

Membranproteinspuren

Mobilität einzelner Membranproteine in Mitochondrien

KARIN B. BUSCH

INSTITUT FÜR INTEGRATIVE ZELLBIOLOGIE UND PHYSIOLOGIE, BIOLOGISCHE
FAKULTÄT, UNIVERSITÄT MÜNSTER

Mitochondria are enveloped by an outer membrane (OM) and possess a highly complex inner membrane (IM) with multiple cristae invaginations. We asked how the dynamics of the receptor Tom20 in the OM and ATP synthase in the IM would be affected by the membrane architecture. Single molecule tracking of fluorescence-labeled single particles revealed striking differences in the mobility patterns and diffusion coefficients: ATP synthase is trapped in cristae, while Tom20 is highly diffusive.

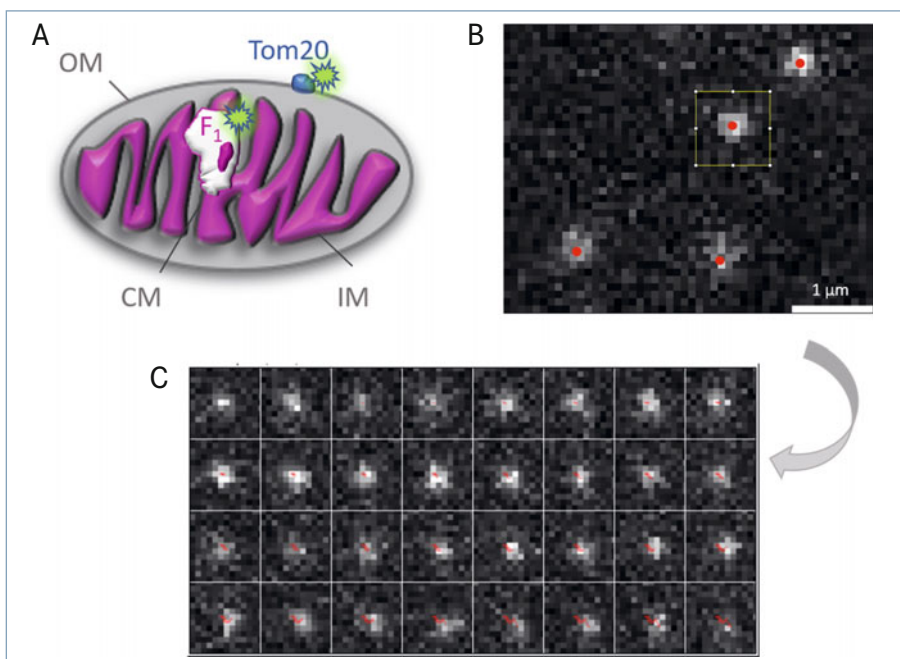
DOI: 10.1007/s12268-022-1830-6
© Die Autorin 2022

■ Mitochondrien haben eine komplexe Architektur, die durch die Existenz zweier Membranen zustande kommt. Die äußere

Membran (OM, *outer mitochondrial membrane*) umgibt die Organellen wie eine Hülle, während die innere Membran (IM, *inner mito-*

chondrial membrane) sich regelmäßig in die Matrix hinein faltet und somit die Oberfläche stark vergrößert (**Abb. 1A**). Diese Einstülpungen, Cristae genannt, liegen häufig in Form von Scheiben vor, die zwar hintereinander gestapelt aber noch verbunden sind. Die Verbindung wird über Teile der Innenmembran, die parallel zur äußeren Membran verlaufen, gewährleistet. Dieser Teil der Membran wird auch innere Grenzmembran genannt. Die Bereiche, wo sich die Cristae von der inneren Grenzmembran abschnüren, sind die Cristae-Knotenpunkte. Trotz dieser Unterteilung ist die innere Membran, genau wie die äußere, eine durchgehende Membran. Wir haben uns gefragt, wie diese spezielle Architektur die Diffusion von einzelnen Membranproteinen bestimmt und ob sich das Diffusionsverhalten von Proteinen in der Innen- und Außenmembran unterscheiden würde. Als Beispiele haben wir zwei Proteine gewählt, die Teil größerer Proteinkomplexe sind: Tom20, einen Rezeptor der Import-Maschinerie TOM in der Außenmembran und ATP-Synthase in der Innenmembran (**Abb. 1A**). TOM, die Translokase der äußeren Membran, importiert mehr als 99 Prozent der mitochondrialen Proteine, die kerncodiert sind [1]. Tom20 ist einer der Rezeptoren für die zu importierenden Peptidsubstrate. Der zentrale TOM-Komplex wird auch als allgemeine Importpore (GIP, *general import pore*) bezeichnet, und besteht aus der die Pore formenden Untereinheit Tom40, dem Rezeptor Tom22 und den Untereinheiten Tom5, 6, und 7. Interessanterweise wurde Tom20 bisher nicht stabil in der GIP-Struktur gefunden. Für uns ergab sich daraus die Frage, ob Tom20 vorzugsweise (nur) dann an die GIP bindet, wenn es mit einem Substrat beladen ist.

