
Señal de anclaje en el C-terminal	Receptores TOM/SAM MIM	Membrana externa
Señales de retención en el espacio intermembranal ITS / MISS	TOM TIM 9/10 Mia40	Espacio intermembranal

Figura 3. Señales de localización mitocondrial. Las proteínas mitocondriales tienen señales a lo largo de su secuencia de aminoácidos que les permiten ser identificadas. Los detalles se muestran en la figura. Elaboración personal.

2011). El complejo MIM, localizado en la membrana externa mitocondrial, está formado por múltiples copias de la proteína de un cruce transmembranal Mim1 que se asocian formando un poro de translocación, además de una o dos copias de la proteína Mim2 (Dimmer *et al.*, 2012; Kruger *et al.*, 2017). MIM funciona en tres modos distintos: i) en forma individual, participa en la inserción de proteínas que tienen un cruce transmembranal (Doan *et al.*, 2020); ii) asociado al receptor Tom70, facilitando así la inserción de proteínas con uno o varios cruces transmembranales; o iii) acoplado al complejo SAM, para en conjunto insertar a las subunidades pequeñas del complejo TOM y sus receptores Tom20 y Tom70 en la membrana externa mitocondrial (Becker *et al.*, 2008; Popov-Celeketić, Waizenegger & Rapaport, 2008). Es posible que en este último caso la participación de MIM con SAM también asegure un ensamblaje eficiente y coordinado del complejo TOM. Esta coordinación durante el ensamblaje del complejo TOM podría evitar que sus subunidades individuales se encuentren en puntos distantes dentro de la membrana externa mitocondrial y de esta manera, afecten la importación de proteínas. Otra pregunta abierta es si la proteína Tom40 puede actuar sin las otras subunidades del complejo TOM, lo que podría provocar un paso desregulado de proteínas entre el citosol y el espacio intermembranal.

#### **El sistema de relevo oxidativo Mia40-Erv1 retiene proteínas en el espacio intermembranal y ayuda a su plegamiento**

La oxidorreductasa Mia40 es una proteína anclada en la membrana interna mitocondrial en la levadura *S. cerevisiae*, pero en las plantas y en los mamíferos se trata de una proteína soluble (CHCHD4 en mamíferos, Backes & Herrmann, 2017). Todos los homólogos de Mia40 comparten una región central en la que hay seis residuos de cisteína invariables organizados en un motivo CPC y dos motivos CX<sub>9</sub>C (donde X puede ser cualquier aminoácido). Mia40 recibe en el espacio intermembranal a las proteínas que ya cruzaron la membrana externa mitocondrial y establece enlaces disulfuro transitorios con las proteínas entrantes para evitar su regreso al citosol. Mia40 funciona también como chaperona al facilitar el plegamiento oxidativo de sus proteínas sustrato, ya que favorece el establecimiento de puentes disulfuro intramoleculares o la unión con iones divalentes (**Figura 2, flechas púrpura**; Backes & Herrmann, 2017; Stojanovski, Bragoszewski & Chacinska, 2012).

Las proteínas sustrato de Mia40 contienen residuos de cisteína en motivos CX<sub>3</sub>C o CX<sub>9</sub>C que son importantes, por un lado, para su retención en el espacio intermembranal, puesto que muchas de estas proteínas tienen una masa molecular pequeña y pueden entrar o salir de la mitocondria a través del complejo TOM (Stojanovski *et al.*, 2012); y, por otro lado, para los pasos posteriores de plegamiento oxidativo. Los sustratos contienen una secuencia señal de localización en el espacio intermembranal conocida como ITS o MISS, que se compone de 9 aminoácidos río arriba o río abajo de la cisteína importante para el anclaje. Esta secuencia señal forma una hélice

anfipática que expone residuos hidrofóbicos que se acoplan a una hendidura hidrofóbica en Mia40 (**Figura 3**; Milenkovic *et al.*, 2009; Sideris *et al.*, 2009).

Una vez que llega al espacio intermembranal, la proteína cliente forma un puente disulfuro transitorio con Mia40; paso inicial en el relevo redox entre ambas proteínas. Posteriormente, Mia40 se asocia tanto con el sustrato como con la proteína Erv1 para transferir los electrones liberados con la formación de los puentes disulfuro y permitir así la oxidación del precursor. Una vez oxidados, los sustratos son liberados en el espacio intermembranal y Mia40 queda en estado reducido. Para que un nuevo ciclo de importación comience, es necesario que Mia40 regrese a su estado oxidado. Esto se logra gracias a Erv1, que acepta los electrones de Mia40 reducida a través de la formación de nuevos puentes disulfuro. Finalmente, Erv1 transfiere los electrones a través del citocromo *c* a la cadena respiratoria, y, por lo tanto, al oxígeno, quien es el aceptor final de los electrones en el proceso. Es importante mencionar que la presencia del glutatión en el espacio intermembranal es necesaria para crear un ambiente que favorezca la formación de los puentes disulfuro (Bien *et al.*, 2010).

#### **Los transportadores de metabolitos se insertan mediante TIM22 en la membrana interna mitocondrial**

TIM22 (*Translocase of the Inner Membrane*, por sus siglas en inglés) es un complejo presente en la membrana interna mitocondrial encargado de insertar y ensamblar a los transportadores de metabolitos, en este mismo compartimento mitocondrial (Endres *et al.*, 1999; Gomkale *et al.*, 2020; Kubrich, Rassow, Voos, Pfanner & Honlinger, 1998; Rampelt *et al.*, 2020; Sirrenberg, Bauer, Guiard, Neupert & Brunner, 1996). El complejo TIM22 está formado por tres subunidades: Tim22, la cual forma el poro de translocación (Kubrich *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1996); Tim54, el receptor del complejo (Kerscher, Holder, Srinivasan, Leung & Jensen, 1997) y Tim18 que, además de mediar la inserción de las proteínas en la membrana interna mitocondrial, también promueve el ensamblaje y da estabilidad al complejo (Kerscher, Sepuri & Jensen, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Se ha observado que la proteína succinato deshidrogenasa 3 (Sdh3) interacciona con Tim18 y favorece el ensamblaje del complejo TIM22 (Gebert *et al.*, 2011).

Los complejos TOM y TIM22 trabajan en forma conjunta en cinco pasos que se describen a continuación (**Figura 2, flechas lavanda**; Pfanner & Neupert, 1987; Rehling, Brandner & Pfanner, 2004): i) el precursor mitocondrial es llevado hasta el complejo TOM por chaperonas presentes en el citosol (Young, Hoogenraad & Hartl, 2003) donde ii) interacciona con el receptor Tom70, que reconoce las secuencias internas en los precursores (Brix *et al.*, 2000; Wiedemann, Pfanner & Ryan, 2001; Young *et al.*, 2003), iii) al cruzar la membrana externa mitocondrial, el sustrato es recibido por las chaperonas Tim9<sub>3</sub>-Tim10<sub>3</sub> que

lo entregan al complejo TIM22 (Koehler *et al.*, 1998; Murphy, Leuenberger, Curran, Oppliger & Koehler, 2001), en este paso es importante la participación de la chaperona Tim12 (Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1996), ya que ésta facilita que Tim54 reconozca a la proteína sustrato, iv) el precursor es insertado y ensamblado en el poro del complejo aunque este proceso no se ha estudiado con gran detalle (Rehling *et al.*, 2004); y finalmente v) la proteína es liberada lateralmente e insertada en la membrana interna mitocondrial.

Las proteínas que son clientes del complejo TIM22, también presentan señales de localización mitocondrial caracterizadas por 6 cruces transmembranales de aproximadamente 10 aminoácidos cada uno; estas señales están integradas a la proteína y no son editables (**Figura 3**; Chacinska, Koehler, Milenkovic, Lithgow & Pfanner, 2009).

### Las proteínas cuyo destino es la matriz mitocondrial utilizan la ruta TIM23-PAM

El segundo complejo translocador de proteínas situado en la membrana interna mitocondrial es TIM23 (**Figura 2, azul**; *Translocase of the Inner Membrane*, por sus siglas en inglés), quien se encarga de facilitar la translocación de las proteínas que residen en la matriz mitocondrial o de insertarlas en la membrana interna, de una manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ; Callegari, Cruz-Zaragoza & Rehling, 2020; Mokranjac & Neupert, 2010; Schulz, Schendzielorz & Rehling, 2015). El potencial de membrana mitocondrial es un gradiente electroquímico que se establece a través de la membrana interna tanto por el paso de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, por los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria, así como por el paso de los electrones derivados de las reacciones de óxido-reducción del ciclo de Krebs. El gradiente de protones es aprovechado también para la síntesis de ATP (Zorova *et al.*, 2018; Rich & Maréchal, 2010).

TIM23 está formado por las siguientes subunidades: Tim17 y Tim23 que forman el poro de translocación (Dekker, *et al.*, 1993; Kubrich *et al.*, 1994; Maarse, Blom, Keil, Pfanner & Meijer, 1994); Tim50, es el receptor que reconoce las presecuencias de los precursores que provienen del complejo TOM (Geissler *et al.*, 2002; Mokranjac *et al.*, 2003; Mokranjac *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2002) y regula también la permeabilidad del poro formado por Tim23-Tim17 (Meinecke *et al.*, 2006) y Tim21, que es una proteína integral de membrana (Chacinska *et al.*, 2005; Mokranjac, Popov-Celeketić, Hell & Neupert, 2005) capaz de interactuar con el complejo TOM a través del receptor Tom22 (Albrecht *et al.*, 2006; Chacinska *et al.*, 2005). Además, Tim21 participa en la asociación del complejo TIM23 con los complejos de la cadena respiratoria (van der Laan *et al.*, 2006). Así, al crearse un potencial de membrana localizado, se facilita la translocación electroforética de las presecuencias y, por tanto, del resto de la proteína entrante.

Los precursores que se dirigen hacia la matriz mitocondrial contienen una presecuencia y utilizan la llamada “ruta de la presecuencia” (en inglés *Presequence Pathway*), que requiere el acoplamiento de TIM23 con el complejo motor PAM (**Figura 2, azul cielo**; *Presequence translocase-Associated Motor*, por sus siglas en inglés; Berthold *et al.*, 1995; Mokranjac, 2020). Esta presecuencia llamada MTS (*Matrix Targeting Sequence*, por sus siglas en inglés; **Figura 3**) está en el extremo N-terminal de las proteínas y se caracteriza por ser una alfa-hélice anfipática, con una cara cargada positivamente y la otra con aminoácidos hidrofóbicos; es de longitud variable, aunque generalmente está formada por 20-50 aminoácidos (von Heijne, 1986).

