

Artykuł ten poświęcam mojemu serdecznemu Przyjacielowi, Profesorowi Lechowi Wojtczakowi, z którym razem w Polsce i najróżniejszych miejscach świata przeżywaliśmy emocje, jakie towarzyszyły wszystkim fascynującym odkryciom na polu energetyki i biogenezy mitochondriów. Temu mikrokosmosowi problemów biologicznych obaj przez całe życie pozostaliśmy wierni.

JAN MICHEJDA

*Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej
i Biotechnologii Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Fredry 10, 61-701 Poznań*

IMPORT BIAŁEK DO MITOCHONDRIÓW

WPROWADZENIE

Kiedy prawie 30 lat temu pisałem przegląd o biogenezie mitochondriów (MICHEJDA i PIETRZYKOWSKI 1969) do książki redagowanej przez Lecha Wojtczaka, byliśmy wszyscy zafascynowani świeżym wtedy odkryciem w mitochondriach DNA oraz aparatu do jego transkrypcji i translacji. O ile wiedza o energetycznych funkcjach mitochondrialnych była już dość dobrze ugruntowana i znalazła wspierające uogólnienie w chemiosmotycznej teorii P. Mitchella (około 1964) to problemy związane z biogenezą tych organelli dopiero się zarysowywały. Żartowano, że mitochondria odkryto przez przypadek i szczęście (by chance and luck), robiąc aluzję do

nazwiska Brittona Chance'a, jednego z filarów wiedzy o energetyce mitochondriów i Dawida Lucka, odkrywcy zdolności izolowanych mitochondriów do wbudowywania znakowanych promieniotwórczo aminokwasów do białek mitochondrialnych. Dziś wiemy, że — jak każda błona — błony mitochondrialne nie powstają *de novo*, ale rosną przez interkalację (wbudowywanie elementów do istniejącej matrycy). Wprowadzenie nowej cząsteczki białka integralnego wymaga uprzedniej obecności w błonie docelowej receptora dla tego białka, co jest świetną ilustracją zakłętego kręgu biogenezy struktur komórkowych na obecnym etapie ewolucji.

GENETYCZNE KONSEKWENCJE SYMBIOTYCZNEGO POCHODZENIA MITOCHONDRIÓW

Odkrycie mitochondrialnego a potem chloroplastowego, funkcjonalnego genomu wskrzesiło dawniejszą, później odrzuconą koncepcję dziedziczenia cytoplazmatycznego (tj. niejądrowego, pozachromosomalnego). Stanowiło zarazem silny argument popierający dotychczas raczej intuicyjny pogląd o symbiotycznym pochodzeniu mitochondriów z prebakterii (i chloroplastów z sinic). Wkrótce jednak stwierdzono, że zakres kompetencji genomów tych organelli, a zwłaszcza mitochondriów, jest bardzo ograniczony. W najbardziej zredukowanym ilościowo DNA mitochondriów ssaków informacja transla-

cyjnej wystarcza tylko na syntezę około 10 krótkich peptydów wobec przynajmniej kilkuset białek działających w tych organellach. Ogromna więc ilość białek musi być importowana do mitochondriów z cytoplazmy a odpowiednia informacja genetyczna zawarta w genomie jądrowym.

Logiką koncepcji bakteryjnego (symbiotycznego) pochodzenia mitochondriów jest więc dwutorowość procesu, który miał miejsce w ewolucyjnym powstaniu komórki eukariotycznej. Duża część genów kodujących białkowe (zarówno błonowe, jak i rozpuszczalne) elemen-

ty energetycznych funkcji prebakterii została przemieszczona do genomu jądrowego. Być może najpierw geny te zostały przekopiowane w jądrze, potem DNA przedłużyło się o sekwencje zdolne do kierowania białka do ewoluującej organelli i do ich importu, a dopiero potem mitochondrialne kopie tych genów mogły być usunięte bez utraty funkcji mitochondrium. Zarazem jednak w genomie jądrowym wytworzyła się *de novo* informacja o białkach pozwalających na metaboliczne i biogenetyczne komunikowanie się dawnej bakterii z cytoplazmą gospodarza nowej komórki eukariotycznej.

Przykładem takiej nowej funkcji metabolicznej jest zapewnienie wymiany ADP i ATP pomiędzy matriks mitochondrialną a cytoplazmą, procesu o kluczowym znaczeniu energetycznym dla komórki eukariotycznej. Pełniące tę funkcję białko, translokaza nukleotydów adenini-

nowych, nie występuje w błonie bakterii, gdzie jego obecność byłaby nielogiczna. Jest ono kodowane w DNA jądrowym i dopiero po imporcie ostatecznie wbudowywane w wewnętrzną błonę mitochondrialną. Szybko wykluczono doświadczalnie możliwość, aby mRNA dla takiego białka wnikało do matriks mitochondrialnej i ulegało translacji na rybosomach mitochondrialnych. Translacja odbywa się więc na rybosomach cytoplazmatycznych a odpowiednie białko musi całkowicie przejść przez błonę zewnętrzną zanim przyjmie ostateczną lokalizację w wewnętrznej błonie mitochondrialnej albo znajdzie się w przedziale międzybłonowym. Powyższy schemat dotyczy wszystkich białkowych przenośników dla metabolitów. Z kolei białka zlokalizowane ostatecznie w matriks (np. enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych) muszą przejść przez barierę obu błon mitochondrialnych.

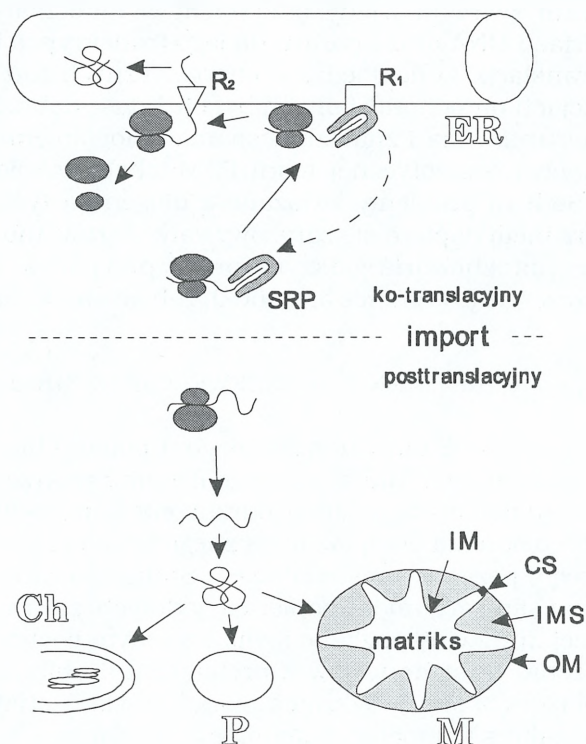
KIEROWANIE BIAŁEK Z RYBOSOMÓW DO PRZEDZIAŁÓW KOMÓRKOWYCH

Początkowo uważano, że białka importowane do mitochondriów powstają w procesie translacji przebiegającej na rybosomach przylegających do zewnętrznej błony mitochondrialnej, a więc import ich przebiega ko-translacyjnie, jak w przypadku białek kierowanych do retikulum endoplazmatycznego, na przykład białek sekrecyjnych. Wkrótce jednak przekonano się, że drogi kierowania białek, syntetyzowanych na rybosomach cytoplazmatycznych, do różnych przedziałów komórkowych są bardzo różnorodne (rys. 1). Obecnie przyjmuje się, że białka przeznaczone ostatecznie do mitochondriów ulegają całkowitej syntezie na wolnych rybosomach i pełnemu sfałdowaniu (konformacji) w cytoplazmie przed rozpoczęciem importu; ten ostatni jest więc procesem posttranslacyjnym.