Die ATP-Synthase in der inneren Mitochondrienmembran liegt dagegen prominent in Reihen von Dimeren entlang der Cristae-Ränder vor [2]. Das suggeriert eine eher statische Struktur aus Multimeren. Allerdings wurden auch verschiedene Wechselwirkungen der ATP-Synthase mit anderen Proteinen beschrieben, so ein Komplex ADP/ATP-Translokase [3], Interaktionen mit dem



▲ **Abb. 1:** Verfolgung von mitochondrialen Membranproteinen. **A**, Tom20 in der Außenmembran (OM) und F_1F_0 -ATP-Synthase in den Cristae (CM). Die beiden Proteine wurden mit einem Protein fusioniert, das sich posttranslational durch Zugabe eines fluoreszierenden Substrats markieren lässt. **B**, Signale von einzelnen ATP-Synthase-Partikeln. **C**, Zeitreihe, welche die Bewegungsspur eines Partikels über 1 s zeigt.

MICOS-Protein Mic10 [4] sowie dem IM-Fusionsprotein Opa1 [5]. Zudem konnte die Beteiligung der ATP-Synthase an der Formierung der transienten mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) gezeigt werden [6]. Dies erfordert im Prinzip eine partielle Lösung der ATP-Synthase aus dem multimeren ATP-Synthase-Array und somit eine gewisse Mobilität in der Membran, da die oben genannten Wechselwirkungen z. T. an den Cristae-Knotenpunkten oder der inneren Grenzmembran erwartet werden.

Verfolgungs- und Lokalisationsmikroskopie von Einzelmolekülen in Mitochondrienmembranen

Um die raumzeitliche Organisation und Mobilität von Membranproteinen in Mitochondrien zu bestimmen, haben wir die Bewegungsmuster einzelner Moleküle aufgezeichnet. Dafür haben wir die Möglichkeit genutzt, dass bestimmte Proteine (HaloTag, SnapTag) zur posttranslationalen Fluoreszenzmarkierung verwendet werden können [7]. Dabei wird fluoreszenzmarkiertes Sub-