La función de PAM es promover la translocación de las proteínas sustrato a la matriz mitocondrial mediante el consumo de ATP. TIM23 y PAM se asocian a través de la proteína Tim44 (Maarse, Blom, Grivell & Meijer, 1992) que a su vez sirve como andamio para la chaperona dependiente de ATP mtHsp70/Ssc1, el primer componente de PAM (Kang *et al.*, 1990; Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994). mtHsp70 a su vez requiere de las cochaperonas Pam18 (D’Silva, Schilke, Walter, Andrew & Craig, 2003; Truscott *et al.*, 2003) y Pam16 (Frazier *et al.*, 2004) así como del factor de recambio de nucleótidos Mge1 (Miao, Davis & Craig, 1997). De esta forma, cuando un precursor atraviesa el complejo TIM23, se asocia a la mtHsp70 a través del dominio de unión al sustrato, mientras que el dominio de unión a nucleótidos, se une al ATP; acto seguido las proteínas Pam18 y Pam16 favorecen la hidrólisis del ATP y Mge1 intercambia el ADP por ATP, permitiendo la liberación del precursor y así, comienza un nuevo ciclo. Cada uno de estos ciclos de unión-liberación, permite la translocación de las proteínas hacia la matriz mitocondrial. Una vez que el precursor ingresa a la matriz mitocondrial, su MTS es eliminada por la proteasa de la matriz mitocondrial MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*, por sus siglas en inglés; Hawlitschek *et al.*, 1988), para que el sustrato alcance su estado maduro y adquiera el plegamiento apropiado para su función. Existe otra subunidad accesorio, Pam17, a la que se le ha adjudicado la función de estabilizar la unión de Pam18-Pam16 y de esta forma, promover la asociación con Tim23 y Tim17 (van der Laan *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, las presecuencias dirigen a las proteínas hacia la matriz mitocondrial, sin embargo, pueden acompañarse de otros motivos que son interpretados por TIM23 y que determinan que el destino de un precursor no sea precisamente la matriz mitocondrial. Lo anterior acontece cuando una MTS es seguida de un cruce transmembranal que funciona como un ancla hidrofóbica (**Figura 3**). En este caso la señal indica que las proteínas deben ser insertadas en la membrana interna mitocondrial en un proceso denominado “transferencia detenida” (en inglés *Stop Transfer*; Glick *et al.*, 1992; van der Laan *et al.*, 2007). En estos casos, la MTS se expone a la matriz; sin embargo, el cruce transmembranal se retiene en



el canal de TIM23 y la proteína es liberada lateralmente con ayuda de la proteína Mgr2 (Ieva *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2020; Matta, Kumar & D'Silva, 2020). Ejemplos de proteínas que siguen esta ruta de importación son los citocromos  $c_1$  y  $b_2$  (Glick *et al.*, 1992). Una modificación de este proceso permite liberar a la proteína madura directamente al espacio intermembranal, cuando después del cruce transmembranal existe una secuencia de corte que es reconocida por las proteasas de la membrana interna mitocondrial (Gakh, Cavadini & Isaya, 2002). Por tener dos sitios de corte, este tipo de señales se conocen como señales bipartitas (**Figura 3**) como es el caso de la proteína Smac/Diablo (Burri *et al.*, 2005).

En ocasiones, los sustratos contienen más de un cruce transmembranal y, en estos casos, el segundo cruce es el que indica que se debe detener la importación, para que la proteína pueda ser liberada lateralmente a la membrana. Cuando esto ocurre, el primer cruce llega hasta la matriz mitocondrial y, posteriormente, se inserta en la membrana interna mitocondrial mediante un mecanismo llamado “distribución conservada” (en inglés *Conservative Sorting*) utilizando a la maquinaria Oxa1 (ver sección siguiente; Hartl, Schmidt, Wachter, Weiss & Neupert, 1986; Hell, Herrmann, Pratje, Neupert & Stuart, 1998; Herrmann, Neupert & Stuart, 1997). Es importante considerar que existen proteínas sustratos que utilizan tanto la “distribución conservada” como la “transferencia detenida” para alcanzar su topología final; como sucede para la proteína Mdl1, que ilustra la cooperación que existe entre los diferentes componentes de los sistemas de transporte de proteínas mitocondriales (Bohnert *et al.*, 2010).

### **Oxa1 inserta en la membrana interna mitocondrial proteínas codificadas en el genoma mitocondrial**

La translocasa Oxa1 es un miembro de la familia YidC/Oxa1/Alb3, presente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, respectivamente, por lo que se presume que los integrantes de esta familia están presentes en los organelos que fueron heredados de las bacterias endosimbiontes que les dieron origen. Los tres homólogos tienen una región central conservada de cinco cruces transmembranales esencial para insertar y plegar a las proteínas membranales (Funes, Kauff, van der Sluis, Ott & Herrmann, 2011).

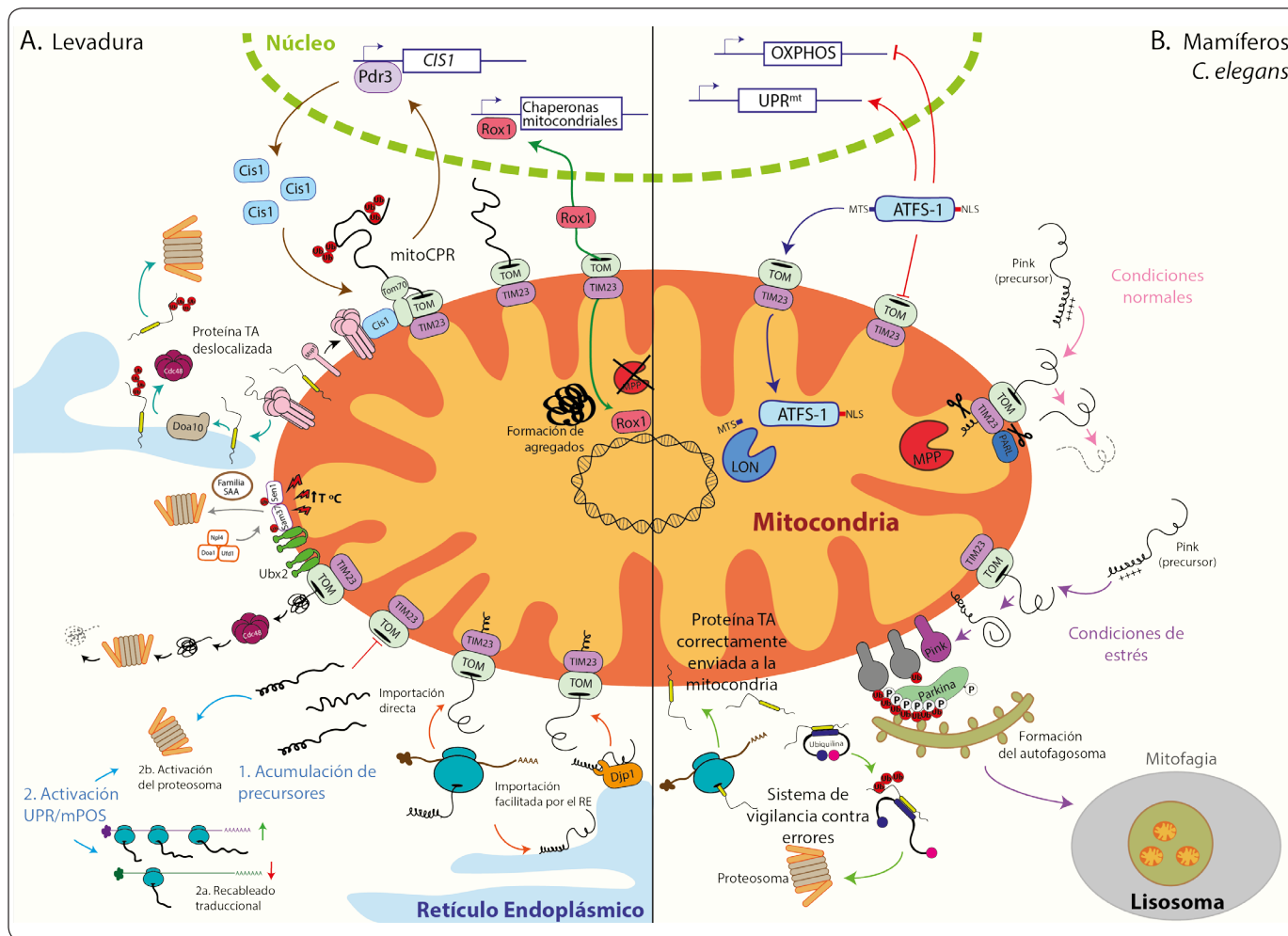
Localizada en la membrana interna mitocondrial, Oxa1 interacciona con proteínas recién importadas por el complejo TIM23 hasta la matriz y facilita su inserción en la membrana interna mitocondrial en una reacción de exportación, es decir, desde la matriz hacia la membrana interna mitocondrial (**Figura 2, turquesa**; Hell *et al.*, 1998). Además, media la inserción de proteínas codificadas en el genoma mitocondrial, al facilitar la asociación de los ribosomas mitocondriales con la membrana interna mitocondrial, en un proceso denominado inserción cotraduccional, ya que la síntesis de la proteína y la inserción suceden de forma simultánea. Este proceso requiere la presencia

de otras proteínas como Mba1, Mdm38 y Mrx15 para asegurar el anclaje del ribosoma con la membrana interna mitocondrial (Bauerschmitt *et al.*, 2010; Möller-Hergt, Carlström, Stephan, Imhof & Ott, 2018; Pfeffer, Woellhaf, Herrmann & Förster, 2015; Preuss, Ott, Funes, Luirink & Herrmann, 2005). La función de Oxa1 repercute indirectamente en la biogénesis de otros sustratos mitocondriales; esto se debe a que Oxa1 es necesaria para el ensamblaje del módulo Tim18-Sdh3 y, por tanto, la ausencia de Oxa1 compromete la inserción en la membrana interna de los transportadores de metabolitos dependientes de TIM22 (Hildenbeutel *et al.*, 2012; Stiller *et al.*, 2016).

### **RESPUESTAS CELULARES A FALLAS EN LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE E IMPORTACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES**

Dado que la importación de las proteínas a la mitocondria es un proceso complejo que implica diferentes pasos que van desde la síntesis, pasando por el transporte, la importación y la ubicación en el compartimento mitocondrial correspondiente, está sujeto a fallas. Sin embargo, existen respuestas celulares que ayudan a contrarrestar estas alteraciones. En esta sección, se mencionan las principales características de las respuestas celulares activadas cuando ocurren alteraciones en los sistemas de transporte de las proteínas mitocondriales; un campo de investigación muy activo en los últimos años. Es importante mencionar que, en general, estas respuestas implican cambios tanto transcripcionales como traduccionales en la célula; es decir, se activan factores de transcripción que inducen la expresión de los genes relacionados con las respuestas al estrés; al tiempo que disminuye la síntesis de proteínas no requeridas (Boos *et al.*, 2019).

