

Membrantransport

Eine Translokase für Makromoleküle in Mitochondrien von Trypanosomen

ANDRÉ SCHNEIDER

DEPARTEMENT FÜR CHEMIE UND BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT BERN, SCHWEIZ

Mitochondrial protein import is mediated by complex machineries in the outer and inner membrane that have been studied in detail in yeast and mammals. Here we review our work of the corresponding machineries in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. We conclude that the import machineries in the two systems are surprisingly different considering that they have the same functions. Moreover, we discuss the dual role the trypanosomal outer membrane translocase has in mitochondrial protein and tRNA import.

DOI: 10.1007/s12268-019-1085-z
© Springer-Verlag 2019

■ Mitochondrien sind Organellen, welche die Kraftwerke der Zelle beherbergen. Sie sind essenziell für das Überleben von praktisch allen Eukaryoten und besitzen ein eigenes genetisches System, da sie von mehr als zwei Milliarden Jahren alten frei lebenden Bakterien abstammen. Der evolutionäre Ursprung von Mitochondrien lässt sich nämlich auf ein

endosymbiotisches Ereignis zwischen einem Archaeon und einem Bakterium zurückführen. Aber obwohl die Organellen aus mehr als 1.000 verschiedenen Proteinen bestehen, codieren ihre Genome heute nur noch für sehr wenige Proteine (13 im Menschen). Dies bedeutet, dass mehr als 95 Prozent aller mitochondrialen Proteine im Zellkern codiert

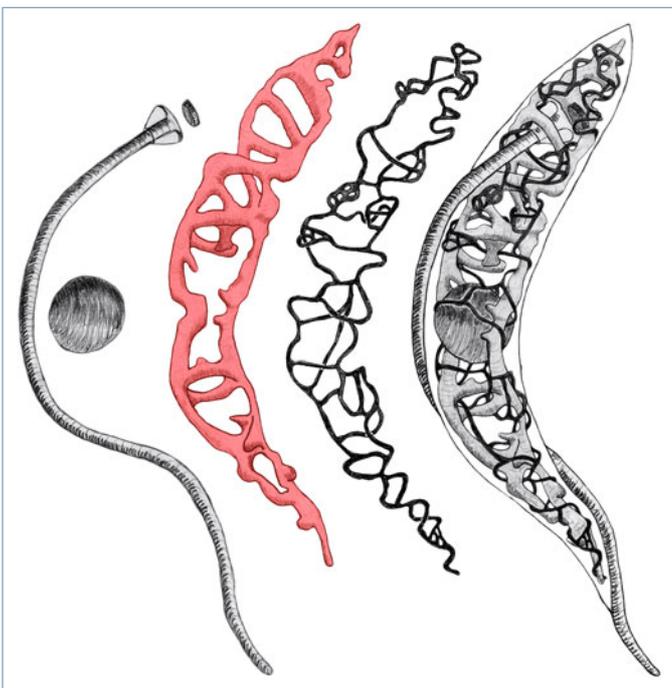
sind, im Cytosol synthetisiert werden und anschließend in die Organellen importiert werden müssen. Vieles deutet darauf hin, dass es die Evolution der Proteinimportsysteme war, die es erlaubte, den bakteriellen Vorläufer des Mitochondriums in ein Organell umzuwandeln, das fest in die Physiologie der Wirtszelle integriert ist.

Wie konserviert sind die mitochondrialen Proteinimportsysteme?

Wir wissen heute sehr viel über den mitochondrialen Proteinimport. Es gibt jedoch eine wichtige Einschränkung, fast alle Studien wurden mit einer kleinen Anzahl von Modellorganismen durchgeführt, insbesondere mit Bäckerhefe und mit Säugerzellen. Phylogenetisch gesehen gehören Hefe und Säuger zu der eukaryotischen Supergruppe der Opisthokonten (siehe auch [1]). Es wird zwar allgemein davon ausgegangen, dass die mitochondrialen Importsysteme hochkonserviert sind. Tatsache ist jedoch, dass sie – mit Ausnahme von Pflanzen – außerhalb der Opisthokonten experimentell schlicht nicht untersucht wurden. Dies war ein Grund, warum sich unsere Forschungsgruppe entschieden hat, den mitochondrialen Proteinimport im parasitären Einzeller *Trypanosoma brucei* (Abb. 1) zu studieren.