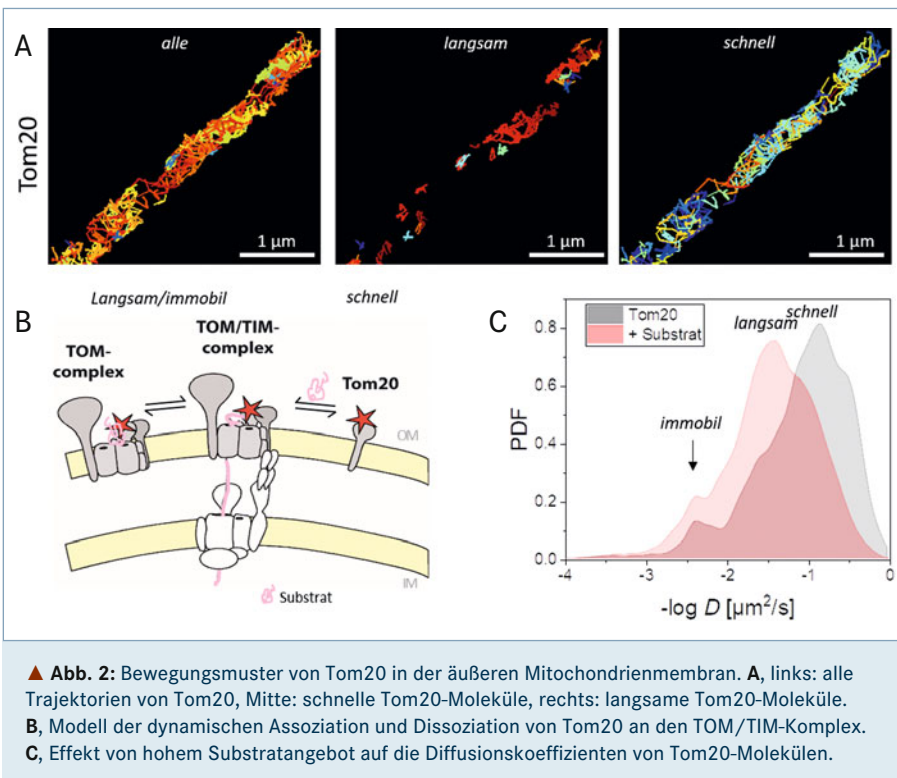
strat zu den Zellen gegeben, aufgenommen und eingebaut. Eine substöchiometrische Gabe (meist im Konzentrationsbereich nM–pM) des fluoreszierenden Substrats resultiert in einem so geringen Markierungsgrad, dass Einzelmoleküle sichtbar werden (**Abb. 1**). Da das Ziel war, die Mobilität von Membranproteinen in lebenden Zellen zu studieren, mussten die Substrate membranfähig sein. Die Vorgehensweise war folgendermaßen: Herstellung eines Tag-Fusionsproteins über Plasmid-Codierung, Transfektion von humanen Säugerzellen und Selektion mit einem Antibiotikum, um stabile Zelllinien zu erhalten. Die Resistenz war ebenfalls auf dem Plasmid codiert. Stabile Zelllinien erlauben eine bessere Charakterisierung, ob das markierte Peptid auch in den Proteinkomplex eingebaut wird und ob es eine Beeinträchtigung der Funktion durch die Markierung gibt. Für die posttranslationale Anfärbung wurden fluoreszierende HaloTag-Ligand-Substrate benutzt, die mit organischen Fluorophoren konjugiert waren. Die Aufnahme wurden mit einem speziellen

Mikroskop durchgeführt, das mittels eines TIRF-Objektivs (TIRF steht für *total internal reflection fluorescence*) die Erzeugung eines Art Lichtblatts zur Anregung ermöglicht und so das Signal-zu-Hintergrund-Fluoreszenzverhältnis verbessert. Des Weiteren war das Mikroskop mit einer hochsensitiven Kamera ausgestattet, welche die Detektion von Einzelmolekülen erlaubte. Um die Mobilität der Einzelmoleküle in der Membran zu bestimmen, wurden Videos von bis zu 4.000 Bildern mit einer Geschwindigkeit von 33 Hz aufgenommen. Die erhaltenen Bilder mit den Einzelmolekülsignalen (**Abb. 1B, C**) wurden weiter prozessiert, um die genaue Position des Fluorophors zu finden. Dazu wurde das Signal jeweils mit einer 2D-Gauß-Kurve gefittet, um das Zentrum des Signals zu bestimmen, hier dargestellt als roter Punkt im Bild (**Abb. 1B**).

Partikel, die sich über mehrere Bilder hinweg in einem bestimmten Radius aufhielten, wurden als derselbe Partikel behandelt. Die Positionen in aufeinanderfolgenden Bildern wurden dann verbunden und ergaben die

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



Wir interpretieren dies als den Anteil von Tom20, der mit der Translokase assoziiert ist. Außerdem konnten wir zeigen, dass der Anteil der langsamen Tom20-Moleküle zunahm, wenn den Mitochondrien Importsubstrat angeboten wurde [10]. Das bedeutet eine vermehrte Assoziation mit der Translokase. Die Analyse der Tom20-Bewegung in der OM ermöglichte uns somit einen Einblick in die Dynamik des Rezeptor-Translokase-Komplexes und bestätigte vorherige Vermutungen, dass Tom20 nur bei Bedarf mit der Translokase interagiert (Abb. 2).