Cualquier alteración en los sistemas de transporte implica la acumulación de precursores mitocondriales en el citosol o en el poro de translocación Tom40. Un ejemplo del primer caso es la UPRam o mPOS (*Unfolded Protein Response activated by mistargeting of proteins* o *mitochondrial Precursor Over-accumulation Stress*, por sus siglas en inglés respectivamente; Wang & Chen, 2015; Wrobel *et al.*, 2015), ocasionada por alteraciones en el funcionamiento de Mia40 y cuyo resultado es un incremento en la actividad del proteosoma (la maquinaria encargada de la degradación de las proteínas en el citosol) y una reprogramación traduccional (**Figura 4, lado izquierdo, flechas azules claras**). En el segundo caso, la respuesta se llama mTAD (*Mitochondrial protein Translocation-Associated Degradation*, por sus siglas en inglés), caracterizada por la detección de la oclusión del complejo TOM por parte de la proteína Ubx2, que recluta a la AAA-ATPasa Cdc48 y remueve al precursor para su posterior degradación vía el proteosoma (**Figura 4, lado izquierdo, flechas negras**; Mårtensson *et al.*, 2019). Estudios recientes han mostrado que Ubx2 también favorece el marcaje por ubiquitinación de las proteínas mitocondriales que por aumentos en la temperatura no son funcionales y, por lo tanto, no son importadas a la



**Figura 4. Respuestas celulares a fallas en los sistemas de transporte y disfunción mitocondrial. A. Levadura *Sacharomyces cerevisiae*** *Rox1* (rojo fucsia) es un factor de transcripción que al fallar la proteasa MPP (rojo) se dirige al núcleo y promueve la transcripción de las chaperonas mitocondriales (flechas verdes). Fallas en las maquinarias de importación, como la obstrucción de TOM, inician diferentes respuestas: por un lado el reclutamiento de la proteína Msp1, que extrae al precursor para ser degradado (flechas cafés) y por otro la intervención de Cdc48 (rojo vino), reclutada por Ubx2 (verde limón), para extraer el precursor atascado del canal de TOM (flechas negras). La acumulación de precursores en el citosol ocasiona un reprogramado de la traducción para incrementar la síntesis de proteínas del proteosoma a través de UPRam/mPOS (flechas azules claras). Las alteraciones en las proteínas por cambios en la temperatura son detectados por Ubx2 (verde limón), que recluta al sistema Doa1-Ufd1-Npl4 y marca con ubiquitina (rojo cereza) a las proteínas dañadas para su posterior degradación (flechas grises). Las fallas en la distribución de las proteínas, tienen sus sistemas correctivos: las proteínas con topología TA del retículo endoplásmico, pero que se encuentran erróneamente en la mitocondria son re-localizadas por Msp1 (rosado claro) al retículo endoplásmico, donde son ubiquitinadas y retiradas para su degradación (flechas turquesas). Por su parte, las proteínas mitocondriales pueden ser dirigidas de forma errónea al retículo endoplásmico, sin embargo, *Djp1* (naranja) es capaz de redirigirlas a la mitocondria (flechas naranjas). **B. Mamíferos y *C. elegans***. La respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas o mtUPR, se caracteriza por la localización dual (mitocondrial/nuclear) de ATFS-1 (azul claro): cuando hay fallas en la mitocondria, ATFS-1 se dirige al núcleo para promover la transcripción de genes que ayuden a contrarrestar la falla (flechas azules y rojas). PINK es una proteína mitocondrial que en condiciones de estrés se encuentra en la membrana externa mitocondrial y desde allí dirige una cascada de eventos junto con Parkina (fosforilación y ubiquitinación; verde pistachio), que actúa como señal para reclutar a la maquinaria autofágica (flechas rosadas y moradas). Las ubiquilinas (azul ultramar), son chaperonas citosólicas que reconocen a las proteínas con topología TA que no son dirigidas correctamente a la mitocondria, redirigen a estas proteínas o las marcan para su degradación (flechas verdes limón). Elaboración personal.

mitocondria. La función de Ubx2 requiere del reclutamiento de las proteínas Doa1-Ufd1-Npl4. Los sustratos no funcionales son ubiquitinados por Ubx2 una vez que fueron reconocidos por las chaperonas de la familia SSA y Sis1 (**Figura 4, lado izquierdo, flechas grises**; Metzger, Scales, Dunkleberger, Loncarek & Weissman, 2020).

Otra alteración en el sistema de importación ocurre cuando la peptidasa MPP no funciona adecuadamente e impide la correcta maduración de los precursores y el inicio de una respuesta temprana a proteínas mal plegadas, ya que se generan agregados proteicos en la matriz mitocondrial. Esta respuesta ocasiona que el factor de transcripción Rox1 sea importado a la mitocondria para unirse al ADN mitocondrial y, de esta forma, se asegure la relación funcional coordinada mitocondria-núcleo (**Figura 4, lado izquierdo, flechas verdes**; Poveda-Huertes *et al.*, 2020).

Otra proteína capaz de retirar precursores atrapados en Tom40 es Msp1, una AAA-ATPasa presente en la membrana externa mitocondrial. Alteraciones en el potencial electroquímico transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) pueden afectar la translocación de los precursores a través de Tom40 y bloquearlo. Msp1 es capaz de retirar al precursor que obstruye a Tom40 y dirigirlo a su degradación por el proteosoma (**Figura 4, lado izquierdo, flechas café**s; Basch *et al.*, 2020; Weidberg & Amon, 2018). Es importante mencionar que, para el caso de las proteínas con una señal bipartita, el paso de extracción requiere a la proteína Cis1, esta respuesta particular se denomina mitoCPR (*mitochondria Compromised Protein-import Response*, por sus siglas en inglés; Weidberg & Amon, 2018). El rol de Msp1 va más allá de rescatar a Tom40 de precursores atrapados, también es capaz de identificar proteínas del retículo endoplásmico que han sido insertadas erróneamente en la membrana externa mitocondrial y llevarlas a su destino original, donde son ubiquitinadas y extraídas por Cdc48 para su posterior degradación por el proteosoma (**Figura 4, lado izquierdo, flechas turquesas**; Dederer *et al.*, 2019; Matsumoto *et al.*, 2019).

Los errores en la distribución de las proteínas hacia los organelos incorrectos abarcan más ejemplos que el mencionado anteriormente. En ocasiones algunas proteínas mitocondriales pueden ser dirigidas erróneamente al retículo endoplásmico; en donde la proteína Djpl (localizada en la membrana del propio retículo) es capaz de reconocerlas y redirigirlas a la mitocondria para que continúen su proceso de importación y ensamblaje (**Figura 4, lado izquierdo, flechas naranjas**; Hansen *et al.*, 2018). Este mecanismo se denomina ER-SURF (*Endoplasmic Reticulum SURFace retrieval pathway*, por sus siglas en inglés). Otras proteínas, como las ubiquilinas de mamíferos, reconocen proteínas mitocondriales con topología TA (*Tail-Anchored*, por sus siglas en inglés; proteínas ancladas por un segmento transmembranal en su extremo C-terminal) que no fueron correctamente integradas en la membrana externa mitocondrial;

las ubiquilinas son capaces de redirigirlas o marcarlas para su posterior degradación (**Figura 4, lado derecho, flechas verde limón**; Itakura *et al.*, 2016).

En mamíferos también existen respuestas celulares por daño mitocondrial. El sistema más conocido es el par PINK1/Parkina, proteínas descubiertas en pacientes con enfermedad de Parkinson (Kitada *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2001), una enfermedad neurodegenerativa relacionada fuertemente con disfunción mitocondrial (Abou-Sleiman, Muqit & Wood, 2006). PINK1 es una cinasa que actúa como sensor del daño mitocondrial, generalmente ocasionado por una disminución en el potencial de membrana. Su función es fosforilar ubiquitinas previamente añadidas a proteínas de la membrana externa mitocondrial por Parkina. La acción conjunta de PINK1/Parkina genera ciclos de ubiquitinación-fosforilación en algunas proteínas de la membrana externa mitocondrial; estos ciclos funcionan como señal para el reclutamiento de la maquinaria autofágica y llevar a la mitocondria a su degradación en un proceso denominado mitofagia (**Figura 4, lado derecho, flechas rosas y moradas**; Nguyen, Padman & Lazarou, 2016; Yamano, Matsuda & Tanaka, 2016).

Uno de los factores de transcripción clave en la respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas es ATFS-1 en *Caenorhabditis elegans* (Nargund, Pellegrino, Fiorese, Baker & Haynes, 2012) o ATF5 en mamíferos (Zhao *et al.*, 2002). Este factor de transcripción tiene tanto una señal de localización mitocondrial como una de localización nuclear. En condiciones de homeostasis mitocondrial, ATFS-1 es importado hasta la matriz donde es degradado. Por el contrario, cuando hay un daño en la función mitocondrial que se refleja en la disminución del  $\Delta\Psi$ , ATFS-1 se acumula en el citosol y es translocado al núcleo para activar la transcripción de genes que permiten contrarrestar la disfunción en este organelo (**Figura 4, lado derecho, flechas azules y rojas**; Melber & Haynes, 2018; Qureshi, Haynes & Pellegrino, 2017). Entre los genes cuya expresión es inducida por ATFS-1 se encuentran chaperonas, proteasas y componentes de la maquinaria de importación mitocondrial (Lin *et al.*, 2016; Nargund, Fiorese, Pellegrino, Deng & Haynes, 2015; Nargund *et al.*, 2012).

## ENFERMEDADES ASOCIADAS A DEFECTOS DE IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

La mayor parte del conocimiento que tenemos sobre el funcionamiento y regulación de las maquinarias de importación de proteínas a la mitocondria proviene de estudios en organismos modelo. Sin embargo, se han identificado algunas enfermedades en humanos con mutaciones en componentes específicos de las maquinarias de importación, por lo que se ha planteado que los síntomas desarrollados son consecuencia de alteraciones durante la identificación y distribución de las proteínas mitocondriales. Hasta ahora, la mayoría de los reportes se limitan a describir la enfermedad y no ha sido posible comprender los detalles

del mecanismo que subyace en el desarrollo de los síntomas observados. Es fundamental entender cómo las mutaciones actualmente identificadas afectan la importación de proteínas a la mitocondria, con el fin de proponer terapias para el tratamiento de estas patologías.

**Enfermedades asociadas a la vía TOM-TIM23**

Debido a que la mayor parte del proteoma mitocondrial reside en la membrana interna y en la matriz, muchas de las enfermedades mitocondriales descritas hasta este momento están asociadas con defectos en la importación de proteínas cuya translocación o inserción depende de TIM23 (Tabla I).

La cardiomiopatía dilatada con ataxia DCMA (*Dilated CardioMyopathy with Ataxia*, por sus siglas en inglés) es una enfermedad que está relacionada con mutaciones en el gen *DNAJC19* cuyo correspondiente en *S. cerevisiae* es *PAM18* (Al Teneji, Siriwardena, George, Mital & Mercimek-Mahmutoglu, 2016; Davey *et al.*, 2006; Ojala *et al.*, 2012). Esta enfermedad

es autosómica recesiva y se caracteriza por la presencia de cardiomiopatía y ataxia desde la niñez (la ataxia es la incapacidad de coordinar movimientos voluntarios asociada con daño neural). A nivel molecular, la enfermedad causa una disminución en el contenido de las proteínas mitocondriales y en la actividad de los complejos de la fosforilación oxidativa, presuntamente, como resultado de la disminución en la importación de proteínas a la mitocondria. De manera similar a *DNAJC19*, mutaciones en el gen *MAGMAS*, el ortólogo en levadura de *PAM16*, provocan la displasia SMDMDM (*Spondylo Metaphyseal Dysplasia Megarbane-Dagher-Melki*, por sus siglas en inglés; Mehawej *et al.*, 2014; Short *et al.*, 2012; Sinha, Joshi, Chiittoor, Samji & D’Silva, 2010). Esta enfermedad se caracteriza por distrofia muscular severa y defectos en el crecimiento y el desarrollo.