Trypanosoma brucei – das andere Modellsystem

T. brucei kennt man vor allem als Erreger der Schlafkrankheit und einer Reihe von Tierseuchen, die in Afrika südlich der Sahara verbreitet sind. Weniger bekannt ist, dass Trypanosomen auch ein attraktives Modellsystem sind, um generelle biologische Prozesse zu erforschen. Dafür gibt es zwei Hauptgründe: Trypanosomen sind keine Opisthokonten, sondern gehören zu der eukaryotischen Supergruppe der Excavata. Sie können in großen Mengen kultiviert werden, was detaillierte biochemische Studien erlaubt. Zudem gibt es eine ganze Reihe von fortgeschrittenen molekulargenetischen Methoden, die in Trypanosomen seit vielen Jahren rou-



◀ **Abb. 1:** Künstliche Interpretation der Zellarchitektur von *Trypanosoma brucei*. Von links nach rechts: Zellkern und Flagellum, Mitochondrion (rot), endoplasmatisches Retikulum (ER), ganze Trypanosomenzelle. © André Schneider.

tinemäßig verwendet werden. Kurz, Trypanosomen sind eines der wenigen experimentell gut zugänglichen eukaryotischen Modellsysteme, das nicht zur Supergruppe der Opisthokonten gehört.

Ihre Biologie unterscheidet sich deshalb in vielen Bereichen von der in Hefe und Säugern. So importieren Trypanosomen nicht nur 95 Prozent ihrer mitochondrialen Proteine, sondern auch alle für die organelläre Proteinsynthese benötigten tRNAs. Auf dem Mitochondriengenom von Trypanosomen findet man dann konsequenterweise auch keine tRNA-Gene. Während mitochondrialer tRNA-Import auch in anderen Organismen nachgewiesen wurde, so ist er in dieser extremen Form, nämlich dass sämtliche mitochondrielle tRNAs importiert werden, auf Trypanosomen und einzelne andere Protozoen beschränkt. Ursprünglich war unser Labor vor allem am mitochondrialen tRNA-Import interessiert. Unsere Motivation, den mitochondrialen Proteinimport zu untersuchen, lag deshalb zuerst darin begründet, herauszufinden, ob es eine Verbindung zwischen Protein- und tRNA-Import gibt.

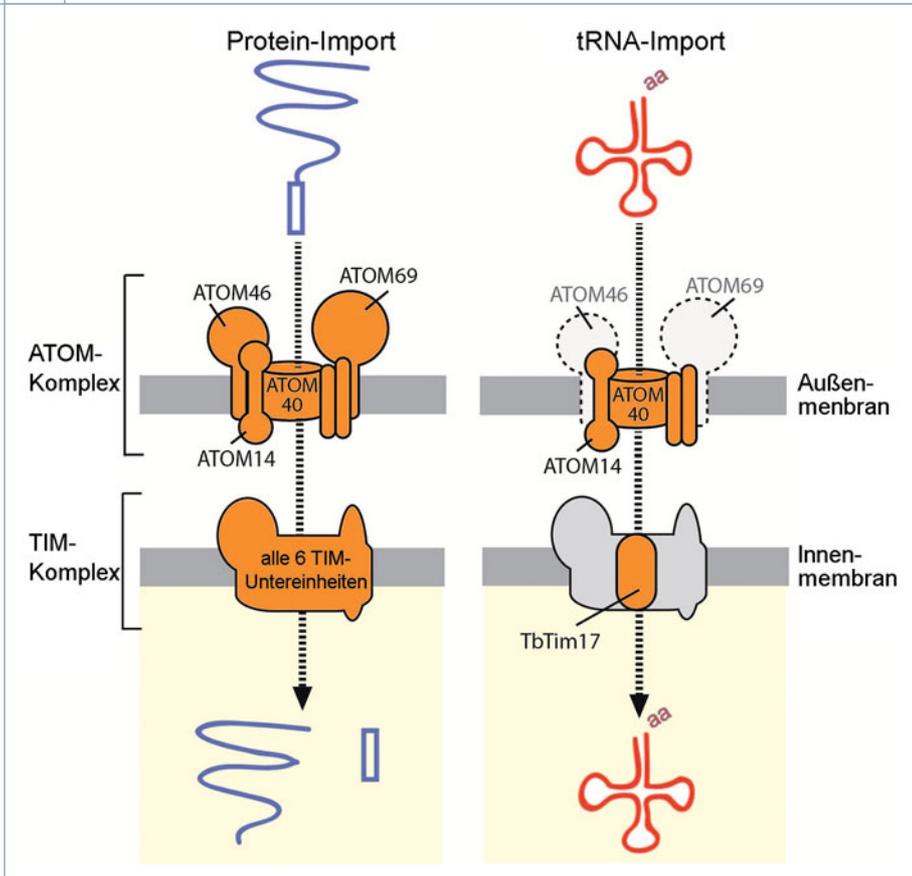
Außenmembran-Proteintranslokase von *Trypanosoma brucei*