Die F₁F₀-ATP-Synthase zeigt partiell ein mobiles Verhalten in Cristae

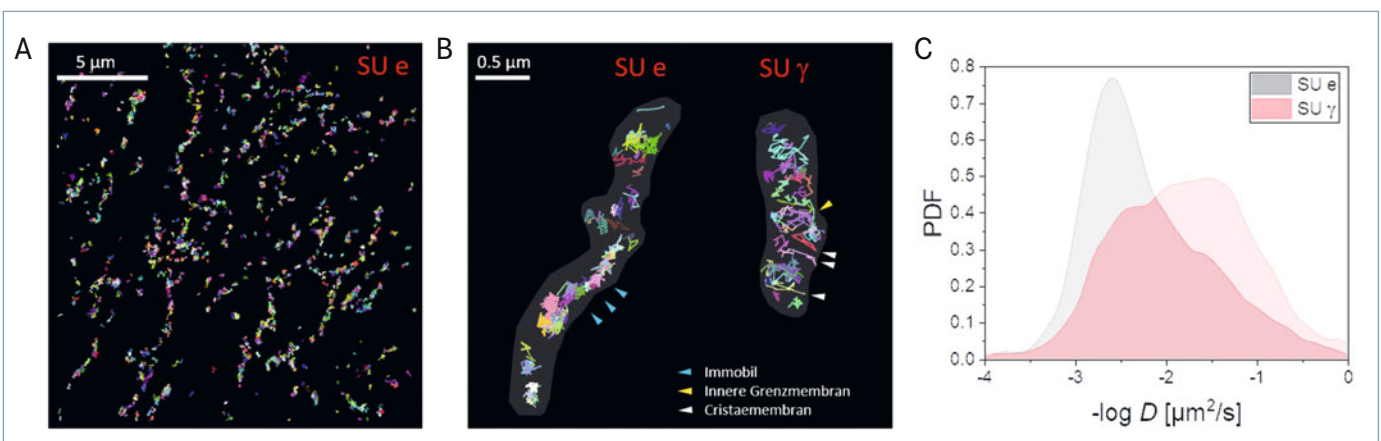
Als nächstes fragten wir uns, wie im Vergleich dazu das Bewegungsmuster der ATP-Synthase aussehen würde. Dafür markierten wir den Enzymkomplex an zwei verschiedenen Untereinheiten, an der Untereinheit γ am F₁-Teil und an der Untereinheit e am F₀-Teil. Die Untereinheit e (SU e) ist an der Dimerisierung der ATP-Synthase beteiligt. Wie sich in nativen Gelen zeigte, war die Untereinheit e in Monomeren, Dimeren und Oligomeren von ATP-Synthase vorhanden, während die markierte Untereinheit γ (SU γ) eher in F₁-Subkomplexen gefunden wurde. Damit waren also verschiedene Subpopulationen der ATP-Synthase markiert [11]. In der Tat zeigten diese Subpopulationen unterschiedliche Bewegungsmuster in der Innenmembran: Die über die Untereinheit e markierten ATP-Synthase-Partikel (also die Dimere und Oligomere) waren praktisch immobil, während die über die Untereinheit γ markierten ATP-Synthase-Partikel Diffusion entlang der Cristae und teilweise der

Bewegungsspur des Proteins in der Membran [8, 9].

Tom20 ist dynamisch mit dem TOM-Komplex assoziiert

Zuerst interessierten wir uns für die Mobilität von Tom20 in der Außenmembran. Dafür wurde Tom20 über das HaloTag und Zugabe des HTL-Farbstoffs am C-terminalen Ende, der in das Cytosol ragt, markiert. Wir konnten eine quasi uneingeschränkte Bewegung von Tom20 auf der Mitochondrienoberfläche beobachten, wobei ein Teil der Moleküle aber

langsamer waren. Dies konnte sehr gut anhand der Verteilung der Diffusionskoeffizienten eruiert werden. **Abbildung 2** zeigt die Bewegungsspuren von Tom20 auf einem Mitochondrium und das Histogramm mit allen berechneten Diffusionskoeffizienten. Im oberen Teil ist eine Karte mit allen Bewegungsspuren von Tom20 und dann jeweils nur die Karte der schnellen bzw. langsamen Moleküle dargestellt (von links nach rechts). Die langsamen Moleküle hatten vergleichbare Diffusionskoeffizienten wie Tom40, die zentrale Importpore des TOM-Komplexes.



▲ **Abb. 3:** Bewegungsmuster von ATP-Synthase-Partikeln in Mitochondrien. **A,** Laufspuren dimerer und oligomerer ATP-Synthase-Partikel im mitochondrialen Netzwerk einer Zelle. **B,** Vergleich der Bewegungsmuster von Dimeren/Oligomeren (SU e) und Monomeren/Subkomplexen (SU γ) in einzelnen Mitochondrien. **C,** Histogramm der berechneten Diffusionskoeffizienten D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] für an SU γ und SU e markierter ATP-Synthase.

inneren Grenzmembran zeigten (**Abb. 3A, B**). Dies schlug sich in unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten nieder (**Abb. 3C**).