La encefalopatía epiléptica mitocondrial ha sido relacionada con mutaciones en la subunidad Tim50 del complejo TIM23 (Shahrour *et al.*, 2017; Tort *et al.*, 2019). Esta enfermedad

**Tabla I. Enfermedades en humanos que se han asociado con mutaciones en las maquinarias de importación de proteínas a la mitocondria.**

Patología	Ruta de Importación	Gen afectado en humanos	Gen ortólogo en levaduras	Referencias
Cardiomiopatía dilatada con ataxia (DCMA)	TOM-TIM23	DNAJC19	<i>PAM18</i>	Davey <i>et al.</i> , 2006 Ojala <i>et al.</i> , 2012 Al Teneji <i>et al.</i> , 2016
Displasia SMDMDM		MAGMAS	<i>PAM16</i>	Sinha <i>et al.</i> , 2010 Short <i>et al.</i> , 2012 Mehawej <i>et al.</i> , 2014
Encefalopatía epiléptica mitocondrial		TIM50	<i>TIM50</i>	Shahrour <i>et al.</i> , 2017 Tort <i>et al.</i> , 2019
Ataxia espinocerebelar recesiva autosómica		PMPCA	<i>MAS2</i>	Choquet <i>et al.</i> , 2016 Jobling <i>et al.</i> , 2015
Enfermedad de Parkinson		TOMM20	<i>TOM20</i>	Di Maio <i>et al.</i> , 2016 Devi <i>et al.</i> , 2008 Franco-Iborra <i>et al.</i> , 2018
Enfermedad de Huntington		TIMM23	<i>TIM23</i>	Yablonska <i>et al.</i> , 2019 Yano <i>et al.</i> , 2014
Síndrome de distonía y sordera humana	TOM-TIM22	DDP1	<i>TIM8</i>	Koehler <i>et al.</i> , 1999 Tranebjaerg <i>et al.</i> , 1995
Síndrome de Sengers		AGK		Kang <i>et al.</i> , 2017 Vukotic <i>et al.</i> , 2017 Aldahmesh <i>et al.</i> , 2012 Mayr <i>et al.</i> , 2012 Calvo <i>et al.</i> , 2012 Bektas <i>et al.</i> , 2005
Miopatía	MIA	ALR	<i>ERV1</i>	Ceh-Pavia <i>et al.</i> , 2014 Sztolsztener <i>et al.</i> , 2013 Di Fonzo <i>et al.</i> , 2009

está asociada con defectos en la función de la ATP sintasa, posiblemente derivado de la disminución en la función de TIM23 y en los defectos de importación de las subunidades que participan en la fosforilación oxidativa.

Otra enfermedad relacionada con la ruta TOM-TIM23 es la ataxia espinocerebelar recesiva autosómica, ocasionada por mutaciones en el gen *PMPCA*, que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la proteasa de la matriz MPP en humanos (Choquet *et al.*, 2016; Jobling *et al.*, 2015). Uno de los sustratos identificados con un procesamiento anormal resultado de estas mutaciones es la frataxina, proteína involucrada en la formación de centros hierro-azufre en la mitocondria y cuya alteración se asocia con la ataxia de Friedreich (Joshi *et al.*, 2016). De manera similar, las mutaciones en el gen *PMPCB*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la MPP, se han relacionado con la neurodegeneración durante la infancia (Vögtle *et al.*, 2018). Es probable que en estos casos exista un procesamiento deficiente de las MTS mitocondriales, que desencadena tanto una respuesta a proteínas mal plegadas, como la retención de los precursores mitocondriales en los complejos TOM y TIM23, comprometiendo así la importación de otros sustratos mitocondriales.

La vía de importación TOM-TIM23 también está afectada en neuropatologías. En la enfermedad de Parkinson se encontró que versiones de la  $\alpha$ -sinucleína modificadas postraduccionalmente, inducen su interacción con el receptor Tom20 en las mitocondrias de las neuronas, tanto en modelos murinos como en muestras del tejido cerebral de pacientes (Di Maio *et al.*, 2016); y esta asociación se correlaciona con una disminución en los complejos respiratorios, particularmente del complejo I (Devi, Raghavendran, Prabhu, Avadhani & Anandatheerthavarada, 2008; Franco-Iborra *et al.*, 2018). Es probable que la asociación de la  $\alpha$ -sinucleína con Tom20 comprometa su asociación con otros sustratos de importación. Estos hallazgos podrían explicar la disfunción mitocondrial previamente descrita en la enfermedad de Parkinson. En la enfermedad de Huntington se ha propuesto un modelo similar de patogénesis, donde la proteína huntingtina mutante es capaz de asociarse al complejo TIM23 e inhibir su función (Yablonska *et al.*, 2019; Yano *et al.*, 2014).

#### Enfermedades asociadas a la vía TOM-TIM22

El síndrome de distonía (contracción muscular involuntaria) y sordera humana DDS (*human Deafness Distonia Syndrome*, por sus siglas en inglés), está ligado al cromosoma X y es ocasionado por mutaciones en el gen *DDPI*, que codifica a una proteína equivalente a Tim8 de *S. cerevisiae*, una de las chaperonas del espacio intermembranal (Koehler *et al.*, 1999; Tranebjaerg *et al.*, 1995). Las mutaciones en *DDPI* comprometen la función mitocondrial, posiblemente por el deterioro en la importación de proteínas a la mitocondria. El papel fundamental de las chaperonas del espacio intermembranal en las diversas rutas de importación podría explicar el fenotipo pleiotrópico encontrado

en pacientes con este síndrome, que incluyen retraso mental, pérdida de la audición y ceguera (Jin *et al.*, 1996).

El síndrome de Sengers es causado por mutaciones en el gen *AGK*, que codifica para la acil glicerol cinasa mitocondrial (Aldahmesh, Khan, Mohamed, Alghamdi & Alkuraya, 2012; Calvo *et al.*, 2012; Mayr *et al.*, 2012). Entre los síntomas de esta enfermedad se encuentran la cardiomiopatía hipertrófica, cataratas congénitas, acidosis láctica e intolerancia al ejercicio. Aunque inicialmente esta enzima se relacionó con la síntesis del ácido fosfatídico, recientemente se descubrió como una subunidad adicional del complejo TIM22 en humanos (Bektas *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2017; Vukotic *et al.*, 2017). La observación de que existe una disminución de los transportadores de metabolitos en la membrana interna mitocondrial en pacientes con síndrome de Sengers, refuerza la idea de que esta enfermedad está relacionada con defectos en la importación mediada por el complejo TIM22 (Kang *et al.*, 2017). A pesar de esto, aún no se ha dilucidado la relevancia del gen *AGK* en el desarrollo de la enfermedad de Sengers. Hasta este punto no se puede determinar si el rol de *AGK* ocurre sobre la biogénesis, la degradación, la estabilidad o la función de los transportadores de metabolitos en la membrana interna.

#### Enfermedades asociadas a la vía de MIA

Las mutaciones en el gen *ALR*, homólogo en *S. cerevisiae* del gen *ERV1*, provocan un cuadro patológico que incluye miopatía y cataratas (Di Fonzo *et al.*, 2009). Debido al papel de ALR/Erv1 en la vía de importación de proteínas al espacio intermembranal, es posible que la biogénesis de Mia40 esté afectada y, en consecuencia, también la importación de los sustratos que emplean esta vía (Ceh-Pavia, Ang, Spiller & Lu, 2014; Sztolsztener, Brewinska, Guiard & Chacinska, 2013).

#### Avances terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales

La terapia genética es una alternativa estudiada para curar enfermedades mitocondriales. En la actualidad, estas terapias se basan en el uso de vectores adeno-virales (VAVs) que permiten expresar un gen en un órgano blanco. Este tipo de terapias son más eficaces en las enfermedades causadas por la mutación de un solo gen, como es el caso de algunas ya mencionadas.

Los estudios pioneros en este campo demostraron la corrección de defectos musculares en ratones mutantes del gen *ANTI* (transportador de la membrana interna mitocondrial), al expresar el gen silvestre mediante VAVs (Flierl, Chen, Coskun, Samulski & Wallace, 2005). De manera similar, se ha logrado expresar a la enzima sulfuro dioxigenasa (SDO) en el hígado de ratones *knock-out* de la SDO, lo que restableció la función hepática y la supervivencia de los animales (Di Meo *et al.*, 2012). En otro ejemplo, el modelo murino *knock-out* del gen *TYMP* recrea el cuadro clínico observado en la encefalopatía mitocondrial neurogastrointestinal MNGIE (*Mitochondrial Neuro-GastroIntestinal*

*Encephalopathy*, por sus siglas en inglés). Para este último caso, también se han logrado revertir los cambios del metabolismo de la timidina con el uso de VAVs que permiten expresar al gen silvestre específicamente en el hígado (Torres-Torronteras *et al.*, 2014; Torres-Torronteras *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha logrado revertir la degeneración de las neuronas del nervio óptico en modelos murinos *Harlequin*, mediante la administración vítrea de VAVs para expresar al gen silvestre *AIF*; y en modelos murinos con atrofia óptica dominante (Klein *et al.*, 2002; Sarzi *et al.*, 2018). Es notable que estas aproximaciones han escalado a estudios clínicos en humanos. Un estudio reciente en fase III, realizado en pacientes con distrofia retinal, demostró mejoría en la función visual después de la administración subretinal de VAVs permitiendo la expresión del gen silvestre *RPE65* (Russell *et al.*, 2017).

Estos estudios sustentan la viabilidad de expresar genes mitocondriales en pacientes que padecen enfermedades mitocondriales asociadas con la mutación de un gen nuclear en particular. El éxito de estas terapias dependerá principalmente del diseño del sistema de expresión utilizado, por un lado, para asegurar una expresión específica en el órgano blanco (serotipo viral y promotor utilizados) y, por el otro, para asegurar la integración del producto proteico en el subcompartimento mitocondrial deseado (adición de secuencias señal correctas tanto a nivel de proteína como de RNAm).

Mención aparte, son las enfermedades ocasionadas por mutaciones del genoma mitocondrial. Ya que, el genoma mitocondrial se resguarda en la matriz mitocondrial, su manipulación representa un reto de mayor complejidad. El genoma mitocondrial codifica proteínas altamente hidrofóbicas que son parte de los complejos respiratorios, por lo que su expresión desde el núcleo o “expresión alotópica”, involucra el rediseño de la secuencia de aminoácidos de las proteínas para disminuir su hidrofobicidad y permitir su transporte y translocación exitosas a la mitocondria, pero conservando su asociación y función en los complejos respiratorios. Por todos estos aspectos, esta aproximación ha tenido resultados poco exitosos. Sin embargo, una estrategia diferente ha propuesto una solución a este problema con el uso de sistemas de edición genética con nucleasas híbridas denominadas TALENS (*Transcription activator-like effector nucleases*, por sus siglas en inglés). Las TALENS son nucleasas programables que cortan secuencias de DNA específicas, y han sido diseñadas para ingresar a la mitocondria y editar regiones del genoma mitocondrial, hasta el momento exitosas en modelos murinos de la mutación del RNAt<sup>A1a</sup>. Estos estudios han demostrado que el genoma mitocondrial dañado deja de ser detectado después de la edición por las TALENS, sugiriendo una mejoría en la función mitocondrial. Sin embargo, es indispensable realizar más pruebas, en particular con la función de la OXPHOS, para asegurar que este proceso de edición genera los resultados esperados (Bacman *et al.*, 2018; Gammage *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONES

Las mitocondrias son organelos que muy posiblemente se originaron a partir de un proceso endosimbionte entre una Archea y una  $\alpha$ -proteobacteria, afectando radicalmente a ambos organismos. Una de las consecuencias más importantes fue la migración de los genes del genoma del huésped al genoma hospedero; por lo que se hizo imperativo el desarrollo de diferentes sistemas de transporte y distribución de las proteínas mitocondriales, actualmente codificadas mayoritariamente en el genoma nuclear. De esta forma, las células eucariontes establecieron diversas maquinarias para la translocación e inserción de las proteínas mitocondriales en los diferentes subcompartimentos de este organelo. Como cualquier proceso celular, el transporte y la importación de proteínas a la mitocondria puede alterarse por diferentes factores. Conocer las respuestas celulares que se desencadenan ha sido un tema de gran avance en los últimos años, teniendo como corolario general que hay cambios transcripcionales y traduccionales que conllevan a la síntesis de proteínas que ayudan a contrarrestar los efectos del daño. La mayoría de las mutaciones en las subunidades que componen las maquinarias de translocación son letales; sin embargo, algunas de estas mutaciones son viables, aunque generan fenotipos severos en las personas que las poseen, subrayando la importancia del correcto funcionamiento de las mitocondrias.

## DECLARACIÓN DE CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

María Clara Avendaño-Monsalve, José Carlos Ponce-Rojas y Soledad Funes planearon el artículo, revisaron el material bibliográfico, escribieron el texto y elaboraron las figuras.

## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro trabajo está financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, IN207518 e IN208921) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT FORDECYT-PRONACES/54550/2020). María Clara Avendaño-Monsalve es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y ha sido apoyada de dos formas: una beca del CONACYT (464718) para la realización de sus estudios doctorales y un préstamo condonable del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (Convocatoria número 885). José Carlos Ponce-Rojas es apoyado con una beca de la UC-MEXUS (Convocatoria 2020). Al Dr. Diego González Halphen por revisar críticamente este manuscrito.

## REFERENCIAS

- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. & Wood, N. W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**(3), 207–219. <https://doi.org/10.1038/nrn1868>

- Al Teneiji, A., Siriwardena, K., George, K., Mital, S. & Mercimek-Mahmutoglu, S. (2016). Progressive Cerebellar Atrophy and a Novel Homozygous Pathogenic DNAJC19 Variant as a Cause of Dilated Cardiomyopathy Ataxia Syndrome. *Pediatric neurology*, **62**, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.03.020>
- Albrecht, R., Rehling, P., Chacinska, A., Brix, J., Cadamuro, S. A., Volkmer, R., Guiard, B., Pfanner, N. & Zeth, K. (2006). The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes. *EMBO reports*, **7(12)**, 1233–1238. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400828>
- Aldahmesh, M. A., Khan, A. O., Mohamed, J. Y., Alghamdi, M. H. & Alkuraya, F. S. (2012). Identification of a truncation mutation of acylglycerol kinase (AGK) gene in a novel autosomal recessive cataract locus. *Human mutation*, **33(6)**, 960–962. <https://doi.org/10.1002/humu.22071>
- Araiso, Y., Tsutsumi, A., Qiu, J., Imai, K., Shiota, T., Song, J., Lindau, C., Wenz, L. S., Sakaue, H., Yunoki, K., Kawano, S., Suzuki, J., Wischniewski, M., Schutze, C., Ariyama, H., Ando, T., Becker, T., Lithgow, T., Wiedemann, N., Pfanner, N., Kikkawa, M & Endo, T. (2019). Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. *Nature*, **575(7782)**, 395–401. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1680-7>
- Backes, S. & Herrmann, J. M. (2017). Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces. *Frontiers in molecular biosciences*, **4**, 83. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00083>
- Backes, S., Hess, S. Boos, F., Woellhaf, M. W., Godel, S., Jung, M., Muhlhaus, T. & Herrmann, J. M. (2018). Tom70 enhances mitochondrial preprotein import efficiency by binding to internal targeting sequences. *The Journal of cell biology*, **217(4)**, 1369–1382.
- Bacman, S. R., Kauppila, J., Pereira, C. V., Nissanka, N., Miranda, M., Pinto, M., Williams, S. L., Larsson, N. G., Stewart, J. B. & Moraes, C. T. (2018). MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA<sup>Ala</sup> levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nature medicine*, **24(11)**, 1696–1700. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0166-8>
- Baker, M. J., Webb, C. T., Stroud, D. A., Palmer, C. S., Frazier, A. E., Guiard, B., Chacinska, A., Gulbis, J. M. & Ryan, M. T. (2009). Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import. *Molecular biology of the cell*, **20(3)**, 769–779. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0903>
- Basch, M., Wagner, M., Rolland, S., Carbonell, A., Zeng, R., Khosravi, S., Schmidt, A., Aftab, W., Imhof, A., Wagener, J., Conradt, B., & Wagener, N. (2020). Msp1 cooperates with the proteasome for extraction of arrested mitochondrial import intermediates. *Molecular Biology of the Cell*, **31(8)**, 753–767. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-06-0329>
- Bauerschmitt, H., Mick, D. U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P. & Herrmann, J. M. (2010). Ribosome-binding Proteins Mdm38 and Mba1 Display Overlapping Functions for Regulation of Mitochondrial Translation. *Molecular biology of the cell*, **21(12)**, 1937–1944. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0101>
- Baum, D. A. & Baum, B. (2014). An inside-out origin for the eukaryotic cell. *BMC biology*, **12**, 76. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0076-2>
- Bausewein, T., Mills, D. J., Langer, J. D., Nitschke, B., Nussberger, S. & Kühlbrandt, W. (2017). Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*. *Cell*, **170(4)**, 693–700.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.012>
- 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. *The Journal of biological chemistry*, **283(1)**, 120–127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706997200>
- Becker, T., Song, J. & Pfanner, N. (2019). Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. *Trends in cell biology*, **29(7)**, 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.007>
- Becker, T., Wenz, L. S., Kruger, V., Lehmann, W., Muller, J. M., Goroncy, L., Zufall, N., Lithgow, T., Guiard, B., Chacinska, A., Wagner, R., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2011). The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *The Journal of cell biology*, **194(3)**, 387–395. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102044>
- Bektas, M., Payne, S. G., Liu, H., Goparaju, S., Milstien, S. & Spiegel, S. (2005). A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *The Journal of cell biology*, **169(5)**, 801–811. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407123>
- Berthold, J., Bauer, M. F., Schneider, H. C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. & Brunner, M. (1995). The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, **81(7)**, 1085–1093. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80013-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80013-3)
- Beverly, K. N., Sawaya, M. R., Schmid, E. & Koehler, C. M. (2008). The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23. *Journal of molecular biology*, **382(5)**, 1144–1156. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.069>
- Bien, M., Longen, S., Wagener, N., Chwalla, I., Herrmann, J. M. & Riemer, J. (2010). Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Molecular cell*, **37(4)**, 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.017>

- Björkholm, P., Harish, A., Hagström, E., Ernst, A. M. & Andersson, S. G. (2015). Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(33), 10154–10161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421372112>
- Bohnert, M., Rehling, P., Guiard, B., Herrmann, J. M., Pfanner, N. & van der Laan, M. (2010). Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Current biology: CB*, **20**(13), 1227–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.058>
- Boos, F., Kramer, L., Groh, C., Jung, F., Haberkant, P., Stein, F., Wollweber, F., Gackstatter, A., Zoller, E., van der Laan, M., Savitski, M. M., Benes, V. & Herrmann, J. M. (2019). Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme. *Nature cell biology*, **21**(4), 442–451. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0294-5>
- Brix, J., Dietmeier, K. & Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *The Journal of biological chemistry*, **272**(33), 20730–20735. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20730>
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. & Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *The Journal of biological chemistry*, **274**(23), 16522–16530. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16522>
- Brix, J., Ziegler, G. A., Dietmeier, K., Schneider-Mergener, J., Schulz, G. E. & Pfanner, N. (2000). The mitochondrial import receptor Tom70: identification of a 25 kDa core domain with a specific binding site for preproteins. *Journal of molecular biology*, **303**(4), 479–488. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4120>
- Bock, R. (2017). Witnessing Genome Evolution: Experimental Reconstruction of Endosymbiotic and Horizontal Gene Transfer. *Annual review of genetics*, **51**, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035329>
- Burger, G., Gray, M. W. & Franz Lang, B. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in genetics: TIG*, **19**(12), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012>
- Burri, L., Strahm, Y., Hawkins, C. J., Gentle, I. E., Puryer, M. A., Verhagen, A., Callus, B., Vaux, D. & Lithgow, T. (2005). Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Molecular biology of the cell*, **16**(6), 2926–2933. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1086>
- Callegari, S., Cruz-Zaragoza, L. D. & Rehling, P. (2020). From TOM to the TIM23 complex - handing over of a precursor. *Biological chemistry*, **401**(6-7), 709–721. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0101>
- Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D. B., Christodoulou, J., Fletcher, J. M., Bruno, D. L., Goldblatt, J., Dimauro, S., Thorburn, D. R. & Mootha, V. K. (2012). Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science translational medicine*, **4**(118), 118ra10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003310>
- Ceh-Pavia, E., Ang, S. K., Spiller, M. P. & Lu, H. (2014). The disease-associated mutation of the mitochondrial thiol oxidase Erv1 impairs cofactor binding during its catalytic reaction. *The Biochemical journal*, **464**(3), 449–459. <https://doi.org/10.1042/BJ20140679>
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, **138**(4), 628–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A. E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Truscott, K. N., Guiard, B., Pfanner, N. & Rehling, P. (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, **120**(6), 817–829. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.011>
- Chan, N. C. & Lithgow, T. (2008). The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Molecular biology of the cell*, **19**(1), 126–136. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0796>
- Chaturvedi, D. & Mahalakshmi, R. (2017). Transmembrane beta-barrels: Evolution, folding and energetics. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, **1859**(12), 2467–2482. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2017.09.020>
- Chquet, K., Zurita-Rendon, O., La Piana, R., Yang, S., Dicaire, M. J., Care4Rare, C., Boycott, K. M., Majewski, J., Shoubridge, E. A., Brais, B. & Tetreault, M. (2016). Autosomal recessive cerebellar ataxia caused by a homozygous mutation in PMPCA. *Brain: a journal of neurology*, **139**(Pt 3), e19. <https://doi.org/10.1093/brain/awv362>
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C. M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *The EMBO journal*, **21**(5), 942–953. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.942>
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Schmidt, E. & Koehler, C. M. (2002). The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *The Journal of cell biology*, **158**(6), 1017–1027. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205124>
- D’Silva, P. D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A. & Craig, E. A. (2003). J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(24), 13839–13844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1936150100>
- Davey, K. M., Parboosingh, J. S., McLeod, D. R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., Snyder, F. F., Bridge, P. J. & Bernier, L.



- F. P. (2006). Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *Journal of medical genetics*, **43(5)**, 385–393. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036657>
- Davis, A. J., Alder, N. N., Jensen, R. E. & Johnson, A. E. (2007). The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. *Molecular biology of the cell*, **18(2)**, 475–486. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0546>
- Davis, A. J., Sepuri, N. B., Holder, J., Johnson, A. E. & Jensen, R. E. (2000). Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *The Journal of cell biology*, **150(6)**, 1271–1282. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1271>
- Dederer, V., Khmelinskii, A., Huhn, A. G., Okreglak, V., Knop, M. & Lemberg, M. K. (2019). Cooperation of mitochondrial and ER factors in quality control of tail-anchored proteins. *eLife*, **8**, e45506. <https://doi.org/10.7554/eLife.45506>
- Dekker, P. J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A. C., Pfanner, N. & Meijer, M. (1993). Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS letters*, **330(1)**, 66–70. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80921-g](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80921-g)
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G. & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of biological chemistry*, **283(14)**, 9089–9100.
- Di Fonzo, A., Ronchi, D., Lodi, T., Fassone, E., Tigano, M., Lamperti, C., Corti, S., Bordoni, A., Fortunato, F., Nizzardo, M., Napoli, L., Donadoni, C., Salani, S., Saladino, F., Moggio, M., Bresolin, N., Ferrero, I. & Comi, G. P. (2009). The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *American journal of human genetics*, **84(5)**, 594–604. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.004>
- Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C. T., Burton, E. A., Hastings, T. G. & Greenamyre, J. T. (2016). alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, **8(342)**, 342ra78. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>
- Di Meo, I., Auricchio, A., Lamperti, C., Burlina, A., Viscomi, C. & Zeviani, M. (2012). Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO molecular medicine*, **4(9)**, 1008–1014. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201433>
- Dimmer, K. S., Papic, D., Schumann, B., Sperl, D., Krumpe, K., Walther, D. M. & Rapaport, D. (2012). A crucial role for Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Journal of cell science*, **125(Pt 14)**, 3464–3473. <https://doi.org/10.1242/jcs.103804>
- Doan, K. N., Grevel, A., Martensson, C. U., Ellenrieder, L., Thornton, N., Wenz, L. S., Opalinski, L., Guiard, B., Pfanner, N. & Becker, T. (2020). The Mitochondrial Import Complex MIM Functions as Main Translocase for alpha-Helical Outer Membrane Proteins. *Cell reports*, **31(4)**, 107567. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107567>
- Eme, L., Sharpe, S. C., Brown, M. W. & Roger, A. J. (2014). On the age of eukaryotes: evaluating evidence from fossils and molecular clocks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **6(8)**, a016139. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016139>
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W. & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature reviews. Microbiology*, **16(2)**, 120. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.154>
- Endres, M., Neupert, W. & Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *The EMBO journal*, **18(12)**, 3214–3221. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3214>
- Fairman, J. W., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. (2011). The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Current opinion in structural biology*, **21(4)**, 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.05.005>
- Flierl, A., Chen, Y., Coskun, P. E., Samulski, R. J. & Wallace, D. C. (2005). Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene therapy*, **12(7)**, 570–578. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302443>
- Flinner, N., Ellenrieder, L., Stiller, S. B., Becker, T., Schleiff, E. & Mirus, O. (2013). Mdm10 is an ancient eukaryotic porin co-occurring with the ERMES complex. *Biochimica et biophysica acta*, **1833(12)**, 3314–3325. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.006>
- Franco-Iborra, S., Cuadros, T., Parent, A., Romero-Gimenez, J., Vila, M. & Perier, C. (2018). Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell death & disease*, **9(11)**, 1122. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1154-0>
- Frazier, A. E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Bilanchone, V., Cumsy, M. G., Truscott, K. N., Pfanner, N. & Rehling, P. (2004). Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nature structural & molecular biology*, **11(3)**, 226–233. <https://doi.org/10.1038/nsmb735>
- Funes, S., Kauff, F., van der Sluis, E. O., Ott, M. & Herrmann, J. M. (2011). Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biological chemistry*, **392(1-2)**, 13–19. <https://doi.org/10.1002/biot.1000>