Skuteczność kierowania białek z cytoplazmy do ich ostatecznej lokalizacji w poszczególnych przedziałach (dwóch faz wodnych i błon ograniczających te przedziały) wymaga obecności w tych białkach odpowiedniego sygnału (możliwie jednoznacznego), a zarazem obecności w błonach przyjmującego przedziału odpowiedniego białkowego receptora, rozpoznającego ten sygnał.

W przypadku importu do retikulum endoplazmatycznego włącza się jeszcze dodatkowo pośredni kompleks molekularny (białka + RNA), jakim jest w cytoplazmie SRP (signal recognition particle), a który rozpoznając sygnał ujawniający się przy końcu N syntetyzowanego białka przyprowadza cały rybosom wraz z osadzoną na nim mRNA do receptorów (R_1 , receptory

SRP) w błonie retikulum. Następnie ten sygnałowy fragment białka zostaje przekazany przez SRP do właściwego receptora błonowego (R_2 , receptor sekwencji sygnałowej), co dopiero umożliwia podjęcie dalszej translacji na rybosomach.



Rys. 1. Kierowanie nowo syntetyzowanych białek do poszczególnych przedziałów komórki eukariotycznej.

ER — retikulum endoplazmatyczne, CL — chloroplast, P — peroksyzom, M — mitochondrium, OM — błona zewnętrzna, IM — błona wewnętrzna, IMS — przestrzeń międzybłonowa, CS — miejsca kontaktowe.

mie i równoczesną translokację rosnącego białka poprzez białkowy kompleks w błonie retikulum, zwany translokonom. System ten nazwano ko-translacyjnym. Przy kierowaniu białek do mitochondriów etap SRP jest pominięty a translacja dokończona w cytoplazmie. Sygnał zawarty w białku jest rozpoznawany bezpośrednio przez receptory na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Jednak przed wprowadzeniem

białka do znajdującego się w tej błonie kompleksu białkowego zwanego TOM (translocase of the outer membrane), odpowiednika translokonu, białko musi ulegnąć rozfałdowaniu przez cytoplazmatyczne białko z klasy białek opiekuńczych (chaperony, Hsp 70). Ostatecznie więc przez błony mitochondrialne białko importowane przechodzi w postaci rozfałdowanej, podobnie jak w retikulum.

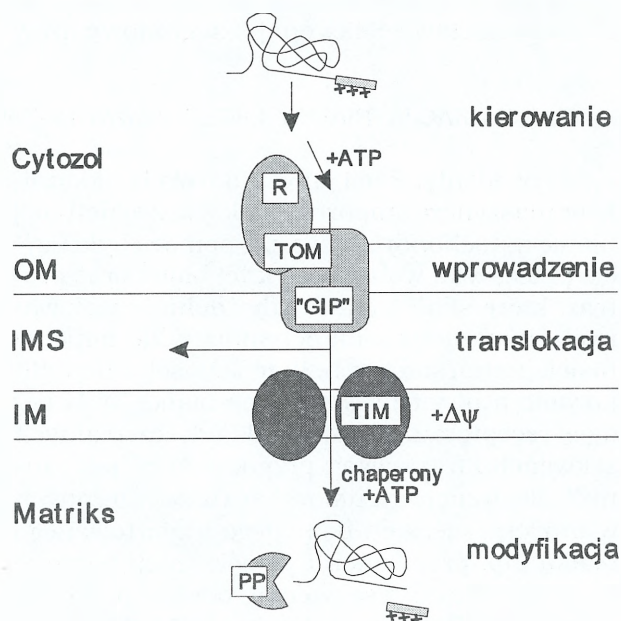
ETAPY IMPORTU BIAŁEK DO MITOCHONDRIÓW I SEKWENCJE SYGNAŁOWE

Zagadnienie mechanizmu importu białek do mitochondriów opisano ostatnio w licznych przeglądach (KIEBLER i współaut. 1993, PFANNER i współaut. 1994, SCHATZ i DOBBERSTEIN 1996, SHORE i współaut. 1995, STUARD i NEUPERT 1996, LILL i współaut. 1996), a nawet wszedł on już jako materiał klasyczny do najnowszych podręczników molekularnej biologii komórki (LODISH i współaut. 1995). Dlatego też w tym artykule poza zasadniczym zarysem mechanizmu procesu i jego molekularnej aparatury zostaną poruszone tylko wybrane zagadnienia. Szczegółowy artykuł przeglądowy z podaniem obszernej literatury przedmiotu ukaże się wkrótce w *Postęпах biologii komórki* (KMITA i MICHEJDA 1997).

Klasycznym materiałem w badaniu importu białek były i są nadal mitochondria drożdży i *Neurospora crassa*. Dopiero w ostatnich kilku latach badania rozciągnięto na mitochondria roślin (MOORE i współaut. 1994) i ssaków (IWAHASHI i współaut. 1994), w tym człowieka (GOPING i współaut. 1995), przy czym wyniki wskazują na konserwatywność aparatury importu. Znaczną komplikację stanowi używanie nazewnictwa komponentów aparatu importu odrębnego u drożdży (szkoła G. Schatza, np. MAS, ISP z cyfrą oznaczającą masę w kDa) i u *Neurospora* (szkoła W. Neuperta, np. MOM, MIM), podczas gdy białka te są najprawdopodobniej homologiczne. Dlatego też od 1996 roku postanowiono zastąpić je przez symbole TOM — dla całego kompleksu w błonie zewnętrznej i TIM — dla kompleksu w błonie wewnętrznej. Odpowiednie, poszczególne białka wchodzące w skład tych kompleksów opisuje się teraz jako na przykład Tim23.

Poszczególne etapy importu białka do mitochondrium przedstawiono w uproszczeniu na rysunku 2. W ostatnim 10-leciu zidentyfikowano wiele składników biorących udział w imporcie białek mitochondrialnych, co pozwoliło na sformułowanie orientacyjnego schematu molekularnego mechanizmu tego importu (KIEBLER i współaut. 1993).

Chaperony (powolnie działające ATPazy) cytoplazmatyczne, rozfałdowując białka prekursorowe sformowane na rybosomach, ułatwiają rozpoznanie sygnałowych sekwencji tych białek, kierujących je do mitochondriów przez receptory w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Receptory te wraz z innymi białkami tworzą translokazę zewnętrznej błony (TOM), która wspólnie z kompleksem translokazy błony wewnętrznej (TIM) przeprowadza transport białka prekursorowego w postaci wyprostowanego polipeptydu do matriks, przestrzeni międzybłonowej lub błony wewnętrznej. Wbudowanie białka do błony zewnętrznej i do przestrzeni międzybłonowej nie wymaga udziału TIM. Przejście przez błonę wewnętrzną ku matriks wymaga obecności potencjału transbłonowego, ujemnego w matriks. Od strony matriks mitochondrial-



Rys. 2. Schemat etapów importu białek do mitochondriów.

OM — błona zewnętrzna, IM — błona wewnętrzna, IMS — przestrzeń międzybłonowa, R — receptor, PP — proteaza procesorowa.

nej w translokacji białka i jego powtórny sfaladowaniu pomagają chaperony mitochondrialne, a sekwencje sygnałowe są po wejściu białka do matriks przeważnie odcinane przez bardzo specyficzne mitochondrialne peptydazy procesorowe. Do niedawna uważano, że przy wprowadzaniu białek do mitochondriów kompleksy TOM i TIM działają tylko łącznie, a to w tak zwanych miejscach kontaktowych, to jest miejscach, gdzie obie błony mitochondrialne ściśle do siebie przylegają, co jest widzialne w obrazach ultrastrukturalnych uzyskanych techniką mikroskopii elektronowej (VAN DER KLEI i współaut. 1994).

Obecnie wiele obserwacji wskazuje na to, że każdy z tych kompleksów może działać niezależnie, a wytworzenie wspólnego super-kompleksu (miejsc kontaktowych) jest procesem dynamicznym (HORST i współaut. 1995, SEGUI-REAL i współaut. 1993). Udowodniono bowiem, że do importu białka są zdolne zarówno izolowane w postaci pęcherzyków zewnętrzne błony mitochondrialne, zawierające tylko TOM, jak i pozbawione teje błony mitoplasty (tj. matriks zamknięta wewnętrzną błoną mitochondrialną) zawierające tylko TIM.

Sygnałem kierującym białka prekursorowe do mitochondriów jest zazwyczaj odcinek przy końcu N białka, zwany presekwencją (sekwencją targetową), tuż za którą często znajduje się również sygnał sortujący, decydujący o ostatecznej lokalizacji białka już po jego wejściu do mitochondriów. Sekwencje sygnałowe przy

końcu N są przeważnie odcinane przez peptydazy procesorowe w matriks.

Jakikolwiek byłby pierwotny ewolucyjnie charakter sekwencji sygnałowych, obecne presekwencje kierujące białko do mitochondriów przy całej swej różnorodności wykazują wspólny zestaw właściwości strukturalnych i fizycznych, a więc motyw strukturalny przy braku konserwatywnego układu sekwencji pierwotnej (brak motywu sekwencyjnego). Presekwencje te mogą działać przy imporcie niezależnie od rodzaju białka, do którego są przyłączone najczęściej od końca N. Daje to cenną doświadczalnie możliwość konstruowania białek chimerowych, w których tylko presekwencja decyduje o ich imporcie. Zazwyczaj presekwencje są hydrofilne, mają ładunek dodatni wynikający z licznych reszt naładowanych dodatnio przy braku reszt o ładunku ujemnym i są zdolne do tworzenia amfipatycznej struktury helikalnej. Ich translokacja do matriks wymaga obecności potencjału transbłonowego w błonie wewnętrznej. Mitochondriami mogły zostać tylko takie bakterie, które były zdolne do rozpoznawania sekwencji sygnałowych i do translokacji ich przez błonę. Stwierdzono niedawno (ROISE i MADUKE 1994), że bakteria glebowa *Paracoccus denitrificans*, uważana za bliską dawnych promitochondriów, może wiązać i importować syntetyczne presekwencje mitochondrialne w sposób zależny od potencjału transbłonowego; nie importuje natomiast zmutowanych presekwencji o obniżonej zdolności wprowadzania białka do mitochondriów.

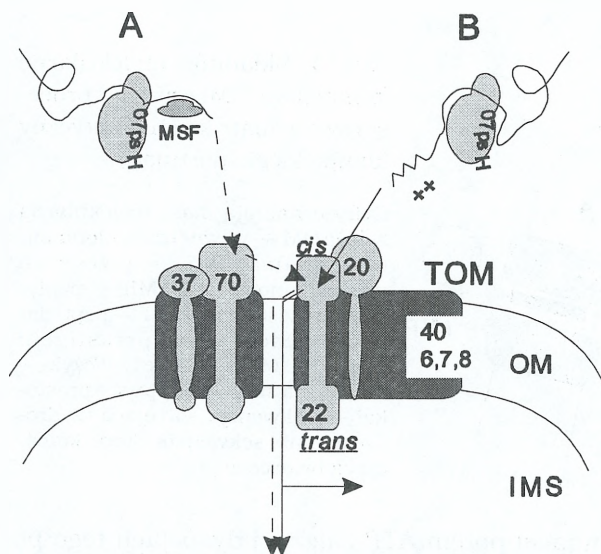
TRANSLOKACJA BIAŁKA PRZEZ ZEWNĘTRZNĄ BŁONĘ MITOCHONDRIALNĄ; KOMPLEKS TOM

Przy identyfikacji molekularnych składników maszynierii importu białka w zewnętrznej błonie mitochondrialnej dużą pomocą było użycie przeciwciał wobec białek tej błony oraz proteaz, które silnie ograniczały zdolność izolowanych, nietkniętych mitochondriów do importu białek prekursorowych. W ten sposób zidentyfikowano a później sklonowano białka TOM będące receptorami zarówno dla odszczepialnych sekwencji targetowych przy końcu N, jak i innych sekwencji sygnałowych rozmieszczonych w innych częściach dojrzałego importowanego białka (np. przy końcu C w sekwencji poryny). W przypadku presekwencji odszczepialnych, kompleks TOM tylko inicjuje proces przekazywania białka prekursorowego do kompleksu TIM w błonie wewnętrznej. Natomiast kompleks TOM jest w pełni samodzielny i kompetentny przy wbudowywaniu białek do błony zewnętrznej i przy imporcie kilku białek do przestrzeni

międzybłonowej, czemu nie towarzyszy odcinanie sekwencji sygnałowych.

Białka tworzące kompleks TOM (rys. 3) można podzielić na 2 grupy (LILL i NEUPERT 1996). Pierwsza grupa to białka o dużej (60%–80%) domenie cytozolowej, działające jako receptory przy wstępnym rozpoznaniu białek prekursorowych na powierzchni mitochondrium; są to Tom20 (a więc o masie 20 kDa), Tom70, Tom22 i Tom37. Drugą grupę stanowią białka o przeważającej domenie transbłonowej, które mogą tworzyć kanał (translokon): Tom6, Tom7, Tom8 i Tom40.

Centralnymi składnikami receptorowymi są Tom20 i Tom22. Brak któregośkolwiek z nich drastycznie obniża import. Tworzą one miejsce cis, które służy jako główny punkt wejścia białek prekursorowych (MAYER i współaut. 1995a, MAYER i współaut. 1995b) zarówno ma-



Rys. 3. Składniki molekularne kompleksu TOM i czynniki cytoplazmatyczne biorące udział w imporcie białek mitochondrialnych.

Cyfry oznaczają masę molekularną w kDa. A — prekursorzy translokazy nukleotydów adeninowych, przenośniki fosforanu i niewielu innych białek. B — liczne białka prekursorowe zawierające presekwencję, białka błony zewnętrznej i liaza hemu. IMS — przestrzeń międzybłonowa, OM — zewnętrzna błona mitochondrialna. Wężyk = presekwencja targetowa; pola zakreskowane — białka Tom o domenach głównie transbłonowych. Reszta objaśnień w tekście.

jących odszczepialną sekwencję targetową przy końcu N, jak i licznych białek bez tej sekwencji, a kierowanych do błony zewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej (NARGANG i współaut. 1995). Główną siłą rozpoznającą białko prekursorowe w miejscu *cis* są interakcje jonowe pomiędzy dodatnio naładowaną presekwencją a ujemnymi ładunkami na Tom20 i Tom22 (MAYER i współaut. 1995a).

Para Tom70 i Tom37 bierze udział w imporcie znacznie mniejszej ilości białek, w tym przenośników w błonie wewnętrznej i cytochromie c_1 (GRATZER i współaut. 1995), a więc białek przyprawdzanych przez wykryty niedawno (KOMIYA i współaut. 1994, MICHARA i OMURA 1996) cytoplazmatyczny czynnik MSF, jakby analog SRP. Zestaw Tom70 i Tom37 przekazuje rozpoznane białka i tak najpierw do grupy Tom20 i Tom22 nim wejdą one do kanału (poru), a jego funkcje mogą być przejęte przez tę drugą grupę.

Następnie importowane białko przechodzi do domniemanego kanału, nazywanego do niedawna GIP (general insertion protein). Kanał taki mogą tworzyć transmembranowe białka kompleksu TOM, zwłaszcza Tom40, przy czym Tom6 miałby stabilizować, a Tom7 destabilizować połączenie Tom40 z receptorami (HÖNLINGER i współaut. 1996). Jest kwestią otwartą, czy kanał taki jest identyczny z kanałem scharakteryzowanym elektrofizjologicznie przez VALLETTE i współautorów 1994 i nazwanym PSC (peptide sensitive channel).

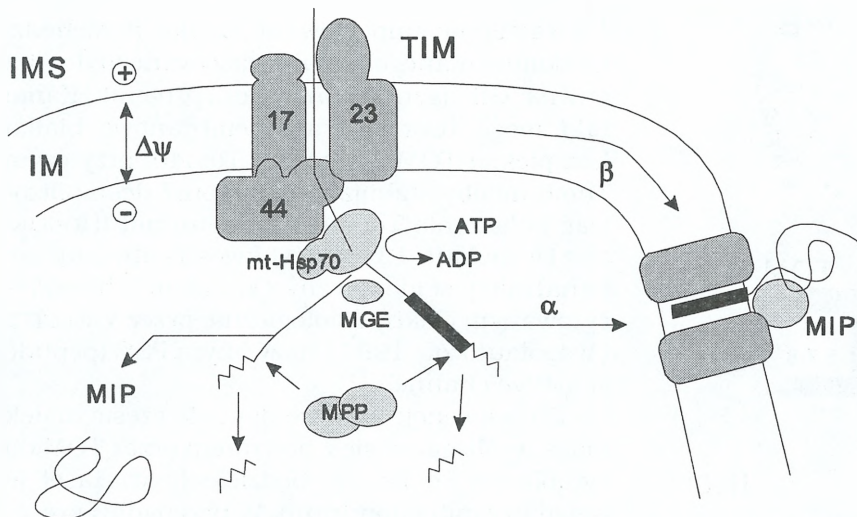
Presekwencje i dalsze dojrzałe części białek mogą wyslizgiwać się z powrotem przez TOM do cytoplazmy, o ile nie będzie siły wiążącej je wewnątrz mitochondrium. W przypadku presekwencji kierującej do matriks, siłą tą może być potencjał transbłonowy ($\Delta\psi$) na poziomie kompleksu TIM w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a później działanie ATP-zależnych chaperonów mitochondrialnych w matriks. Natomiast transport białek o innych presekwencjach jest energetycznie wsparty wyłącznie przez wiązanie tych ostatnich do miejsca *trans* kompleksu TOM od strony przestrzeni międzybłonowej (MAYER i współaut. 1995a, Mayer i współaut. 1995c). Miejscem *trans* jest prawdopodobnie hydrofilna domena przy końcu C białka Tom22 (BOLLIGER i współaut. 1995).

W nieznanym dotąd sposób zakotwiczenie presekwencji w miejscu *trans* doprowadza do całkowitego rozfałdowania najbliższych za presekwencją odcinków dojrzałego białka, umożliwiając im wejście do kanału TOM i przekazanie wyprostowanej formy peptydu do kompleksu TIM lub zlokalizowanie białka w przestrzeni międzybłonowej. Siły działające w miejscu *trans* przesuwają więc równowagę odwracalnego w zasadzie przechodzenia białka prekursorowego przez kompleks TOM, a to w kierunku wejścia do mitochondrium. Stąd też białko o presekwencji kierującej do matriks, nie mogące wejść do kompleksu TIM w wyniku braku $\Delta\psi$, zostaje i tak wprowadzone w całości do przestrzeni międzybłonowej i dopiero po doświadczałym wytworzeniu $\Delta\psi$ będzie kontynuować translokację ku matriks poprzez kanał kompleksu TIM.

TRANSLOKACJA BIAŁKA PRZEZ WEWNĘTRZNĄ BŁONĘ MITOCHONDRIALNĄ; KOMPLEKS TIM

Kompleks TIM w wewnętrznej błonie mitochondrialnej odbiera kierującą do matriks sygnałową sekwencję białka prekursorowego ze strony *trans* kompleksu TOM błony zewnętrznej. Ta sekwencja sygnałowa przechodzi następnie przez błonę wewnętrzną, przypuszczalnie

przez kanał przewodzący białko, a wchodzący w skład kompleksu TIM (rys. 4). Następnie zachodzi translokacja całego białka prekursorowego, napędzana od strony matriks działaniem chaperonu mt-Hsp70, współpracującego z Tim44, który jest białkiem związanym peryferycznie z



Rys. 4. Składniki molekularne kompleksu TIM, czynniki procesorowe w matriks i hipotetyczny kompleks eksportujący.

Cyfry oznaczają masę molekularną w kDa. IM — wewnętrzna błona mitochondrialna, IMS — przestrzeń międzybłonowa, MPP, MIP — peptydazy procesorowe; MIP1 — peptydaza procesorowa w przestrzeni błonowej, MGE — Mge1. Wężyk — sekwencja targetowa, pusty prostokąt — sekwencja sortująca (w drodze α) lub sekwencja stop, kotwicząca (w drodze β).

domniemanym kanałem (VON AHSEN i współaut. 1995). Kompleksy TOM i TIM działają w sposób skoordynowany, dopiero gdy są połączone przestrzennie przez ulegające translokacji białko prekursorowe. Nie można jednak wykluczyć, że oba kompleksy oddziałują też pomiędzy sobą bezpośrednio, tworząc swego rodzaju bazę strukturalną dla dynamicznego powstawania miejsc kontaktowych.

Uważa się (BERTHOLD i współaut. 1995), że w kompleksie TIM białka Tim23 i Tim17 stanowią rdzeń kanału translokacyjnego a współpracować z nim mogą także inne białka, TIM14 i TIM33. Tim23 i Tim17 są białkami integralnymi o wspólnym podobieństwie sekwencji w ich domenie transbłonowej. Dodatkowo Tim23 ma rozległą domenę hydrofilną eksponowaną po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Po wewnętrznej stronie tej błony z kompleksem TIM jest związane peryferyczne białko Tim44, które sprzęga funkcję kanału ze źródłem energii, jakim jest mt Hsp70 (RASSOW i współaut. 1994). Oba te ostatnie białka działają jak kontrolowany przez ATP molekularny mechanizm zapadkowy wychytujący kolejne segmenty importowanego białka w miarę wyłaniania się ich z kanału (SCHNEIDER i współaut. 1994, VOOS i współaut. 1996).

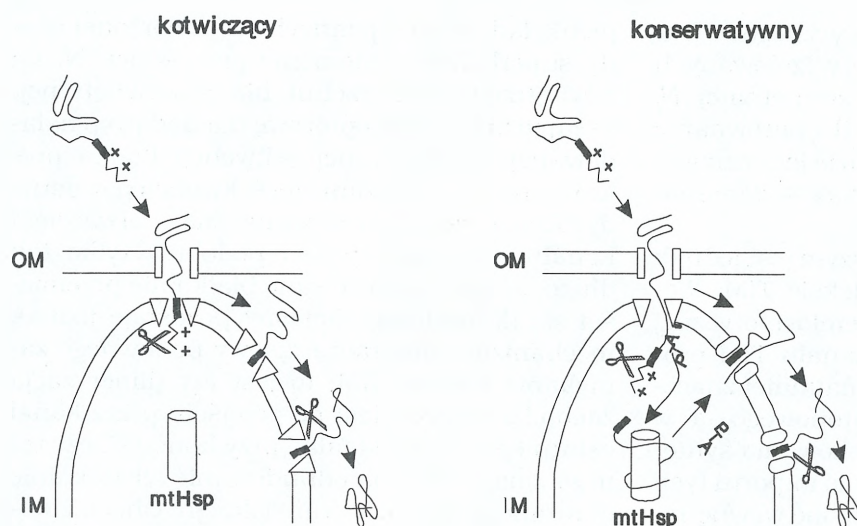
Tylko wczesny etap, to jest przejście presekwencji i najbliższego za nią odcinka dojrzałego białka wymaga potencjału transbłonowego, $\Delta\Psi$, podczas gdy translokacja dalszej części polipeptydu przebiega już bez udziału potencjału (UNGERMANN i współaut. 1996). Działanie $\Delta\Psi$ zapobiega zwrotnemu wyslizgnięciu się łańcucha polipeptydowego przemieszczanego w kanałach obu kompleksów aż do momentu, gdy funkcję tę przejmie w matriks mitochondrialny chaperon mtHsp70. Od tej chwili proces translokacji białka do matriksu jest już nieodwracalny. Powtarzające się cykle wiązania się Hsp70 z kompleksem Tim44 — importowane białko i nastę-

pującej potem ATP-zależnej dysocjacji tego potrójnego kompleksu prowadzi do pełnego przeprowadzenia translokacji. Istotny etap tego procesu, a mianowicie wymiana ADP związanego z Hsp70 na ATP, jest prowadzony przez dalsze niezbędne białko matriksowe, Mge1, będące eukariotycznym homologiem bakteryjnego białka Grp E.

Wprowadzone do matriks białko prekursorowe, nadal związane z mtHsp70, podlega działaniu specyficznej peptydazy procesorowej MPP o podjednostkach α i β , tworzących heterodimer. Peptydaza ta odcina sekwencję targetową albo odsłaniając w niektórych białkach drugą z kolei sekwencję sortującą, albo pozostawiając już samo białko dojrzałe. Białko dojrzałe zostaje najczęściej przekazane do dwóch chaperonów pomocniczych mtHsp60 i Cpn10 (również homologicznych do chaperonów bakteryjnych), które przy udziale innych czynników pomagają w ostatecznym sfałdowaniu wprowadzonego białka i jego wbudowaniu w większe kompleksy.

Natomiast białka, w których peptydazy procesorowe MPP odsłoniły kolejną sekwencję sortującą, mogą być kierowane do hipotetycznego kompleksu eksportującego w błonie wewnętrznej. Byłby to jeden ze sposobów wbudowania białek do wewnętrznej błony mitochondrialnej, a także do wtórnego wprowadzenia ich do przestrzeni międzybłonowej (GÄRTNER i współaut. 1995). W tym ostatnim przypadku sekwencja sortująca byłaby odcinana przez peptydazę IMP1, przylegającą do błony wewnętrznej od strony przestrzeni międzybłonowej.

Taki model wbudowywania określa się jako mechanizm konserwatywny (rys. 5). Zakłada on, że dla pewnych białek sortowanie do błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej następuje dopiero po wejściu białka prekursorowego do matriksu, skąd ulega ono re-eksportowi, zależnemu od siły protonomotorycznej, analogicznemu do mechanizmu działającego u bakte-



Rys. 5. Dwa modele kierowania białek do błony wewnętrznej (IM) i przestrzeni międzybłonowej.

A — konserwatywny, B — kotwiczący (stop transfer). Węzyk — sekwencja targetowa, pełny prostokąt — sekwencja z dalszą informacją: sortująca — w (A) lub kotwicząca od razu w błonie („stop”) w (B).

rii gram-ujemnych i stanowiącemu pozostałość ewolucyjną. Przekonywujących dowodów na działanie takiej drogi dostarcza, na przykład, import integralnych białek błony wewnętrznej: podjednostki 9 F₀ATPazy (ROJO i współaut. 1995) i podjednostki II oksydazy cytochromowej, które są zakodowane w zależności od gatunku albo w genomie jądrowym albo mitochondrialnym.

Drugi model sortowania białek prekursorowych do błony wewnętrznej zwany bezpośrednim lub zakotwiczenia (stop-transfer) zakłada

ominiecie etapu wniskania takich białek do matryksu, a to dzięki obecności na importowanym polipeptydzie sygnału „stop” (zamiast sekwencji sortującej), zakotwiczącego białko od razu w błonie na etapie kompleksu TIM. Ten model wydaje się bardziej prawdopodobny dla importu cytochromu c₁, natomiast import cytochromu b₂ ostatecznie zlokalizowanego w przestrzeni międzybłonowej może przebiegać obiema drogami w zależności od warunków doświadczalnych (GRUHLER i współaut. 1995).

KANAŁOWA FUNKCJA KOMPLEKSÓW TOM I TIM

W latach obecnych, gdy „mitochondriolodzy” są zafascynowani wykryciem w mitochondrialnych błonach kanałów, uderzającym jest ubóstwo wiedzy o kanałach czynnych w imporcie białek. Być może elektrofizjologiczna charakterystyka pewnych z kilku wykrytych kanałów mitochondrialnych (SORGATO i MORAN 1993), uzyskana głównie metodą patch clamp i tip dip jest właśnie objawem działalności TOM oraz TIM.

Wydaje się oczywiste, że importowane białko przechodzi przez błonę w hydrofilnym porze (kanale) w obrębie zarówno kompleksu TOM, jak i TIM. Niestety prawie nic nie wiadomo jeszcze o strukturze takich kanałów, ich wyścieleniu resztami aminokwasów, wymiarze, selektywności (dyskryminacji) oraz stanach zamknięcia i otwarcia. W zewnętrznej błonie dobrze scharakteryzowana jest elektrofizjologicznie przewodność kanału VDAC (voltage dependent anion channel = poryna) o selektywności anionowej, umożliwiającego wymianę z cytoplazmą metabolitów o masie do 2 kDa. VDAC jednak nie wchodzi w skład TOM.

W zewnętrznej błonie mitochondrialnej opisano właściwości elektrofizjologiczne również innego kanału (zwanego PSC — peptide sensi-

tive channel) o dużym przewodnictwie i selektywności kationowej, blokowany przez zasadowe peptydy, w tym przez mitochondrialne sekwencje sygnałowe (VALLETTE i współaut. 1994). Możliwość, aby sygnały elektryczne tego kanału pochodziły z poryny wykluczono, stwierdzając je (FEVRE i współaut. 1990) również w mitochondriach mutantów drożdży całkowicie pozbawionych — drogą delecji — kanału VDAC (MICHEJDA i współaut. 1989). Obecność peptydów sygnałowych zarówno w mutantach, jak i szczepie dzikim powoduje, obok blokady elektrycznej kanałów PSC, również rozprężenie mitochondriów, wskazując na współdziałanie PSC z kanałem w wewnętrznej błonie, a więc z TIM (STOBIENIA i współaut. 1994, HUGOSSON i współaut. 1994).

Ponieważ pomimo braku w mutantach kanału VDAC w ich mitochondriach nadal, choć z ograniczeniami, metabolity (np. ADP, NADH) docierają z zewnątrz do przestrzeni międzybłonowej (MICHEJDA i współaut. 1990), uznano kanał PSC (a więc tym samym prawdopodobnie TOM) za awaryjny kanał dla metabolitów (MICHEJDA i współaut. 1994). Kanał kompleksu TOM byłby więc nieszczelny i mało selektywny, prawdopodobnie w typie kanału translokonu w

blonie retikulum. Próby elektrycznego scharakteryzowania kompleksu TOM w izolowanych czystych pęcherzykach błony zewnętrznej *N. crassa* (MAYER i współaut. 1994) i porównanie go z kanałem PSC nie dały na razie jednoznacznych wyników (R. LILL, J. P. HENRY — doniesienie ustne).

Problemem o wiele istotniejszym jest jednak selektywność kanału w kompleksie TIM. Według głównego kanonu teorii chemiosmotycznej nieselektywne otwieranie się kanału TIM prowadziłoby do zniesienia, a przynajmniej znacznego obniżenia gradientu protonowego, a w konsekwencji nie tylko do zablokowania syntezy ATP, ale również do utrudnienia importu tych białek, których przejście przez błonę wewnętrzną jest uzależnione od istnienia potencjału transbłonowego. Kanał w kompleksie TIM powinien więc otwierać się tylko w momencie przechodzenia wprowadzonego białka prekursorowego i na tyle ciasno osłaniać peptyd, aby protony nie wykorzystały swego stromego gradientu dla wejścia do matriks.

Całkowitą zależność translokacji białek przez kompleks TIM w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od $\Delta\Psi$ stwierdzono już wiele lat temu (SCHLEYER i NEUPERT, 1985), ale mechanizm działania $\Delta\Psi$ jest jak dotąd zupełnie nie znany. W tym roku przedstawiono jednak interesującą hipotezę (BAUER i współaut. 1996), opartą na nowych danych doświadczalnych. Według niej pewna część domeny przy końcu N białka Tim23, obejmująca ~ 30 aminokwasów, czynna jest przy dimeryzacji Tim23, wymagającej obecności potencjału $\Delta\Psi$. Proponuje się, że istotnym dla $\Delta\Psi$ -zależnej dimeryzacji jest tu segment zawierający powtarzający się motyw siedmiu ząbających się leucyn (leucine-zipper motif). Motyw ten działa jako złącze także przy dimeryzacji podjednostek innych białek, na przykład receptora tyroksyny i represora lac. Dopiero dimerowa postać Tim23 staje się receptorem dla sekwencji sygnałowej kierującej do matriks i wiąże ją na powierzchni błony wewnętrznej. Interakcja dimeru Tim23 z sekwencją sygnałową powoduje dysocjację dimeru i otwarcie kanału TIM, co inicjuje elektroforetyczne przejście tej sekwencji. Reszta białka przechodzi przez kanał już bez udziału $\Delta\Psi$, wciągana akcją chaperonu mtHsp70 i ko-chaperonu Mge1, przyłączonych do TIM od strony matriks poprzez białko Tim44. Energii do translokacji białka dostarcza na tym etapie matriksowy ATP.