Ausblick

Mittels Einzelpartikelverfolgung von Membranproteinen in Mitochondrien lassen sich die submitochondriale Lokalisation von Proteinen sowie ihre Beweglichkeit feststellen. Damit enthüllen sich u. a. die Strukturen der Membrannanokompartimente, in denen sich Proteine aufhalten und in denen sie diffundieren könn(t)en. Die Methode der Lebendzell-Einzelmolekülverfolgung ergänzt damit biochemische Analysen, welche eine Zuordnung der Proteine zu Kompartimenten mittels Fraktionierung ermöglicht. Außerdem geben uns die Spuren der Proteine Aufschluss über Diffusionsräume und Diffusionshindernisse. Um Aufschluss über die Mechanismen zu bekommen, die zu einer lokalen Anhäufung von Proteinen in der gleichen Membran, aber in verschiedenen Mikrokompartmenten (wie der inneren Grenzmembran oder den Cristae), führen, wird Einzelmolekülverfolgung eine wertvolle Analyse­methode sein. Spannend wird es auch sein, live zu verfolgen wie sich verschiedene Stresssituationen, Signale oder pathologische Zustände auf die Verteilung bzw. Umverteilung von Proteinen auswirken.

Danksagung

Die Forschung zu Membranproteinspuren wurde im Zuge der Förderung durch den SFB944 (Projekt CRC944, INST190/167-2) unterstützt. Timo Dellmann hat wesentlich zur Etablierung der Technik beigetragen. ■

Literatur

- [1] Meisinger C, Brix J, Model K et al. (1999) The preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: receptors and a general import pore. *Cell Mol Life Sci* 56: 817–824
- [2] Davies KM, Strauss M, Daum B et al. (2011) Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 14121–14126
- [3] Beutner G, Alanzalón RE, Porter GA (2017) Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes. *Sci Rep* 7: 14488
- [4] Rampelt H, Wollweber F, Licheva M et al. (2022) Dual role of Mic10 in mitochondrial cristae organization and ATP synthase-linked metabolic adaptation and respiratory growth. *Cell Rep* 38: 110290
- [5] Quintana-Cabrera R, Quirin C, Glytsou C et al. (2018) The cristae modulator optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP synthase oligomers to safeguard mitochondrial function. *Nat Commun* 9: 3399
- [6] Mnatsakanyan N, Llaguno MC, Yang Y et al. (2019) A mitochondrial megachannel resides in monomeric F1FO ATP synthase. *Nat Commun* 10: 5823
- [7] Wilmes S, Stauf­enbiel M, Lisse D et al. (2012) Triple-color super-resolution imaging of live cells: resolving submicroscopic receptor organization in the plasma membrane. *Angew Chem Int Ed Engl* 51: 4868–4871

- [8] Appelhans T, Beinlich FR, Richter CP et al. (2018) Multi-color localization microscopy of single membrane proteins in organelles of live mammalian cells. *JoVE*: e57690–e57690
- [9] Appelhans T, Busch K (2017) Single molecule tracking and localization of mitochondrial protein complexes in live cells. *Methods Mol Biol* 1567: 273–291
- [10] Bhagawati M, Arroum T, Webeling N et al. (2021) The receptor subunit Tom20 is dynamically associated with the TOM complex in mitochondria of human cells. *Mol Biol Cell* 32: br1
- [11] Weissert V, Rieger B, Morris S et al. (2021) Inhibition of the mitochondrial ATPase function by IF1 changes the spatio-temporal organization of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1862: 148322

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und

angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Karin Busch
 Institut für Integrative Zellbiologie und Physiologie
 Biologische Fakultät
 Universität Münster
 Schloßplatz 5
 D-48149 Münster
 buschkar@uni-muenster.de

AUTORIN



Karin Busch

Studium der Biochemie, Chemie und Biologie, anschließend Promotion. 1997–1999 Postdoc am Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel, im Labor von Prof. Dr. H. Fromm. 2000–2004 Postdoc im Labor von Prof. Dr. R. Tampé an der Goethe-Universität Frankfurt. 2005–2008 Postdoc im Labor von Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn an der Goethe-Universität Frankfurt. 2009–2015 Juniorprofessorin an der Universität Osnabrück. Seit 2016 W2-Professorin an der Universität Münster, Schwerpunkt Mitochondriendynamik und Bioenergetik.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer