

Proteintransport in Mitochondrien: TOM- und TIM-Komplexe

Peter Rehling und Chris Meisinger

► Eine zentrale biologische Frage ist, wie Proteine, die im Cytosol synthetisiert werden, ihren Zielort in der Zelle erreichen. Mitochondrien importieren den Hauptteil ihrer Proteine und müssen diese im Organell selbst sortieren. TOM- und TIM-Multiprotein-Komplexe in der äußeren und inneren Membran sowie dem Intermembranraum vermitteln diese Prozesse.

Mitochondriale Importsignale

Mitochondrien erfüllen zahlreiche, für die Zelle wichtige, metabolische Funktionen. Heute geht man davon aus, dass Mitochondrien ca. 1000 verschiedene Proteine enthalten, die an diesen Prozessen direkt oder indirekt beteiligt sind. Das mitochondriale Genom kodiert allerdings nur für wenige Proteine, so dass fast alle mitochondrialen Proteine im Zellkern kodiert werden. Nach ihrer Synthese an cytosolischen Ribosomen werden mitochondriale Proteine posttranslational in Mitochondrien importiert und in eines der mitochondrialen Subkompartimente (äußere Membran, Intermembranraum, innere Membran oder Matrix) sortiert.^[1-4] Der Transport der mitochondrialen Proteine wird durch Signale im neu synthetisierten Protein (Vorstufenprotein) vermittelt. Prinzipiell kann hinsichtlich der verwendeten Signale zwischen zwei Arten von Vorstufenproteinen unterschieden werden. Die erste Gruppe mitochondrialer Proteine nutzt N-terminale Signale (Präsequenzen). Bei diesen handelt es sich um 20–60 Aminosäure lange helikale Segmente, die auf einer Seite positiv geladene und auf der anderen Seite vorwiegend hydrophobe Aminosäuren enthalten. Die meisten Präsequenz-Proteine werden in die Matrix der Mitochondrien dirigiert, andere gelangen in die Innenmembran oder den Intermembranraum. In der Regel werden die Präsequenzen in der mitochondrialen Matrix proteolytisch abgespalten. Die zweite Gruppe von Proteinen nutzt interne Signale, die über die Gesamtlänge des Vorstufenproteins verteilt sind. Bei Proteinen dieser Gruppe handelt es sich um Membranproteine, die nach ihrem Import die mitochondriale Innenmembran mehrmals durchspannen, wie z.B. die Metabolit-Transporter der Innenmembran. Da Proteine mit internen Signalsequenzen reich an hydrophoben Segmenten sind, ist ihr Transport durch eine wässrige

Umgebung, wie das Cytosol oder den Intermembranraum problematisch. Cytosolische Faltungshelfer-Proteine (Chaperone), insbesondere Hitzeschock-Proteine der Hsp70- und Hsp90-Klasse, binden die hydrophoben Bereiche und schützen dadurch das Vorstufenprotein vor Aggregation.

TOM-Komplex: Proteintranslokation über die mitochondriale Außenmembran

Interne Signale und Präsequenzen werden von verschiedenen Rezeptor-Proteinen auf der cytosolischen Seite der mitochondrialen Außenmembran erkannt. Die Rezeptoren sind Bestandteil eines Multiprotein-Komplexes von ca. 400 kDa, der als TOM-Komplex (Translocase of the Outer Membrane) bezeichnet wird (Abb. 1). Das Rezeptorprotein Tom70 erkennt interne Signale und bindet zusätzlich auch die Chaperone, die mit dem Vorstufenprotein assoziiert sind^[5]. Tom20 ist der Rezeptor für Präsequenz-tragende Vorstufenproteine. Strukturelle Ana-

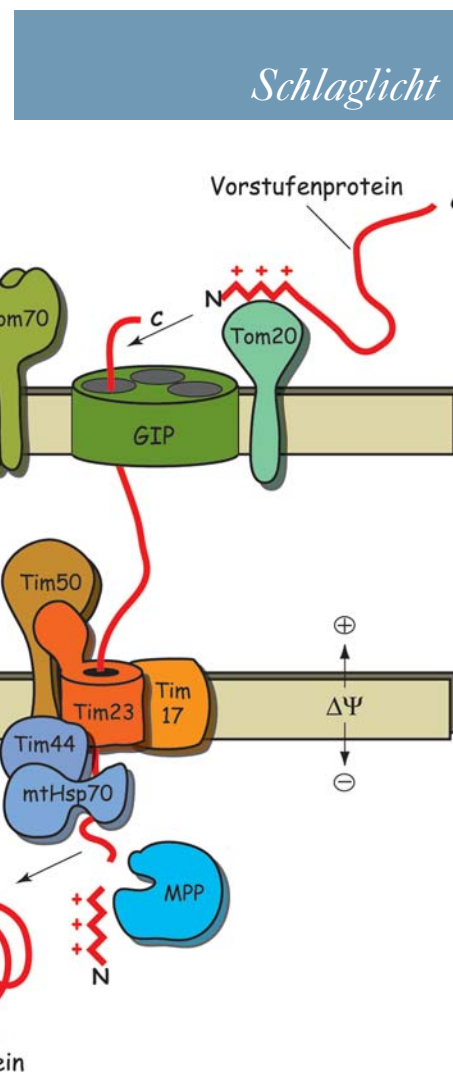


Abb. 1: Import eines Matrixproteins: Nach Erkennen und Binden der N-terminalen Signalsequenz des Vorstufenproteins an Tom20 erfolgt eine lineare Translokation über die Außenmembran (AM) durch den Tom40-Kanal der GIP (Generelle Import Pore). Angetrieben durch das Membranpotential $\Delta\Psi$ über der Innenmembran (IM) inseriert die Signalsequenz in den Tim23-Kanal und wird mit Hilfe des ATP-getriebenen Importmotors (mtHsp70, Tim44) einwärts gezogen. In der Matrix wird die Signalsequenz von einer spezifischen Protease (MPP) entfernt. IMR, Intermembranraum.

lysen haben gezeigt, dass Tom20 die hydrophobe Seite der helikalen Präsequenz erkennt. Nach der Erkennung erfolgt die Translokation beider Klassen von Vorstufenproteinen über die äußere Membran. Dieser Transportschritt wird vom Kern des TOM-Komplexes geleistet, der als Generelle Import Pore oder GIP bezeichnet wird. Tom40 bildet die zentrale Untereinheit der GIP. Das essentielle Membranprotein Tom40 formt eine Pore in der Außenmembran, durch die beide Klassen von Vorstufenproteinen transloziert werden^[6,7]. Assoziiert an Tom40 sind drei kleine Tom-Proteine und ein zentrales Rezeptorprotein, Tom22. Diese Proteine bilden zusammen den GIP-Komplex. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am isolierten TOM-Komplex haben gezeigt, dass es sich um eine Struktur mit zwei bis drei Poren handelt^[7,8]. Der Durchmesser dieser Poren liegt nach elektrophysiologischen Messungen bei ca. 22 Å. Demnach bietet jede Pore Platz für den gleichzeitigen Transport von bis zu zwei

α -Helices. Dieser Befund erklärt warum mitochondriale Proteine in einer ungefalteten Konformation in das Organell transportiert werden müssen und gefaltete Domänen den Import mitochondrialer Vorstufenproteine verhindern.

TIM23-Komplex: Die mitochondriale Präsequenz-Translokase

Präsequenz-Proteine werden als lineare Kette über die äußere Membran der Mitochondrien transportiert. Der weitere Transport des Vorstufenproteins über den Intermembranraum und die innere Membran erfordert die Kooperation des TOM-Komplexes mit der Translokations-Maschinerie der mitochondrialen Innenmembran. Die Präsequenz-Translokase, die auch als TIM23-Komplex (Translokase of the Inner Membrane) bezeichnet wird, ist spezifisch für Proteine, die eine Präsequenz tragen. Der Kern des TIM23-Komplexes wird von den zwei essentiellen integralen Membranproteinen Tim17 und Tim23 gebildet (Abb. 1). Während nur wenig über die Funktion des Tim17 bekannt ist, können Tim23 zwei