Tak więc kompleks TIM jawi się jako kanał $\Delta\Psi$ -zależny, którego czujnikiem $\Delta\Psi$ są 7-mio leucynowe motywy w hydrofilnych domenach dynamicznego dimeru białek Tim23. Zachodząca w obecności $\Delta\Psi$ dimeryzacja eksponuje sku-

pienie ładunków ujemnych na utworzonej wtedy superhelisie w domenie przy końcu N, na zewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej, kreując miejsce receptorowe dla dodatnio naładowanej amfipatycznej sekwencji białka prekursorowego. Związanie tej sekwencji powoduje dysocjację dimeru równoznaczną z otwarciem kanału, otwartego prawdopodobnie tylko tak długo, aż całe importowane białko nie przemieści się do matriks. Niejasny pozostaje jednak mechanizm i program czasowy ponownego zamykania kanału TIM, to jest czy dimeryzacja zachodzi natychmiast po przejściu przez kanał ostatniego odcinka białka przy końcu C, czy też musi ona czekać na odbudowanie $\Delta\Psi$, lokalnie obniżanego w czasie translokacji? Chociaż kanał w czasie otwarcia może zezwolić na translokację białka o różnej długości, co wynika z użycia białek chimerowych, to możliwe jest jednak wymaganie pewnego minimalnego czasu potrzebnego do ponownej dimeryzacji (a więc zamknięcia kanału). Intrygującym jest, że import samych krótkich sekwencji kierujących do matriks prowadzi do rozprzężenia mitochondriów (STOBIENIA i współaut. 1994, HUGOSSON i współaut. 1994, LOHRET i KINNALLY 1995), tak jakby kanał pozostał otwarty, umożliwiając wpływ protonów do matriks. Obecnie badamy, we współpracy z grupą prof. W. Neuperta, jaki wpływ na szczelność błony mitochondrialnej dla protonów mają mutacyjne zmiany sekwencji hydrofilnej domeny białka Tim23.

Opisane wyżej działanie TIM sprawdza się nie tylko w całych mitochondriach ale i izolowanych z nich mitoplastach pozbawionych błony zewnętrznej. Wskazuje to na potencjalną niezależność kompleksu TIM od TOM. Hipotezę o mechanizmie działania TIM oparto na wynikach doświadczeń nad importem białek do matriks. Dalszą komplikację, dotąd nie wyjaśnioną, stanowi import białek błony wewnętrznej, które w myśl koncepcji stop-transfer zatrzymują się w pewnym etapie translokacji w błonie. Muszą one opuścić kanał TIM nie przez całkowite, pionowe przejście kanału, ale przez boczne przemieszczenie białka z kanału do sąsiednich obszarów błony w sytuacji, gdzie hydrofilna domena topologicznie zewnętrzna względem błony wewnętrznej wcale kanałem TIM nie przechodzi. Podobny problem, też jeszcze nie wyjaśniony, dotyczy translokacji białek błonowych retikulum endoplazmatycznego. Jednak w przypadku TIM jest on szczególnie intrygujący z uwagi na możliwość utraty przez mitochondrium kontroli nad szczelnością błony dla protonów. Tak więc dylemat: jak importować białka do matriks i błony wewnętrznej, nie doprowadzając do zniesienia gradientu protonowego

przez tą ostatnią, nadal będzie dłuższy czas w centrum uwagi.

Interesującym ewolucyjnie jest stwierdzenie unikalnego dla mitochondriów roślinnych zintegrowania aktywności mitochondrialnej proteazy procesorowej (MPP) z III kompleksem łańcucha oddechowego (bc_1) i dużej homologii sekwencji rdzennych podjednostek tego kompleksu z sekwencją obu podjednostek MPP, α i β , które w mitochondriach nieroślinnych są zlokalizowane w matriks. Jest to jedyny dotąd przykład białek zaangażowanych równocześnie w bioenergetyce i biogenezie mitochondriów, być może reprezentujący nową rodzinę białek mitochondrialnych (GLASER i współaut. 1996, BRAUN i współaut. 1995).

Szybki i spektakularny postęp wiedzy o imporcie białek do mitochondriów był możliwy początkowo dzięki równoczesności podejścia genetycznego (drożdże) i biochemicznego (*Neurospora*), a ostatnio także wykorzystaniu w pełni inżynierii genetycznej. Przed nami — identyfikacja dalszych komponentów maszynierii importu, rekonstrukcja przynajmniej poszczególnych etapów translokacji (HACHIYA i współaut. 1995), porównanie procesów zachodzących *in vitro* z przebiegającymi *in vivo* (w komórce) i wreszcie poznanie mechanizmu składania białek zarówno importowanych, jak i kodowanych przez mitochondrialny DNA w funkcjonalne kompleksy oddechowe i syntazę ATP.

IMPORT OF PROTEINS INTO MITOCHONDRIA

Summary

The genetic consequences of symbiotic origin of mitochondria for the biogenesis of this organelle are discussed. A general scheme of events leading to translocation to mitochondria of proteins encoded by the nuclear genes is presented. Molecular composition of the membranous complexes which translocate precursor proteins in the outer and inner mitochondrial membranes (TOM and TIM, respectively) is described according to the most recent knowledge. Special attention is paid to the problem of channel activity of the translocating machinery in both membranes. The necessity of preservation of tightness of the inner

mitochondrial membrane for protons during translocation of proteins through the TIM complex is emphasized. The latest hypothesis (BAUER *et al.* 1966) of a hydrophilic domain of Tim23 protein being a voltage sensor in the TIM complex is presented. Possible identity of the PSC channel with the translocon in TOM and the apparent lack of its translocation specificity found in porin-less mutants is discussed.

The article is dedicated to Prof. Lech Wojtczak, world recognized authority in bioenergetics to celebrate his 70-th birthday.

LITERATURA

- VON AHSEN O., VOOS W., HENNINGER H., PFANNER N., 1995. The mitochondrial protein import machinery. Role of ATP in dissociation of the Hsp70-Mim44 complex. *J. Biol. Chem.* 270, 29848–29853.
- BAUER M. F., SIRRENBERG CH., NEUPERT W., BRUNNER M., 1996. Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* 86, 1–9.
- BERTHOLD J., BAUER M. F., SCHNEIDER H., 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, 1085–1093.
- BOLLIGER L., JUNNE T., SCHATZ G., LITZGOW T., 1995. Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO J.* 14, 6318–6326.
- BRAUN H. -P., EMMERMAN M., KRUFIT V., BÖDICKER M., SCHMITZ U. K., 1995. The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc_1 complex of the respiratory. *Planta* 195, 396–402.
- DANPURE CH. J., 1995. How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends Cell Biol.* 5, 230–238.
- FEVRE F., CHICH J. -F., LAUQUIN G. J. -M., HENRY J. P., THIEFFRY M., 1990. Comparison of mitochondrial cationic channels in wild-type and porin-deficient mutant yeast. *FEBS Lett.* 262, 201–204.
- FÖLSCH H., GUIARD B., NEUPERT W., STUART R. A., 1996. Internal targeting signal of the BCS1 protein: A novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J.* 15, 479–487.
- GÄRTNER F., BÖMER U., GUIARD B., PFANNER N., 1995. The sorting signal of cytochrome b_2 promotes early divergence from the general mitochondrial import pathway and restricts the unfoldase activity of matrix Hsp70. *EMBO J.* 14, 6043–6057.
- GLASER E., SJÖLING S., SZIGYARTO C., ERIKSSON A. C., 1996. Plant mitochondrial protein import: Precursor processing is catalysed by the integrated mitochondrial processing peptidase (MPP)/ bc_1 complex and degradation by the ATP-dependent proteinase. *BBA* 1275, 33–37.
- GOPING I. S., MILLAR D. G., SHORE G. C., 1995. Identification of the human mitochondrial protein import receptor, huMas20p. Complementation of mas 20 in yeast. *FEBS Lett.* 373, 45–50.
- GRATZER S., LITZGOW T., BAUER E., LAMPING E., PALTAUF F., 1995. Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* 129, 25–34.
- GRUHLER A., ONO H., GUIARD B., NEUPERT W., STUART R. A., 1995. A novel intermediate on the import pathway of cytochrome b_2 into mitochondria: Evidence for conservative sorting. *EMBO J.* 14, 1349–1359.
- HACHIYA N., KOMIYA T., ALAM R., IWAHASI J., SAKAGUCHI M., OMURA T., MICHARA K., 1994. MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.* 13, 5146–5154.
- HACHIYA N., MICHARA K., SUDA K., HORST M., SCHATZ G., LITZGOW T., 1995. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* 376, 705–709.
- HÖNLINGER A., BÖMER U., ALCONADA A., ECKERSKORN C., LOTTSPEICH F., DIETMEIER K., PFANNER N., 1996. Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane

- translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J.* 15, 2125–2137.
- HORST M., HILFIKER-ROTHENFLUH S., OPLIGER W., SCHATZ G., 1995. Dynamic interaction of the protein translocation systems in the inner and outer membranes of yeast mitochondria. *EMBO J.* 14, 2293–2297.
- HUGOSSON M., ANDREU D., IWAHASHI H. G., GLASER E., 1994. Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and protein import. *Eur. J. Biochem.* 223, 1027–1033.
- IWAHASHI T., TAKAICHI S., MICHARA K., OMURA T., 1994. Reconstitution of import-competent outer membrane vesicles from mammalian mitochondria. *J. Biochem.* 116, 156–163.
- KIEBLER M., BECKER K., PFANNER N., NEUPERT W., 1993. Mitochondrial protein import: specific recognition and membrane translocation of preproteins. *J. Membr. Biol.* 135, 191–207.
- VAN DER KLEI I. J., VEENHUIS M., NEUPERT W., 1994. A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microscopy Res. Technique* 27, 284–293.
- KMITA H., MICHEJDA J., 1997. Molekularna organizacja aparatu transportu białka w mitochondriach. *Post. Biol. Kom. w druku.*
- KOMIYA T., HACHIYA N., SAKAGUCHI M., OMURA M., MICHARA K., 1994. Recognition of mitochondria-targeting signals by a cytosolic import stimulation factor, MSF. *J. Biol. Chem.* 269, 30893–30897.
- LILL R., NARGANG F. E., NEUPERT W., 1996. Biogenesis of mitochondrial proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 505–512.
- LILL R., NEUPERT W., 1996. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* 6, 56–61.
- LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY S. L., MATSUDAIRA P., DARNELL J., 1995. *Molecular Cell Biology*. Third edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- LOHRET T. A., KINNALLY K. W., 1995. Targeting peptides transiently block a mitochondria channel. *J. Biol. Chem.* 270, 15950–15953.
- MAYER A., DRIESSEN A., NEUPERT W., LILL R., 1994. Inclusion of proteins into isolated mitochondria outer membrane vesicles. [W:] *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, J. E. CELIS (red.), Academic Press, 545–549.
- MAYER A., NARGANG F. E., NEUPERT W., LILL R., 1995a. Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell* 80, 127–137.
- MAYER A., NARGANG F. E., NEUPERT W., LILL R., 1995b. MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J.* 14, 4204–4211.
- MICHARA K., OMURA T., 1996. Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: role of MSF and Hsp70. *Trends Cell Biol.* 6, 104–108.
- MICHEJDA J., GUO X. J., LAUQUIN G. J. -M., 1989. Bioenergetic consequences of the lack of mitochondrial porin: Identification of a putative new pore. [W:] *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes*, Azzi A. et al. (red.), Springer-Verlag, 225–235.
- MICHEJDA J., GUO X. J., LAUQUIN G. J. -M., 1990. The respiration of cells and mitochondria of porin deficient yeast mutants is coupled. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 354–361.
- MICHEJDA J., KMITA H., STOBIEŃ O., BUDZIŃSKA M., LAUQUIN G. J. -M., 1994. Restriction of metabolite permeation through the outer mitochondrial membrane of porin-deficient yeast mutant. *Molecular Biology of Mitochondrial Transport Systems*. NATO Series, H83, Springer-Verlag, 341–356.
- MICHEJDA J. W., PIETRZYKOWSKI A., 1969. Biogenesis of mitochondria: A review. [W:] *Biochemistry of Intracellular Structures*, WOJTCZAK L., DRABIKOWSKI W., STRZELECKA-GOLASZEWSKA H. (red.), PWN Warszawa, 89–112.
- MOORE A. L., WOOD C. K., WATTS F. Z., 1994. Protein import into plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 545–575.
- NARGANG F. E., KÜNKELE K., MAYER A., RITZEL R. G., NEUPERT W., LILL R., 1995. Sheltered disruption of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *EMBO J.* 14, 1099–1108.
- PFANNER N., CRAIG E. A., MEIJER M., 1994. The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem. Sci.* 19, 368–372.
- ROISE D., MADUKE M., 1994. Import of a mitochondrial presequence into *P. denitrificans*. Insight into the evolution of protein transport. *FEBS Lett.* 337, 9–13.
- RASSOW J., MAARSE A. C., KRÄINER 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. *J. Cell Biol.* 127, 1547–1556.
- ROJO E. E., STUART R., NEUPERT W., 1995. Conservative sorting of Fo-ATPase subunit 9: Export from matrix requires pH across inner membrane and matrix ATP. *EMBO J.* 14, 3445–3451.
- SCHATZ G., DOBBERSTEIN B., 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519–1526.
- SCHLEYER M., NEUPERT W., 1985. Transport of proteins into mitochondria. Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* 43, 339–350.
- 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, 768–774.
- SEGUI-REAL B., KISPAL G., LILL R., NEUPERT W., 1993. Functional independence of the protein translocation machineries in mitochondrial outer and inner membranes: passage of preprotein through the intermembrane space. *EMBO J.* 12, 2211–2218.
- SHORE G. C., MCBRIDE H. M., MILLAR D. G., STEENAART N