- org/10.1515/BC.2011.013
- Gakh, O., Cavadini, P. & Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et biophysica acta*, **1592(1)**, 63–77. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(02\)00265-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00265-3)
- Gammage, P. A., Viscomi, C., Simard, M. L., Costa, A., Gaude, E., Powell, C. A., Van Haute, L., McCann, B. J., Rebelo-Guioimar, P., Cerutti, R., Zhang, L., Rebar, E. J., Zeviani, M., Frezza, C., Stewart, J. B., & Minczuk, M. (2018). Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic tDNA mutation *in vivo*. *Nature medicine*, **24(11)**, 1691–1695. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0165-9>
- Gebert, N., Gebert, M., Oeljeklaus, S., von der Malsburg, K., Stroud, D. A., Kulawiak, B., Wirth, C., Zahedi, R. P., Dolezal, P., Wiese, S., Simon, O., Schulze-Specking, A., Truscott, K. N., Sickmann, A., Rehling, P., Guiard, B., Hunte, C., Warscheid, B., van der Laan, M., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2011). Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. *Molecular cell*, **44(5)**, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.025>
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Pfanner, N. & Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111(4)**, 507–518. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01073-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01073-5)
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. & Lithgow, T. (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *The Journal of cell biology*, **164(1)**, 19–24. <https://doi.org/10.1083/jcb.200310092>
- Ghiselli, F., Gomes-Dos-Santos, A., Adema, C. M., Lopes-Lima, M., Sharbrough, J. & Boore, J. L. (2021). Molluscan mitochondrial genomes break the rules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **376(1825)**, 20200159. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0159>
- Glick, B. S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R. L. & Schatz, G. (1992). Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, **69(5)**, 809–822. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90292-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90292-k)
- Gomkale, R., Cruz-Zaragoza, L. D., Suppanz, I., Guiard, B., Montoya, J., Callegari, S., Pacheu-Grau, D., Warscheid, B. & Rehling, P. (2020). Defining the Substrate Spectrum of the TIM22 Complex Identifies Pyruvate Carrier Subunits as Unconventional Cargos. *Current biology: CB*, **30(6)**, 1119–1127.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.024>
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R. E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S. D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G. & Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *The Journal of cell biology*, **129(1)**, 25–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.25>
- Gray, M. W. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4(9)**, a011403. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011403>
- Gray, M. W. (2015). Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112(33)**, 10133–10138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421379112>
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W. & Rapaport, D. (2005). Assembly of the TOB complex of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **280(8)**, 6434–6440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411510200>
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Niewianda, A., Paschen, S. A., Neupert, W. & Rapaport, D. (2007). The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *The Journal of cell biology*, **176(1)**, 77–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602050>
- Hansen, K. G., Aviram, N., Laborenz, J., Bibi, C., Meyer, M., Spang, A., Schuldiner, M. & Herrmann, J. M. (2018). An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, **361(6407)**, 1118–1122. <https://doi.org/10.1126/science.aar8174>
- Hartl, F. U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. & Neupert, W. (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell*, **47(6)**, 939–951. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90809-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90809-3)
- Hawltitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F. U. & Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, **53(5)**, 795–806. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90096-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90096-7)
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W. & Stuart, R. A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95(5)**, 2250–2255. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2250>
- Herrmann, J. M. (2003). Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends in microbiology*, **11(2)**, 74–79. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00033-1)
- Herrmann, J. M., Neupert, W. & Stuart, R. A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *The EMBO journal*, **16(9)**, 2217–2226. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2217>
- Hildenbeutel, M., Theis, M., Geier, M., Haferkamp, I., Neuhaus, H. E., Herrmann, J. M. & Ott, M. (2012). The Membrane Insertase Oxa1 Is Required for Efficient Import of Carrier Proteins into Mitochondria. *Journal of molecular biology*, **423(4)**, 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.018>

- Hohr, A. I. C., Lindau, C., Wirth, C., Qiu, J., Stroud, D. A., Kutik, S., Guiard, B., Hunte, C., Becker, T., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2018). Membrane protein insertion through a mitochondrial beta-barrel gate. *Science (New York, N.Y.)*, **359**(6373), eaah6834. <https://doi.org/10.1126/science.aah6834>
- Ieva, R., Schrempf, S. G., Opalinski, L., Wollweber, F., Hoss, P., Heisswolf, A. K., Gebert, M., Zhang, Y., Guiard, B., Rospert, S., Becker, T., Chacinska, A., Pfanner, N. & van der Laan, M. (2014). Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Molecular cell*, **56**(5), 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.010>
- Itakura, E., Zavodszky, E., Shao, S., Wohlever, M. L., Keenan, R. J., & Hegde, R. S. (2016). Ubiquilins Chaperone and Triage Mitochondrial Membrane Proteins for Degradation. *Molecular cell*, **63**(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.020>
- Jin, H., May, M., Tranebjaerg, L., Kendall, E., Fontan, G., Jackson, J., Subramony, S. H., Arena, F., Lubs, H., Smith, S., Stevenson, R., Schwartz, C. & Vetric, D. (1996). A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nature genetics*, **14**(2), 177–180. <https://doi.org/10.1038/ng1096-177>
- Jobling, R. K., Assoum, M., Gakh, O., Blaser, S., Raiman, J. A., Mignot, C., Roze, E., Durr, A., Brice, A., Levy, N., Prasad, C., Paton, T., Paterson, A. D., Roslin, N. M., Marshall, C. R., Desvignes, J. P., Roeckel-Trevisiol, N., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Megarbane, A., Isaya, G., Delague, V. & Yoon, G. (2015). PMPCA mutations cause abnormal mitochondrial protein processing in patients with non-progressive cerebellar ataxia. *Brain: a journal of neurology*, **138**(Pt 6), 1505–1517. <https://doi.org/10.1093/brain/awv057>
- Joshi, M., Anselm, I., Shi, J., Bale, T. A., Towne, M., Schmitz-Abe, K., Crowley, L., Giani, F. C., Kazerounian, S., Markianos, K., Lidov, H. G., Folkert, R., Sankaran, V. G. & Agrawal, P. B. (2016). Mutations in the substrate binding glycine-rich loop of the mitochondrial processing peptidase-alpha protein (PMPCA) cause a severe mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor molecular case studies*, **2**(3), a000786. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000786>
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A. & Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**(6297), 137–143. <https://doi.org/10.1038/348137a0>
- Kang, Y., Stroud, D. A., Baker, M. J., De Souza, D. P., Frazier, A. E., Liem, M., Tull, D., Mathivanan, S., McConville, M. J., Thorburn, D. R., Ryan, M. T. & Stojanovski, D. (2017). Sengers Syndrome-Associated Mitochondrial Acylglycerol Kinase Is a Subunit of the Human TIM22 Protein Import Complex. *Molecular cell*, **67**(3), 457–470.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.014>
- Karakaidos, P. & Rampias, T. (2020). Mitonuclear Interactions in the Maintenance of Mitochondrial Integrity. *Life (Basel, Switzerland)*, **10**(9), 173. <https://doi.org/10.3390/life10090173>
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S. & Jensen, R. E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*, **139**(7), 1663–1675. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1663>
- Kerscher, O., Sepuri, N. B. & Jensen, R. E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Molecular biology of the cell*, **11**(1), 103–116. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.103>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392**(6676), 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T. & Ackerman, S. L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, **419**(6905), 367–374. <https://doi.org/10.1038/nature01034>
- Koehler, C. M. (2004). The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends in biochemical sciences*, **29**(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.003>
- Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J. & Schatz, G. (1998). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science (New York, N.Y.)*, **279**(5349), 369–373. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.369>
- Koehler, C. M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. & Schatz, G. (1999). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(5), 2141–2146. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2141>
- Koehler, C. M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. & Tokatlidis, K. (1998). Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *The EMBO journal*, **17**(22), 6477–6486. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6477>
- Koehler, C. M., Murphy, M. P., Bally, N. A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. & Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Molecular and cellular biology*, **20**(4), 1187–1193. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1187-1193.2000>
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly

- machinery of the mitochondrial outer membrane. *The Journal of biological chemistry*, **278**(49), 48520–48523. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300442200>
- Kronidou, N. G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B. S., Schatz, G. & Horst, M. (1994). Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(26), 12818–12822. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12818>
- Kruger, V., Becker, T., Becker, L., Montilla-Martinez, M., Ellenrieder, L., Vogtle, F. N., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Wiedemann, N., Warscheid, B., Pfanner, N., Wagner, R. & Meisinger, C. (2017). Identification of new channels by systematic analysis of the mitochondrial outer membrane. *The Journal of cell biology*, **216**(11), 3485–3495. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706043>
- Kubrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P. J., Blom, J., Meijer, M. & Pfanner, N. (1994). The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS letters*, **349**(2), 222–228. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00670-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00670-9)
- Kubrich, M., Rassow, J., Voos, W., Pfanner, N. & Honlinger, A. (1998). The import route of ADP/ATP carrier into mitochondria separates from the general import pathway of cleavable preproteins at the trans side of the outer membrane. *The Journal of biological chemistry*, **273**(26), 16374–16381. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16374>
- Lee, S., Lee, H., Yoo, S., Ieva, R., van der Laan, M., von Heijne, G. & Kim, H. (2020). The Mgr2 subunit of the TIM23 complex regulates membrane insertion of marginal stop-transfer signals in the mitochondrial inner membrane. *FEBS letters*, **594**(6), 1081–1087. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13692>
- Lin, Y. F., Schulz, A. M., Pellegrino, M. W., Lu, Y., Shaham, S. & Haynes, C. M. (2016). Maintenance and propagation of a deleterious mitochondrial genome by the mitochondrial unfolded protein response. *Nature*, **533**(7603), 416–419. <https://doi.org/10.1038/nature17989>
- López-García, P. & Moreira, D. (2020). The Syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited. *Nature microbiology*, **5**(5), 655–667. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0710-4>
- Maarse, A. C., Blom, J., Grivell, L. A. & Meijer, M. (1992). MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *The EMBO journal*, **11**(10), 3619–3628.
- Maarse, A. C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. & Meijer, M. (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS letters*, **349**(2), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00669-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00669-5)
- Mani, J., Rout, S., Desy, S. & Schneider, A. (2017). Mitochondrial protein import - Functional analysis of the highly diverged Tom22 orthologue of *Trypanosoma brucei*. *Scientific reports*, **7**, 40738. <https://doi.org/10.1038/srep40738>
- Mårtensson, C. U., Priesnitz, C., Song, J., Ellenrieder, L., Doan, K. N., Boos, F., Floerchinger, A., Zufall, N., Oeljeklaus, S., Warscheid, B. & Becker, T. (2019). Mitochondrial protein translocation-associated degradation. *Nature*, **569**(7758), 679–683. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1227-y>
- Martin, W. & Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, **392**(6671), 37–41. <https://doi.org/10.1038/32096>
- Matsumoto, S., Nakatsukasa, K., Kakuta, C., Tamura, Y., Esaki, M. & Endo, T. (2019). Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. *Molecular cell*, **76**(1), 191–205.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.006>
- Matta, S. K., Kumar, A. & D’Silva, P. (2020). Mgr2 regulates mitochondrial preprotein import by associating with channel-forming Tim23 subunit. *Molecular biology of the cell*, **31**(11), 1112–1123. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0677>
- Mayr, J. A., Haack, T. B., Graf, E., Zimmermann, F. A., Wieland, T., Haberberger, B., Superti-Furga, A., Kirschner, J., Steinmann, B., Baumgartner, M. R., Moroni, I., Lamantea, E., Zeviani, M., Rodenburg, R. J., Smeitink, J., Strom, T. M., Meitinger, T., Sperl, W. & Prokisch, H. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *American journal of human genetics*, **90**(2), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.005>
- Mehawej, C., Delahodde, A., Legeai-Mallet, L., Delague, V., Kaci, N., Desvignes, J. P., Kibar, Z., Capo-Chichi, J. M., Chouery, E., Munnich, A., Cormier-Daire, V. & Mégarbané, A. (2014). The impairment of MAGMAS function in human is responsible for a severe skeletal dysplasia. *PLoS genetics*, **10**(5), e1004311. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004311>
- Meinecke, M., Wagner, R., Kovermann, P., Guiard, B., Mick, D. U., Hutu, D. P., Voos, W., Truscott, K. N., Chacinska, A., Pfanner, N. & Rehling, P. (2006). Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science (New York, N.Y.)*, **312**(5779), 1523–1526. <https://doi.org/10.1126/science.1127628>
- Melber, A. & Haynes, C. M. (2018). UPRmt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell research*, **28**(3), 281–295. <https://doi.org/10.1038/cr.2018.16>
- Metzger, M. B., Scales, J. L., Dunklebarger, M. F., Loncarek, J. & Weissman, A. M. (2020). A protein quality control pathway at the mitochondrial outer membrane. *eLife*, **9**, e51065. <https://doi.org/10.7554/eLife.51065>
- Miao, B., Davis, J. E. & Craig, E. A. (1997). Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology*, **265**(5), 541–552. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0762>
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer,

- H. E., Guiard, B., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *The Journal of biological chemistry*, **279**(21), 22781–22785. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400120200>
- Milenkovic, D., Ramming, T., Müller, J. M., Wenz, L. S., 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. *Molecular biology of the cell*, **20**(10), 2530–2539. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1108>
- Mokranjac D. (2020). How to get to the other side of the mitochondrial inner membrane - the protein import motor. *Biological chemistry*, **401**(6-7), 723–736. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0106>
- Mokranjac, D. & Neupert, W. (2010). The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochimica et biophysica acta*, **1797**(6-7), 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.026>
- Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W. & Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *The EMBO journal*, **22**(4), 816–825. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg090>
- Mokranjac, D., Popov-Celeketić, D., Hell, K. & Neupert, W. (2005). Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *The Journal of biological chemistry*, **280**(25), 23437–23440. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500135200>
- Mokranjac, D., Sichting, M., Popov-Celeketić, D., Mapa, K., Gevorkyan-Airapetov, L., Zohary, K., Hell, K., Azem, A. & Neupert, W. (2009). Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Molecular biology of the cell*, **20**(5), 1400–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0934>
- Möller-Hergt, B. V., Carlström, A., Stephan, K., Imhof, A. & Ott, M. (2018). The ribosome receptors Mrx15 and Mba1 jointly organize cotranslational insertion and protein biogenesis in mitochondria. *Molecular biology of the cell*, **29**(20), 2386–2396. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0227>
- Murphy, M. P., Leuenberger, D., Curran, S. P., Oppliger, W. & Koehler, C. M. (2001). The essential function of the small Tim proteins in the TIM22 import pathway does not depend on formation of the soluble 70-kilodalton complex. *Molecular and cellular biology*, **21**(18), 6132–6138. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6132-6138.2001>
- Nargund, A. M., Fiorese, C. J., Pellegrino, M. W., Deng, P. & Haynes, C. M. (2015). Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATF5-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Molecular cell*, **58**(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.008>
- Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M. & Haynes, C. M. (2012). Mitochondrial import efficiency of ATF5-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science (New York, N.Y.)*, **337**(6094), 587–590. <https://doi.org/10.1126/science.1223560>
- Nguyen, T. N., Padman, B. S. & Lazarou, M. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in cell biology*, **26**(10), 733–744. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Gumbart, J. C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N. C., Lithgow, T. & Buchanan, S. K. (2013). Structural insight into the biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins. *Nature*, **501**(7467), 385–390. <https://doi.org/10.1038/nature12521>
- Ojala, T., Polinati, P., Manninen, T., Hiippala, A., Rajantie, J., Karikoski, R., Suomalainen, A. & Tyni, T. (2012). New mutation of mitochondrial DNAJC19 causing dilated and noncompaction cardiomyopathy, anemia, ataxia, and male genital anomalies. *Pediatric research*, **72**(4), 432–437. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.92>
- Papic, D., Krumpke, K., Dukanovic, J., Dimmer, K. S. & Rapaport, D. (2011). Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway. *The Journal of cell biology*, **194**(3), 397–405. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102041>
- Petrakis, N., Alcock, F. & Tokatlidis, K. (2009). Mitochondrial ATP-independent chaperones. *IUBMB life*, **61**(9), 909–914. <https://doi.org/10.1002/iub.235>
- Pfanner, N. & Neupert, W. (1987). Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **262**(16), 7528–7536.
- Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M. & Förster, F. (2015). Organization of the mitochondrial translation machinery studied *in situ* by cryoelectron tomography. *Nature communications*, **6**, 6019. <https://doi.org/10.1038/ncomms7019>
- Ponce-Rojas, J. C., Avendaño-Monsalve, M. C., Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., DeLuna, A. & Funes, S. (2017).  $\alpha\beta$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *The FEBS journal*, **284**(5), 814–830. <https://doi.org/10.1111/febs.14024>
- Popov-Celeketić, J., Waizenegger, T. & Rapaport, D. (2008). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *Journal of molecular biology*, **376**(3), 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.006>
- Portugez, S., Martin, W. F. & Hazkani-Covo, E. (2018). Mosaic mitochondrial-plastid insertions into the nuclear genome show evidence of both non-homologous end joining and homologous recombination. *BMC evolutionary biology*, **18**(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1279-x>
- Poveda-Huertes, D., Matic, S., Marada, A., Habernig, L., Licheva, M., Myketin, L., Gilsbach, R., Tosal-Castano, S., Papinski, D., Mulica, P., Kretz, O., Kücükköse, C., Taskin, A. A., Hein, L., Kraft, C., Büttner, S., Meisinger, C. & Vögtle, F. N. (2020). An Early mtUPR: Redistribution

- of the Nuclear Transcription Factor Rox1 to Mitochondria Protects against Intramitochondrial Proteotoxic Aggregates. *Molecular cell*, **77(1)**, 180–188.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.026>
- Preuss, M., Ott, M., Funes, S., Luirink, J., & Herrmann, J. M. (2005). Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *The Journal of biological chemistry*, **280(13)**, 13004–13011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414093200>
- Qiu, J., Wenz, L. S., Zerbes, R. M., Oeljeklaus, S., Bohnert, M., Stroud, D. A., Wirth, C., Ellenrieder, L., Thornton, N., Kutik, S., Wiese, S., Schulze-Specking, A., Zufall, N., Chacinska, A., Guiard, B., Hunte, C., Warscheid, B., van der Laan, M., Pfanner, N., Wiedemann, N., & Becker, T. (2013). Coupling of mitochondrial import and export translocases by receptor-mediated supercomplex formation. *Cell*, **154(3)**, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.033>
- Qureshi, M. A., Haynes, C. M. & Pellegrino, M. W. (2017). The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *The Journal of biological chemistry*, **292(33)**, 13500–13506. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.791061>
- Rampelt, H., Succi, I., Bersch, B., Horten, P., Perschil, I., Martinou, J. C., van der Laan, M., Wiedemann, N., Schanda, P. & Pfanner, N. (2020). The mitochondrial carrier pathway transports non-canonical substrates with an odd number of transmembrane segments. *BMC biology*, **18(1)**, 2. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0733-6>
- Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E. A. & Pfanner, N. (1994). Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *The Journal of cell biology*, **127(6 Pt 1)**, 1547–1556. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1547>
- Rehling, P., Brandner, K. & Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **5(7)**, 519–530. <https://doi.org/10.1038/nrm1426>
- Rich, P. R. & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in biochemistry*, **47**, 1–23. <https://doi.org/10.1042/bse0470001>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J. A., Sohn, E. H., Mahajan, V. B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K., Simonelli, F., Leroy, B. P., Wright, J. F., High, K. A. & Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, **390(10097)**, 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sagan L. (1993). On the origin of mitosing cells. 1967. *The Journal of NIH research: life sciences research and news about the National Institutes of Health and the Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration*, **5(3)**, 65–72.
- Sarzi, E., Seveno, M., Piro-Mégy, C., Elzière, L., Quilès, M., Péquignot, M., Müller, A., Hamel, C. P., Lenaers, G. & Delettre, C. (2018). OPA1 gene therapy prevents retinal ganglion cell loss in a Dominant Optic Atrophy mouse model. *Scientific reports*, **8(1)**, 2468. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20838-8>
- Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **11(9)**, 655–667. <https://doi.org/10.1038/nrm2959>
- Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. & Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371(6500)**, 768–774. <https://doi.org/10.1038/371768a0>
- Schulz, C., Schendzielorz, A. & Rehling, P. (2015). Unlocking the presequence import pathway. *Trends in cell biology*, **25(5)**, 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.001>
- Shahrour, M. A., Staretz-Chacham, O., Dayan, D., Stephen, J., Weech, A., Damsch, N., Pri Chen, H., Edvardson, S., Mazaheri, S., Saada, A., NISC Intramural Sequencing, Hershkovitz, E., Shaag, A., Huizing, M., Abu-Libdeh, B., Gahl, W. A., Azem, A., Anikster, Y., Vilboux, T., Elpeleg, O. & Malicdan, M. C. (2017). Mitochondrial epileptic encephalopathy, 3-methylglutaconic aciduria and variable complex V deficiency associated with TIMM50 mutations. *Clinical genetics*, **91(5)**, 690–696. <https://doi.org/10.1111/cge.12855>
- Shiota, T., Mabuchi, H., Tanaka-Yamano, S., Yamano, K., & Endo, T. (2011). *In vivo* protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108(37)**, 15179–15183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105921108>
- Shiota, T., Imai, K., Qiu, J., Hewitt, V. L., Tan, K., Shen, H. H., Sakiyama, N., Fukasawa, Y., Hayat, S., Kamiya, M., Elofsson, A., Tomii, K., Horton, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., Lithgow, T. & Endo, T. (2015). Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science (New York, N. Y.)*, **349(6255)**, 1544–1548. <https://doi.org/10.1126/science.aac6428>
- Short, M. K., Hallett, J. P., Tar, K., Dange, T., Schmidt, M., Moir, R., Willis, I. M. & Jubinsky, P. T. (2012). The yeast magmas ortholog pam16 has an essential function in fermentative growth that involves sphingolipid metabolism. *PloS one*, **7(7)**, e39428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039428>
- Sideris, D. P., 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. *The Journal of cell biology*, **187**(7), 1007–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905134>
- Sinha, D., Joshi, N., Chittoor, B., Samji, P. & D'Silva, P. (2010). Role of Magmas in protein transport and human mitochondria biogenesis. *Human molecular genetics*, **19**(7), 1248–1262. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq002>
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W. & Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**(6609), 582–585. <https://doi.org/10.1038/384582a0>
- Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W. & Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**(6670), 912–915. <https://doi.org/10.1038/36136>
- Song, J., Herrmann, J. M. & Becker, T. (2021). Quality control of the mitochondrial proteome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **22**(1), 54–70. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00300-2>
- Stiller, S. B., Höpker, J., Oeljeklaus, S., Schütze, C., Schrempp, S. G., Vent-Schmidt, J., Horvath, S. E., Frazier, A. E., Gebert, N., van der Laan, M., Bohnert, M., Warscheid, B., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2016). Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell metabolism*, **23**(5), 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.005>
- Stojanovski, D., Bragoszewski, P. & Chacinska, A. (2012). The MIA pathway: a tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **1823**(7), 1142–1150. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.014>
- Stroud, D. A., Becker, T., Qiu, J., Stojanovski, D., Pfannschmidt, S., Wirth, C., Hunte, C., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2011). Biogenesis of mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. *Molecular biology of the cell*, **22**(16), 2823–2833. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0148>
- Sztolszterer, M. E., Brewinska, A., Guiard, B. & Chacinska, A. (2013). Disulfide bond formation: sulfhydryl oxidase ALR controls mitochondrial biogenesis of human MIA40. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **14**(3), 309–320. <https://doi.org/10.1111/tra.12030>
- Thorsness, P. E. & Fox, T. D. (1990). Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **346**(6282), 376–379. <https://doi.org/10.1038/346376a0>
- Torres-Torronteras, J., Viscomi, C., Cabrera-Pérez, R., Cámara, Y., Di Meo, I., Barquinero, J., Auricchio, A., Pizzorno, G., Hirano, M., Zeviani, M. & Martí, R. (2014). Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, **22**(5), 901–907. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.6>
- Torres-Torronteras, J., Cabrera-Pérez, R., Vila-Julíà, F., Viscomi, C., Cámara, Y., Hirano, M., Zeviani, M. & Martí, R. (2018). Long-Term Sustained Effect of Liver-Targeted Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Human gene therapy*, **29**(6), 708–718. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.133>
- Tort, F., Ugarteburu, O., Texidó, L., Gea-Sorlí, S., García-Villoria, J., Ferrer-Cortès, X., Arias, Á., Matalonga, L., Gort, L., Ferrer, I., Guitart-Mampel, M., Garrabou, G., Vaz, F. M., Pristoupilova, A., Rodríguez, M., Beltran, S., Cardellach, F., Wanders, R. J., Fillat, C., García-Silva, M. T. & Ribes, A. (2019). Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology. *Human mutation*, **40**(10), 1700–1712. <https://doi.org/10.1002/humu.23779>
- Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R. E., May, M., Arena, F. & Barker, D. (1995). A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *Journal of medical genetics*, **32**(4), 257–263. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.4.257>
- Tria, F., Brueckner, J., Skejo, J., Xavier, J. C., Kapust, N., Knopp, M., Wimmer, J., Nagies, F., Zimorski, V., Gould, S. B., Garg, S. G. & Martin, W. F. (2021). Gene duplications trace mitochondria to the onset of eukaryote complexity. *Genome biology and evolution*, evab055. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab055>
- Truscott, K. N., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Müller, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. & Pfanner, N. (2003). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *The Journal of cell biology*, **163**(4), 707–713. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308004>
- Tucker, K. & Park, E. (2019). Cryo-EM structure of the mitochondrial protein-import channel TOM complex at near-atomic resolution. *Nature structural & molecular biology*, **26**(12), 1158–1166. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0339-2>
- Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A. & Wood, N. W. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American journal of human genetics*, **68**(4), 895–900. <https://doi.org/10.1086/319522>
- van der Laan, M., Chacinska, A., Lind, M., Perschil, I., Sickmann, A., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. & Rehling, P. (2005). Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Molecular and cellular biology*, **25**(17), 7449–7458. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7449-7458.2005>

- van der Laan, M., Meinecke, M., Dudek, J., Hutu, D. P., Lind, M., Perschil, I., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N. & Rehling, P. (2007). Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nature cell biology*, **9**(10), 1152–1159. <https://doi.org/10.1038/ncb1635>
- van der Laan, M., Wiedemann, N., Mick, D. U., Guiard, B., Rehling, P. & Pfanner, N. (2006). A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. *Current biology: CB*, **16**(22), 2271–2276. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.025>
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F. E., Go, N. E., Habib, S. J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S. & Rapaport, D. (2004). Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Molecular biology of the cell*, **15**(3), 1445–1458. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0272>
- Vergnolle, M. A., Baud, C., Golovanov, A. P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L. Y. & Tokatlidis, K. (2005). Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *Journal of molecular biology*, **351**(4), 839–849. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.010>
- Vögtle, F. N., Brändl, B., Larson, A., Pendziwiat, M., Friederich, M. W., White, S. M., Basinger, A., Kücükköse, C., Muhle, H., Jähn, J. A., Keminer, O., Helbig, K. L., Delto, C. F., Myketin, L., Mossmann, D., Burger, N., Miyake, N., Burnett, A., van Baalen, A., Lovell, M. A., Matsumoto, N., Walsh, M., Yu, H. C., Shinde, D. N., Stephani, U., Van Hove, J. L. K., Müller, F. J. & Helbig, I. (2018). Mutations in PMPCB Encoding the Catalytic Subunit of the Mitochondrial Presequence Protease Cause Neurodegeneration in Early Childhood. *American journal of human genetics*, **102**(4), 557–573. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.014>
- von Heijne G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO journal*, **5**(6), 1335–1342.
- Vukotic, M., Nolte, H., König, T., Saita, S., Ananjew, M., Krüger, M., Tatsuta, T. & Langer, T. (2017). Acylglycerol Kinase Mutated in Sengers Syndrome Is a Subunit of the TIM22 Protein Translocase in Mitochondria. *Molecular cell*, **67**(3), 471–483.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.013>
- Wang, X. & Chen, X. J. (2015). A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature*, **524**(7566), 481–484. <https://doi.org/10.1038/nature14859>
- Wang, W., Chen, X., Zhang, L., Yi, J., Ma, Q., Yin, J., Zhuo, W., Gu, J. & Yang, M. (2020). Atomic structure of human TOM core complex. *Cell discovery*, **6**, 67. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00198-2>
- Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T. & Gulbis, J. M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Molecular cell*, **21**(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.010>
- Weidberg, H. & Amon, A. (2018). MitoCPR-A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress. *Science (New York, N.Y.)*, **360**(6385), eaan4146. <https://doi.org/10.1126/science.aan4146>
- Weinhäupl, K., Lindau, C., Hessel, A., Wang, Y., Schütze, C., Jores, T., Melchionda, L., Schönfisch, B., Kalbacher, H., Bersch, B., Rapaport, D., Brennich, M., Lindorff-Larsen, K., Wiedemann, N. & Schanda, P. (2018). Structural Basis of Membrane Protein Chaperoning through the Mitochondrial Intermembrane Space. *Cell*, **175**(5), 1365–1379.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.039>
- Wenz, L. S., Ellenrieder, L., Qiu, J., Bohnert, M., Zufall, N., van der Laan, M., Pfanner, N., Wiedemann, N. & Becker, T. (2015). Sam37 is crucial for formation of the mitochondrial TOM-SAM supercomplex, thereby promoting  $\beta$ -barrel biogenesis. *The Journal of cell biology*, **210**(7), 1047–1054. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504119>
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M. T., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, **424**(6948), 565–571. <https://doi.org/10.1038/nature01753>
- Wiedemann, N., Pfanner, N. & Chacinska, A. (2006). Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Molecular cell*, **21**(2), 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.001>
- Wiedemann, N., Pfanner, N. & Ryan, M. T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *The EMBO journal*, **20**(5), 951–960. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.951>
- Wiedemann, N., Truscott, K. N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2004). Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *The Journal of biological chemistry*, **279**(18), 18188–18194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400050200>
- Williams, T. A., Cox, C. J., Foster, P. G., Szöllösi, G. J. & Embley, T. M. (2020). Phylogenomics provides robust support for a two-domains tree of life. *Nature ecology & evolution*, **4**(1), 138–147. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1040-x>
- Wrobel, L., Topf, U., Bragoszewski, P., Wiese, S., Sztolsztener, M. E., Oeljeklaus, S., Varabyova, A., Lirski, M., Chroscicki, P., Mroczek, S., Januszewicz, E., Dziembowski, A., Koblowska, M., Warscheid, B. & Chacinska, A. (2015). Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature*, **524**(7566), 485–488. <https://doi.org/10.1038/nature14951>
- Yablonska, S., Ganesan, V., Ferrando, L. M., Kim, J., Pyzel, A., Baranova, O. V., Khattar, N. K., Larkin, T. M., Baranov, S.



- V., Chen, N., Strohlein, C. E., Stevens, D. A., Wang, X., Chang, Y. F., Schurdak, M. E., Carlisle, D. L., Minden, J. S. & Friedlander, R. M. (2019). Mutant huntingtin disrupts mitochondrial proteostasis by interacting with TIM23. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**(33), 16593–16602. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904101116>
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. i. & Endo, T. (2002). Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**(4), 519–528. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01053-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01053-x)
- Yamamoto, H., Fukui, K., Takahashi, H., Kitamura, S., Shiota, T., Terao, K., Uchida, M., Esaki, M., Nishikawa, S., Yoshihisa, T., Yamano, K. & Endo, T. (2009). Roles of Tom70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins. *The Journal of biological chemistry*, **284**(46), 31635–31646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041756>
- Yamano, K., Matsuda, N. & Tanaka, K. (2016). The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO reports*, **17**(3), 300–316. <https://doi.org/10.15252/embr.201541486>
- Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A. E., Jensen, R. E. & Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *The Journal of biological chemistry*, **283**(7), 3799–3807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708339200>
- Yano, H., Baranov, S. V., Baranova, O. V., Kim, J., Pan, Y., Yablonska, S., Carlisle, D. L., Ferrante, R. J., Kim, A. H. & Friedlander, R. M. (2014). Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature neuroscience*, **17**(6), 822–831. <https://doi.org/10.1038/nn.3721>
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J. & Hartl, F. U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, **112**(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01250-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01250-3)
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A. & Ettema, T. J. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, **541**(7637), 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature21031>
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO journal*, **21**(17), 4411–4419. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf445>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J. & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, **552**, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>