Funktionen zugeordnet werden. Tim23 kann über eine Domäne im Intermembranraum Präsequenzen erkennen und erfüllt damit die Funktion eines Rezeptors an der Innenmembran. Darüber hinaus bildet es einen Kanal mit einer Porengröße von ca. 13 Å, durch den Präsequenz-Proteine die Innenmembran passieren können. Kürzlich konnte Tim50 als eine weitere Komponente des TIM23-Komplexes identifiziert werden. Tim50 besitzt eine ca. 40 kDa große Domäne, die in den Intermembranraum exponiert ist und dort an Tim23 bindet^[9,10]. Eine Funktion des Tim50 ist es, Präsequenztragende Vorstufenproteine, die für die mitochondriale Matrix bestimmt sind, über den Intermembranraum in die Translokations-Pore zu dirigieren^[9-11].

Wie wird der Transport von Vorstufenproteinen mit Präsequenz über die Innenmembran angetrieben? Der TIM23-Komplex nutzt das Membranpotential ($\Delta\Psi$) über der Innenmembran als initiale Triebkraft aus. $\Delta\Psi$ aktiviert direkt das Kanalprotein Tim23 und übt einen elektrophoretischen Effekt auf die positiv geladene Präsequenz aus, so dass diese durch den Kanal und da-

mit über die Innenmembran getrieben wird. Um eine vollständige Translokation mitochondrialer Vorstufenproteine in die Matrix zu ermöglichen, kooperiert der TIM23-Komplex eng mit einem Import-Motor, der von Tim44, dem mitochondrialen Hsp70 (mtHsp70) und dessen Co-Chaperonen gebildet wird (Abb. 1). Das an den TIM23-Komplex gebundene Tim44 bindet mtHsp70 und bringt es damit in räumliche Nähe zur Austrittsstelle des Tim23-Kanals. Nach Erscheinen des Vorstufenproteins auf der Matrixseite der Innenmembran kann mtHsp70 an dieses binden. Es gibt zwei Modellvorstellungen dazu, wie mtHsp70 eine Translokation des Vorstufenproteins vermittelt: Im „Brownian Ratchet Model“ wird postuliert, dass das Vorstufenprotein in der Import-Maschinerie vor und zurück oszilliert. MtHsp70 bindet das Vorstufenprotein und unterdrückt dessen Zurückgleiten ins Cytosol. Die Anbindung weiterer mtHsp70 führt schließlich zu einer Einwärts-Bewegung und damit zum Import. Im Gegensatz dazu geht das „Pulling Model“ davon aus, dass das an ein Vorstufenprotein gebundene mtHsp70 seine ATP-getriebene Konforma-

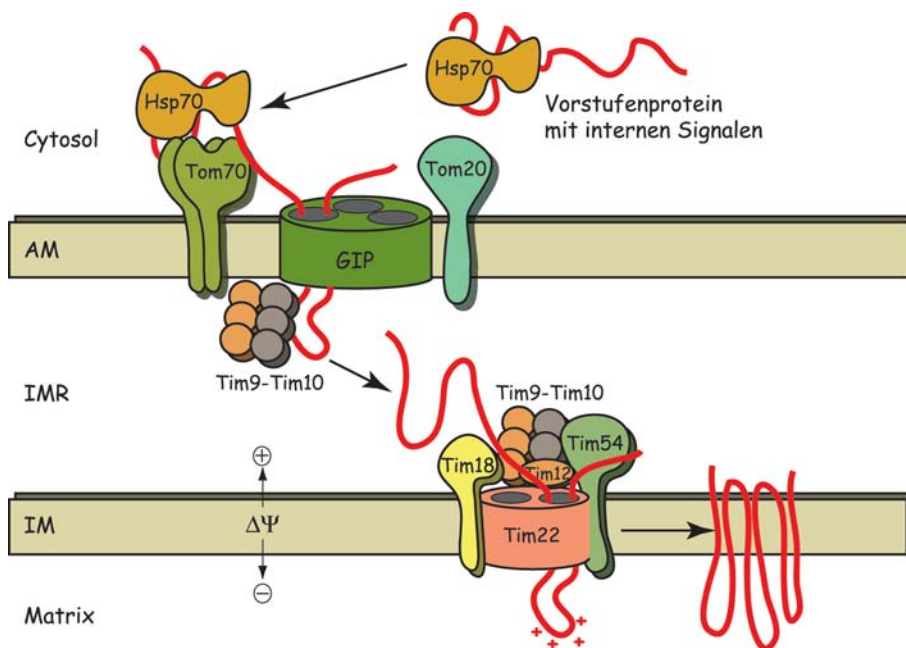


Abb. 2: Import eines Innenmembranproteins mit internen Signalsequenzen: An cytosolisches Hsp70 gebundenes Vorstufenprotein wird von Tom70 erkannt und in Form einer Schleife durch die GIP transportiert. Auf der Intermembranraumseite (IMR) bindet der Tim9-Tim10-Komplex an hydrophobe Segmente des Vorstufenproteins und transferiert es zum TIM22-Komplex, wo es membranpotentialabhängig in die Innenmembran inseriert wird. AM, Außenmembran; IM, Innenmembran.

tionsänderung dazu nutzt, das Vorstufenprotein aktiv in die Matrix zu ziehen. In diesem Szenario wirkt Tim44 als Gegenlager des mtHsp70 an der Importmaschinerie. Welches der Modelle einer Beschreibung des tatsächlichen Importprozesses nahe kommt oder ob es, wie oft in biologischen Systemen, eine Kombination mehrerer Mechanismen gibt, ist ein noch offener und kontrovers diskutierter Gegenstand heutiger Untersuchungen^[12]. Nach oder noch während der Translokation wird die Präsequenz des Vorstufenproteins durch die Matrix-Prozessierungs-Peptidase (MPP) abgespalten und das reife Protein von der Importmaschinerie entlassen.

TIM22-Komplex: Der Protein-Insertions-Komplex

Im Gegensatz zu Präsequenz tragenden Vorstufenproteinen werden hydrophobe Vorstufenproteine mit internen Signalen nicht als lineare Kette, sondern in Form einer Schleife über die Außenmembran transportiert (Abb. 2). Es konnten Translokations-Intermediate dieser Vorstufenproteine erzeugt werden, die sowohl N- als auch C-Terminus ins Cytosol exponieren, während der Hauptteil des Proteins in den Intermembranraum reicht^[13]. Der Weitertransport vom TOM-Komplex über den Intermembranraum hin zur Innenmembran erfordert den essentiellen, löslichen „tiny-TIM-Komplex“, der von den kleinen Proteinen Tim9

und Tim10 gebildet wird. Der Tim9-Tim10-Komplex bindet an die hydrophoben Segmente der Vorstufenproteine und schützt diese gegen das wässrige Milieu des Intermembranraums^[14]. Schließlich vermittelt der Tim9-Tim10-Komplex den Transfer des Vorstufenproteins zum Protein-Insertions-Komplex der Innenmembran (TIM22-Komplex). Der TIM22-Komplex wird von den integralen Membranproteinen Tim18, Tim22 und Tim54 sowie den peripher assoziierten Tim9, Tim10 und Tim12 gebildet und hat eine Größe von ca. 300 kDa (Abb. 2). Der Komplex enthält zwei Poren, die von Tim22 gebildet werden. Elektrophysiologische und elektronenmikroskopische Studien zeigen, dass die Poren des Komplexes einen Durchmesser von ca. 16 Å haben. Beide Poren sind funktionell eng miteinander gekoppelt und durch das Membranpotential $\Delta\Psi$ über der Innenmembran aktivierbar^[15]. Das $\Delta\Psi$ dient dem TIM22-Komplex als einzige externe Energiequelle für die Insertion des Vorstufenproteins in die Innenmembran. Mechanistisch verläuft die vom TIM22-Komplex vermittelte Membraninsertion des Vorstufenproteins in drei Schritten. Zunächst assoziiert das hydrophobe Vorstufenprotein $\Delta\Psi$ -unabhängig an der Intermembranraum-Seite mit dem Komplex (*tethering*). Ein geringes $\Delta\Psi$ über der Membran ist hinreichend, um ein Einfädeln des Vorstufenproteins in den TIM22-Komplex zu ermöglichen (*docking*). Dieser Transportschritt beruht vermutlich auf einem elektrophoretischen

Effekt, den das $\Delta\Psi$ auf positive Ladungen im Vorstufenprotein ausübt. Schließlich wird bei hohem $\Delta\Psi$ und durch Erkennen eines internen Signals im Vorstufenprotein das Schaltverhalten des TIM22-Komplexes geändert. Eine der beiden Poren wird zu einem schnellen Öffnen und Schließen angeregt. Dadurch werden weitere Segmente des Vorstufenproteins in die Innenmembran inseriert und lateral in die Lipidphase entlassen.

Die Untersuchungen zum Proteintransport in Mitochondrien haben erste, detaillierte Einblicke in die den Translokations- und Insertions-Prozessen zugrunde liegenden Mechanismen erlaubt. Neben den hier vorgestellten zwei Haupt-Transportwegen gibt es noch eine Vielzahl von Modifikationen, Sonderwegen oder auch ein Überkreuzen der Hauptwege. Aktuelle Studien haben auch gezeigt, dass noch nicht alle Komponenten der Translokations-Maschinerien identifiziert sind. Vor allem zu Komponenten und Mechanismen, welche für die Sortierung in die vier mitochondrialen Subkompartimente verantwortlich sind, gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse. Auch die Assemblierung importierter Proteine in funktionelle (membranäre) Multiproteinkomplexe (wie z.B. Atmungskettenkomplexe oder die Translokasen selbst) ist noch weitgehend unverstanden. Für die Außenmembran konnte nun eine vom TOM-Komplex unabhängige Sortierungs- und Assemblierungsmaschinerie (SAM-Komplex) entdeckt werden, welche vor allem für komplizierter gebaute Membranproteine benötigt wird^[16]. Gegenstand zukünftiger Arbeiten wird es auch sein, die Kooperation zwischen den Translokasen der Außen- und Innenmembran zu untersuchen.

Literatur

- [1] **Schatz, G. and Dobberstein, B.** (1996): Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271: 1519–1526.
- [2] **Neupert, W.** (1997): Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 863–917
- [3] **Schnell, D.J. and Hebert, D.N.** (2003): Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112: 491–505
- [4] **Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C.** (2003): Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane – a guided tour. *J. Mol. Biol.* 326: 639–657
- [5] **Young, J.C., Hoogenraad, N.J. and Hartl, F.U.** (2003): Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112: 41–50
- [6] **Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N.** (1998): Tom

40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395: 516–521

[7] **Künkele K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W.** (1998): The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93: 1009–1019

[8] **Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kühlbrandt, W., Pfanner, N. and Meisinger, C.** (2002): Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol. Biol.* 316: 657–666

[9] **Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P.** (2002): The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* 111: 507–518

[10] **Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T.** (2002): Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* 111: 519–528

[11] **Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W., and Hell, K.** (2003): Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22: 816–825

[12] **Neupert, W. and Brunner, M.** (2002): The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 555–565

[13] **Wiedemann, N., Pfanner, N. and Ryan, M.T.** (2001): The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* 20: 951–960

[14] **Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M.** (2002): The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* 21: 942–953

[15] **Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N. and Pfanner, N.** (2003): Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* 299: 1747–1751

[16] **Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N. and Meisinger, C.** (2003): Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* (im Druck)

Korrespondenzadresse:

Peter Rehling und Chris Meisinger
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Universität Freiburg
Hermann-Herder-Straße 7
D-79104 Freiburg
Tel.: 0761-203 5245/5243
Fax: 0761-203 5261
Peter.Rehling@biochemie.uni-freiburg.de
Christof.Meisinger@biochemie.uni-freiburg.de