Mithilfe von reziproken Immunpräzipitationen und anschließenden massenspektrometrischen Analysen gelang es uns, den Proteinkomplex zu definieren, der in der Außenmembran der Mitochondrien für den Import von praktisch allen Proteinen zuständig ist. Dieser Komplex ist das trypanosomale Analogon der Außenmembran-Proteintranslokase (TOM-Komplex) der Hefe und wird atypischer TOM-Komplex (ATOM-Komplex) genannt. Er besteht, wie der TOM-Komplex in Hefe, aus sieben Untereinheiten, die in Trypanosomen alle essenziell für den Proteinimport sind (**Abb. 2**, [2, 3]). Allerdings weisen nur zwei von ihnen Ähnlichkeiten zu Untereinheiten des Hefe-TOM-Komplexes auf. Das Protein ATOM40 bildet den Importkanal und ist wahrscheinlich ein divergentes Ortholog von Tom40, der Importpore des TOM-Komplexes. ATOM14 scheint eine verkürzte Variante von Tom22 des TOM-Komplexes zu sein. Homologe der übrigen fünf Untereinheiten findet man jedoch nur in Trypanosomen und ihren Verwandten. ATOM46 und ATOM69 sind von besonderem Interesse. Es sind Importrezeptoren, die unterschiedliche, aber überlappende Substratspezifitäten aufweisen. ATOM46

und ATOM69 haben damit dieselbe Funktion wie die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 des TOM-Komplexes der Hefe [2, 3]. Die Rezeptoren in den beiden Organismen zeigen jedoch keine Homologie: ATOM46 hat *armadillo repeats*, die in den Untereinheiten des TOM-Komplexes fehlen, und während ATOM69 wie das Tom70 der Hefe TPRs (*tetratricopeptide repeats*) besitzt, so ist die Topologie der Proteine unterschiedlich. ATOM69 ist nämlich, im Gegensatz zu Tom70, C-terminal in der Membran verankert. Die Rezeptorenpaare ATOM46/ATOM69 und Tom20/Tom70 sind also das Produkt konvergenter Evolution: Sie haben die gleiche Funktion, lassen sich aber nicht auf einen gemeinsamen evolutionären Vorfänger zurückführen.

Außenmembran-tRNA-Translokase von *Trypanosoma brucei*

Der ATOM-Komplex in der Außenmembran funktioniert als Proteintranslokase für praktisch alle trypanosomalen Proteine, die in die Mitochondrien transportiert werden. Wie tRNAs in die Mitochondrien importiert werden, war jedoch nach wie vor unbekannt. Wir untersuchten deshalb, ob ATOM-Komplex-Untereinheiten auch für den tRNA-Import benötigt werden. Tatsächlich zeigten wir in einer *in vivo*-Analyse, dass die RNAi-abhängige Depletion aller ATOM-Komplex-Komponenten – mit Ausnahme der beiden Rezeptoren – nicht nur den Proteinimport, sondern auch den tRNA-Import hemmt (**Abb. 2**). Die Depletion der Proteinimportrezeptoren ATOM46 und ATOM69 hingegen wirkte sich selektiv auf den Protein-, nicht aber auf den tRNA-Import aus [4]. Dies zeigt, dass das Ko-Import-Modell in Trypanosomen nicht zutreffen kann, bei dem tRNAs in einem Komplex mit einem zu importierenden Protein durch die Außenmembran transportiert werden. In einem weiteren Experiment wurde ein chimäres Substrat exprimiert, von dem die N-terminale Hälfte in die Mitochondrien importiert wird, die C-terminale Hälfte jedoch so stark gefaltet ist, dass das Fusionsprotein den Importkanal verstopft. Interessanterweise wurde in diesen Zellen gleichzeitig der Protein- und der tRNA-Import gehemmt. Dies zeigt, dass tRNAs und Proteine denselben Kanal, das ATOM40-Protein, für den Import benötigen [4]. Der ATOM-Komplex von Trypanosomen hat also die außergewöhnliche Fähigkeit, entweder Proteine oder tRNAs zu transportieren.



▲ **Abb. 2:** Import von Proteinen (links) und tRNAs (rechts) in Mitochondrien von *Trypanosoma brucei*. ATOM- und TIM-Untereinheiten, von denen bekannt ist, dass sie für den entsprechenden Prozess benötigt werden, sind in Orange gezeichnet. Die Proteinimportrezeptoren ATOM46 und ATOM69 sind nur für den Proteinimport, nicht aber für den tRNA-Import essenziell.

Innenmembran-Translokase von *Trypanosoma brucei*

Die nächste Frage war, wie trypanosomale Proteine (und tRNAs) durch die Innenmembran transportiert werden. Kürzlich gelang es uns, die trypanosomale Innenmembran-Proteintranslokase, den TIM-Komplex, zu charakterisieren. Mithilfe von chimären Substratproteinen, die in der Importmaschinerie steckenbleiben, konnten wir zudem zeigen, dass Trypanosomen nur einen einzigen TIM-Komplex besitzen [5, 6]. Dies ist außergewöhnlich, da die Systeme in Hefe und Säugern jeweils zwei unterschiedliche TIM-Komplexe besitzen, die auf verschiedene Substrattypen (entweder Proteine mit Präsequenzen oder Proteine mit multiplen Transmembrandomänen) spezialisiert sind. In Trypanosomen haben wir also nur einen einzigen TIM-Komplex, der für den Import oder die Membraninsertion von beiden Substrattypen verantwortlich ist. Der trypanosomale TIM-Komplex besteht aus sechs Untereinheiten, die alle für den Proteinimport essenziell sind. Von diesen weist TbTim17 als einzige Komponente Ähnlichkeiten zu Untereinheiten der zwei TIM-Komplexe in Hefe auf [5, 6]. Wie tRNAs durch die Innenmembran trans-

portiert werden, ist nicht bekannt. *In vivo*-Experimente haben jedoch gezeigt, dass die TIM-Untereinheit TbTim17 nicht nur für den Proteinimport, sondern auch für den tRNA-Import essenziell ist [7]. Die Verbindung zwischen Protein- und tRNA-Import, die wir beim ATOM-Komplex in der Außenmembran beobachten, gilt also zumindest in beschränktem Maße auch für den trypanosomalen TIM-Komplex (**Abb. 2**).

Schlussfolgerungen

Eine der offensichtlichsten Eigenschaften des Phänomens Leben ist die immense Diversität. Zellbiologische Prozesse wurden auf molekularer Ebene traditionellerweise nur in wenigen experimentell zugänglichen Modellsystemen erforscht, in der Annahme, dass sie

zumindest bei Bakterien, Archaeen und Eukaryoten konserviert sind. Der mitochondrielle Proteinimport in Trypanosomen zeigt jedoch, dass dem nicht so sein muss. Obwohl die Proteinimportsysteme wohl zu den evolutionär ältesten mitochondrienspezifischen Merkmalen gehören, sind sie nur sehr moderat konserviert zwischen Trypanosomen und Hefe. Dies ist erstaunlich, denn die Funktion der Translokasen ist in beiden Systemen identisch. Der Vergleich zwischen Trypanosomen und Hefen gewährt uns deshalb nicht nur einen Einblick in die evolutionäre Geschichte der Proteintranslokasen, sondern ermöglicht es auch, die grundlegendsten Eigenschaften von Importsystemen zu definieren, die „konserviert“ sind, nicht weil sie einen gemeinsamen Ursprung haben, sondern weil sie der gleichen funktionellen Selektion ausgesetzt waren. ■

Literatur

- [1] Morriswood B, Engstler M (2019) Mehr Diversität für die Zellbiologie – Trypanosomen als Vorreiter. *BIOspektrum* 4:394–397
- [2] Mani J, Meisinger C, Schneider A (2016) Peeping at TOMs: diverse entry gates to mitochondria provide insights into the evolution of eukaryotes. *Mol Biol Evol* 233:337–351
- [3] Mani J, Desy S, Niemann M et al. (2015) Mitochondrial protein import receptors in kinetoplastids reveal convergent evolution over large phylogenetic distances. *Nat Commun* 6:6646
- [4] Niemann M, Harsman A, Mani J et al. (2017) tRNAs and proteins use the same import channel for translocation across the mitochondrial outer membrane of trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E7679–E7687
- [5] Harsman A, Schneider A (2017) Mitochondrial protein import in trypanosomes – expect the unexpected. *Traffic* 18:96–109
- [6] Harsman A, Oeljeklaus S, Wenger C et al. (2016) The non-canonical mitochondrial inner membrane presequence translocase of trypanosomatids contains two essential rhomboid-like proteins. *Nat Commun* 19:13707
- [7] Tschopp F, Charrière F, Schneider A (2011) *In vivo* study in *Trypanosoma brucei* links mitochondrial transfer RNA import to mitochondrial protein import. *EMBO Rep* 12:825–832

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. André Schneider
 Departement für Chemie und Biochemie
 Universität Bern
 Freiestraße 3
 CH-3012 Bern
 Tel.: +41-(0)631-4253
 andre.schneider@dcb.unibe.ch
 www.schneider.dcb.unibe.ch

AUTOR



André Schneider

1979–1988 Biologiestudium und Promotion an der Universität Bern, Schweiz. 1989–1993 Postdoktorand am Biozentrum und an der University of California, San Francisco, USA. 1994–2003 Gruppenleiter am Biozentrum in Basel und dann an der Universität Fribourg in der Schweiz. Seit 2007 Professor am Department für Chemie und Biochemie der Universität Bern.