

- I -

Aus dem Max Delbrück Centrum für molekulare Medizin

Dissertation

**Biochemische und zellbiologische Analyse mutanter
Varianten der OPA1 GTPase**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr.rer.medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anita Maria Bulczak

aus Gdynien /Polen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Bader
 2. Prof. Dr. Gerd Kempermann
 3. Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld

Datum der Promotion: 17.10.2008

Vorwort

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), amerikanische Soziologe u. Ökonom

Widmung

Meiner Familie

Zusammenfassung

Die Optikus Atrophie 1 (OPA1) ist ein mitochondriales Protein, das zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Mutationen im *OPA1*-Gen wurden in Patienten mit autosomal dominanter Optikus Atrophie (adOA) gefunden. Die adOA ist die am häufigsten auftretende erbliche optische Neuropathie. Die Erkrankung zeichnet sich durch zunehmenden Verlust der Sehschärfe, zunehmendes Skotom, Farbfehlsichtigkeit und eine bilateral temporale Sehnervatrophie aus (Alexander *et. al.*, 2000). Der zu Grunde liegende Pathomechanismus für adOA ist bislang unklar. Zugleich häufen sich Beobachtungen, die Mutationen im *OPA1*-Gen mit Symptomen weiterer Enzephalomyopathien als auch anderer Erkrankungen assoziieren.

In dieser Arbeit stand die Analyse verschiedener, Patienten-relevanter Mutationen der OPA1 GTPase Domäne im Mittelpunkt. Erstmals wurde der Einfluss derartiger OPA1 Mutanten biochemisch auf die Veränderungen der GTPase Aktivität und zellbiologisch auf Änderungen der Mitochondrienmorphologie untersucht. Außerdem wurde die Auswirkung der OPA1 Mutanten Expression auf die Mitochondrienmorphologie in HeLa und in kürzlich etablierten OPA1^(-/-) MEF Zellen (Song *et al.*, 2007) analysiert. Zusätzlich wurde die Mitochondrienmorphologie und Respirationskapazität in Lymphblastoiden-Zellen von adOA Patienten untersucht.

Die stärksten Verluste der GTPase-Aktivität wurde für die OPA1 Mutante 300GTP gemessen. In Zellkultur exprimiert zeigte das OPA1^{G300E} Protein eine fehlende Fusionskompetenz, so dass OPA1^{G300E} nicht in der Lage war die wildtyp Mitochondrienmorphologie in OPA1^(-/-) Zellen wiederherzustellen. Stattdessen verblieben die Mitochondrien vesikulär. Dem gegenüber war der Effekt von OPA1^{R270T} vergleichbar dem exogen exprimierten wildtyp OPA1 in OPA1^(-/-) Zellen. So ermöglichte OPA1^{R270T} mit 95% GTP-Hydrolyse-Aktivität eine Wiederherstellung der wildtyp-artigen tubulären Mitochondrienmorphologie. Diese Ergebnisse zeigten tendenziell eine starke Korrelation zwischen der OPA1 GTPase Aktivität und der Länge sowie Erscheinungsform von Mitochondrien. Die Analyse der Patientenlymphozyten ergab, dass eine signifikante Veränderung der Mitochondrienmorphologie vorlag, aber ein Verlust an Respirationskapazität nicht einheitlich nachweisbar war.

Zusammenfassend konnten die Ergebnissen nachweisen, dass die Aktivität der OPA1 GTPase Domäne essentiell für die korrekte OPA1 Funktion in der Zelle ist. Dabei stellt die Regulierung der Mitochondrienstruktur eine primäre Funktion des OPA1 Proteins dar. Weitere Einflüsse auf Mitochondrienfunktionen, wie die zum Teil beobachtete Beeinträchtigung der Zellrespiration, resultieren höchstwahrscheinlich aus diesem Primäreffekt.

Abstract

The Optic Atrophy 1 (OPA1) is a mitochondrial protein localised between the inner and outer membrane. Mutations in the *OPA1* gene were found in autosomal dominant optic atrophy (adOA) patients. AdOA is the most frequent inherited optic neuropathy. The disease is characterised by a loss of visual acuity, progressive scotoma, colour vision failure and temporal optic nerve atrophy (Alexander *et al.*, 2000). The pathomechanism behind adOA is still unknown. Recent observations suggest a connection between *OPA1* mutations and further diseases.

This work is focused on studying different, patient-relevant mutations localised in the OPA1 GTPase domain. For the first time the influence of such OPA1 mutants was analysed biochemically on GTPase activity changes and cell-biologically on mitochondrial morphology alterations. The effects that OPA1 mutant expression had on mitochondrial morphology in HeLa and in newly made OPA1^(-/-) MEF cells (Song *et al.*, 2007) were analysed. In addition mitochondrial morphology and respiration activity were measured in lymphocytes of adOA patients.

The most severe loss of GTPase activity was measured for the OPA1 mutant 300GTP. The OPA1^{G300E} protein expressed in cell culture leads to fusion incompetence of mitochondria. This results in an inability to rescue the mitochondrial morphology to a wild type appearance in OPA1^(-/-) cells. Instead of this the mitochondria remained vesicular. On the other hand OPA1^{R270T} showed a comparable effect to exogenously expressed wild type OPA1 in OPA1^(-/-) cells. Therefore OPA1^{R270T} was able to rescue mitochondrial morphology to wild type-like, tubular structures owing a GTP-hydrolysis-activity of 95 %. These results reflect that OPA1 GTPase activity strongly tends to correlate with length and appearance of mitochondria. The analysis of patient's lymphocytes revealed a significant change in mitochondrial morphology but no consistent indication for a lost respiratory capacity.

Summarising results it could be proven that the activity of OPA1 GTPase domain plays an essential role for proper OPA1 function in cells. Thereby the regulation of mitochondrial morphology represents a primary function of OPA1 protein. Additional effects on mitochondrial function, as partially seen in affected respiration, most commonly arise out of the primary effect.

Schlagwörter:

OPA1, adOA, GTPase Domäne, Mitochondrien

Keywords:

OPA1, adOA, GTPase domain, mitochondria

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	III
Widmung	III
Zusammenfassung	1
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Mitochondrien	8
1.1.1 Morphologie der Mitochondrien	9
1.1.2 Funktion im Energiestoffwechsel	10
1.1.3 Funktion während der Apoptose	11
1.1.4 Mitochondriale Dynamik	14
1.2 Mitochondriale und neurodegenerative Erkrankungen	18
1.3 OPA1	19
1.3.1 OPA1 Expression	19
1.3.2 Proteinstruktur und subzelluläre Lokalisierung	20
1.3.3 OPA1 und autosomal dominante optische Atrophie (adOA)	22
1.3.4 OPA1 Funktion	25
1.4 Fragestellung der Arbeit	26
2 Materialien	27
2.1 Geräte	27
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	27
2.3 Kits	29
2.4 Verbrauchsmaterialien	30
2.5 Zellen und Vektoren	30
2.6 Lösungen, Puffer und Bakterienmedien	31
2.7 Zellkultur Lösungen:	33
2.8 Antikörper	34
2.8.1 Primäre Antikörper	34
2.8.2 Sekundäre Antikörper	34
2.9 Primer (Oligonukleotide)	35
2.9.1 Primer zur Mutagenese	35
2.9.2 Primer zur Proteinexpression	35

2.10	Software	35
3	Methoden	36
3.1	Molekularbiologische Methoden	36
3.1.1	Phenolextraktion und Ethanol-fällung	36
3.1.2	Reinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	36
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	36
3.1.4	DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
3.1.5	Restriktionsverdau	37
3.1.6	Ligation von DNA	37
3.1.7	Mutagenese von Punktmutationen in OPA1 pcDNA3	38
3.1.8	DNA-Sequenzierung	38
3.1.9	Einklonierung der OPA1-GTPase Mutanten in den Bakterienexpressionsvektor pet21d	38
3.1.10	Agarosegel Elektrophorese (DNA)	39
3.1.11	Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	39
3.1.12	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39
3.1.13	SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.1.14	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)	40
3.1.15	Expression und Aufreinigung von OPA1-GTPase Varianten	41
3.1.16	GTPase Hydrolyseaktivitätsmessung	41
3.1.17	Immunocytochemie	42
3.2	Zellbiologische Methoden	43
3.2.1	Kultivierung von LCL (lymphoblastoide) Zelllinien	43
3.2.2	Kultivierung primärer MEF (Maus embryonale Fibroblasten) Zellen	44
3.2.3	Kultivierung Viral-immortalisierter MEF Zellen	44
3.2.4	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	45
3.2.5	Transiente Transfektion und Expression von OPA1 Varianten in Säugerzelllinien	45
3.2.6	PEG-Fusionsassay zur Verschmelzung von Zellmembranen	45
3.2.7	Mitochondrienanreicherung zur Messung der Respirationskomplex-Aktivität	46
3.2.8	Polarografische Respirationsmessung von MEF Zellen	47
3.3	Mikroskopie	48
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopie	48
3.3.2	Elektronenmikroskopie (EM)	48
3.4	Statistische Auswertung	49

4	Ergebnisse	51
4.1	Mutationen in der OPA1 GTPase-Domäne verändern die GTP-Hydrolyseaktivität	51
4.2	OPA1 in HeLa und MEF Zellen	53
4.2.1	OPA1 Lokalisation	53
4.2.2	Überexpression von OPA1 Mutationsvarianten in HeLa Zellen verkürzen die Mitochondrien	54
4.2.3	OPA1 Mutationen führen zu drastischen Veränderungen der Mitochondrienmorphologie in OPA1 ^(-/-) MEF Zellen	61
4.2.4	Fusionseigenschaften der Mitochondrien in MEF Zellen	69
4.3	OPA1 Defizienz in MEF Zellen führt zu einer Verringerung der Respirationskapazität	72
4.4	Wachstum der MEF Zellen	76
4.5	Analyse Lymphoblastoider (LCL) Zellen aus adOA Patienten	77
4.5.1	Patientenzellen besitzen eine veränderte mitochondriale Feinstruktur	78
4.5.2	LCL Zellen aus adOA Patienten zeigen keine markanten Veränderungen in den Aktivitäten der Respirationskomplexe	79
5	Diskussion	82
5.1	Mutationen in der OPA1 GTPase Domäne beeinflussen die GTP-Hydrolyseaktivität	82
5.2	Abnorme Mitochondrienmorphologie durch Überexpression von OPA1 Mutanten in HeLa und MEF Zellen	85
5.2.1	OPA1 Mutanten führen zu verkürzten Mitochondrien in HeLa Zellen	86
5.2.2	Fähigkeit der OPA1 Mutanten zur Wiederherstellung der wildtyp Mitochondrienmorphologie in OPA1 ^(-/-) MEF Zellen (MEF_ko)	90
5.3	MEF_ko Zellen sind Respirationsdefizient	93
5.4	Beeinflussung der Cristaestrukturen, aber nicht der Respirationsaktivität in Lymphoblastoiden Patientenzellen	94
5.4.1	Deformierte Cristaemorphologie in adOA Patienten LCL	94
5.4.2	Normale Respirationskapazität in Lymphoblastoiden Patientenzellen	94
6	Ausblick	96
	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	A
	Lebenslauf	B
	Eidesstattliche Erklärung	D

Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
AIF	Apoptose Induktionsfaktor
AP	Alkalische Phosphatase
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
Cyt C	Cytochrom C
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DH	Dehydrogenase
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphate
EM	Elektronenmikroskopie
FADH	Flavin-adenin-dinucleotid-hydrogenase
z.B.	zum Beispiel
g	Gramm
GED	GTPase Effektor Domäne
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IMM	Innere mitochondriale Membran
IMS	Intermembraner Raum in Mitochondrien
kb	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LHON	Leber's Hereditary Optik Neuropathie
MEFs	Maus Embryonale Fibroblastenzellen
MEGS	mitochondriales Energie-Generierungssystem
Mfn	Mitofusin

min	Minute
MPP	mitochondriale Prozessierungs- Peptidase
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamid-adeninedinucleotide-hydrogenase
Nr.	Nummer
OMM	Äußere mitochondriale Membran
OPA1	optische Atrophie 1
ORF	Offener Leserahmen
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PTP	Permeabilitätspore
PDH _c	Pyruvat Dehydrogenase Komplex
RGC	Retinale Ganglienzellen
ROS	Radikale Sauerstoffverbindungen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
U	Unit; Enzymaktivität : 1 U = Umsatz von 1 µmol Substrat pro min
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
V	Volt
VDAC	Volt-abhängige Anionen-Selektive Kanäle

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Die eukaryontische Zelle ist in verschiedene Zellkompartimente unterteilt, die unterschiedliche zelluläre Prozesse räumlich voneinander abtrennen. Die einzelnen Kompartimente sind von Lipidmembranen umgeben. Man unterscheidet Kompartimente, die von einer einfachen Membran umgeben sind (wie z.B. Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Peroxisomen und Lysosomen), und solche, die einen komplexeren Aufbau besitzen (z.B. Zellkern, Mitochondrien oder Chloroplasten).

Die evolutionäre Herkunft der Mitochondrien wird heute in der Endosymbiose zwischen prokaryotischen Zellen und α -Proteobakterien gesehen, die während der Erhöhung des Sauerstoffgehaltes der Erdatmosphäre vor ca. 2 Billionen Jahren eingegangen wurde (Kurland und Andersson, 2000). Aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs besitzen Mitochondrien ihre eigene ringförmige DNA (mtDNA) und eine Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Proteine, welche auf der mtDNA kodiert sind, können von den Mitochondrien selbst synthetisiert werden. Der prozentuale Anteil der von den Mitochondrien selbst synthetisierten Proteine ist jedoch gering und beträgt beispielsweise in *S. cerevisiae* nur ca. 1%. Die restlichen in den Mitochondrien lokalisierten Proteine sind kernkodiert (nDNA) und werden post-translational mit Hilfe verschiedener Translokalisationsmechanismen aus dem Zytosol in die Mitochondrien importiert (Neupert, 1997). Die mtDNA wurde 1963 entdeckt (Nass *et al.*, 1963) und liegt in der Matrix in unterschiedlich hoher Kopienzahl vor. Eine Kopie der mtDNA setzt sich im Menschen aus 16.569 Basenpaaren zusammen und kodiert für 13 mitochondrial Proteine, die 12S und 16S rRNAs sowie 22 tRNAs. Unter anderem liegen die Gene der Untereinheiten der Respirationskomplexe für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in der mtDNA vor, ausgenommen der nukleär kodierte Komplex II (Succinat-Dehydrogenase). Der Begriff Mitochondrion, der sich aus dem Griechischen ableitet und übersetzt „Fadenkörperchen“ bedeutet (*mitos*, griech. Faden; *chondros*, griech. Korn), wurde zum ersten Mal 1898 von C. Benda verwendet, als er lichtmikroskopische Beobachtungen intrazellulärer Strukturen beschrieb. Mitochondrien können bei der Zellteilung nicht *de novo* entstehen, sondern vermehren sich durch Teilung (Fission). Sie besitzen, abhängig vom Zelltyp, unterschiedliche Maße; im Durchschnitt einen Durchmesser von ca. 0,5-1 μ m und eine Länge von 0,5-10 μ m.

Mitochondrien sind an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt, doch ihre Hauptaufgabe ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Hierzu nutzen sie die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), die von den Atmungskettenenzymen (Komplex I-V) katalysiert wird und zum mito-

chondrialen Energiegenerierungssystem (MEGS) gehört. Zu den MEGS zählen nicht nur die OXPHOS Komplexe, sondern auch der Pyruvat Dehydrogenase Komplex, Citratzyklusenzyme und mitochondriale Transportproteine, wie ANT (Adenin Nukleotid Translokator). Das gesamte System ist zur effizienten Energiegewinnung in der Zelle notwendig. Störungen in einem Teil des Systems können zu krankhaften Veränderungen führen (Jansson, 2007). Des Weiteren sind die Mitochondrien am Citratzyklus, Fettsäureabbau, Harnstoffzyklus, Kalziumhomeostasis, Biosynthese von Aminosäuren, Assemblierung von prosthetischen Eisen/Schwefel-Gruppen, bei Schritten der Synthese der Pyrimidine, der Nukleotide (nt) und von Phospholipiden beteiligt (Scheffler, 2001). Außerdem nehmen die Mitochondrien eine zentrale Rolle während der Apoptose und Zellalterung ein. Dabei wurde die Bedeutung der Morphologie und Dynamik der Mitochondrien in der Regulierung dieser zentralen zellulären Prozesse erst seit kurzem erkannt.

1.1.1 Morphologie der Mitochondrien

Mitochondrien sind von zwei Membranen umgeben: der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) und inneren mitochondrialen Membran (IMM). Die Zusammensetzung der Mitochondrienmembranen unterscheidet sich deutlich von der Zytoplasmamembran durch das hohe Protein-Phospholipid Verhältnis. In der OMM beträgt das Verhältnis ungefähr 50%:50%, in der IMM 80% Protein zu 20% Phospholipid. Das Cardiolipin, das nur in Bakterien- und Mitochondrienmembranen vorkommt, liegt in erhöhter Konzentration in den Arealen vor, in denen sich OMM und IMM sehr nahe kommen. Die Membranen unterteilen das Mitochondrium in drei Kompartimente: 1. den Intermembranraum (IMS), zwischen OMM und IMM, 2. die Matrix, die von der IMM umhüllt wird (siehe Abb.1) und 3. die Cristae, die aus den Einstülpungen der IMM in die Matrix entstehen. Der IMS wird somit durch die Cristae in physiologisch unterschiedliche Kompartimente unterteilt (Frey und Mannella, 2000). Die innere Grenzschicht enthält eine Reihe von Transportproteinen, welche jene Moleküle durch die Membran leiten, die in der Matrix verstoffwechselt werden sollen. Die IMM nähert sich an einigen Stellen räumlich stark an und bildet Cristae Junctions. Die Oberflächenvergrößerung der IMM durch die Ausbildung der Cristae dient der ATP Produktion, da die Proteine der Atmungskette (OXPHOS Komplexe) für die oxidative Phosphorylierung in der IMM lokalisiert sind. Daher ist die Anzahl an Cristae in Mitochondrien einer Herzmuskelzelle beispielsweise dreimal höher als bei den Mitochondrien einer Leberzelle, die weniger Energie benötigt (Alberts *et al.*, 1997).

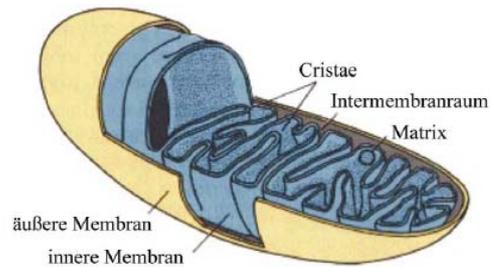


Abb. 1: Modell der Mitochondrien (Palade, 1952). Die äußere Mitochondriemembran (OMM) umschließt das Mitochondrium. Die innere Mitochondriemembran (IMM) bildet Cristae genannte Einstülpungen, in der die OXPHOS Proteine sitzen. Die IMM umschließt die Matrix, in der der Citratzyklus stattfindet.

1.1.2 Funktion im Energiestoffwechsel

Mitochondrien nehmen eine zentrale Stellung im Energiestoffwechsel der Zelle ein. In der IMM sind die Enzymkomplexe der Atmungskette lokalisiert, ebenso sind sie involviert in die Fettsäureoxidation und in den Citratzyklus.

Der Komplex I (NADH-Dehydrogenase) ist mit 980 kDa der größte Komplex. Bisher wurden 45 Untereinheiten identifiziert, von denen 38 nukleär (nDNA) kodiert sind (Caroll *et al.*, 2006). Ein Drittel der Patienten, die an Krankheiten des OXPHOS Systems leiden, zeigen eine Komplex I Defizienz. Der Komplex II (Succinat-Dehydrogenase), mit einer Masse von ca. 130 kDa, besteht aus 4 Untereinheiten, die alle in der nDNA kodiert sind. Der Komplex II ist sowohl am Citratzyklus als auch an der Respirationskette beteiligt. Mutationen kommen im Komplex II nur selten vor. So wurden bisher nur fünf Mutationen beschrieben, die zur Komplex II Defizienz führen. Der Komplex III (Cytochrom C Reduktase) mit einer relativen Masse von 500 kDa besteht aus 11 Untereinheiten, wovon eine von der mtDNA (cyt b) kodiert wird. Patienten mit einer ausschließlichen Komplex III Defizienz sind sehr selten. Es wurden 22 Mutationen im cyt b Gen auf der mtDNA gefunden (MITOMAP, 2005), aber nur eine Mutation in einem nDNA kodiertem Gen. In Genen für Proteine, die für die Zusammensetzung des Komplex III notwendig sind, wurden 2 Mutationen gefunden, die zu einer Komplex III Defizienz führten (De Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *at al.*, 2003). Der Komplex IV (Cytochrom C Oxidase) ist ca. 200 kDa groß und besitzt 13 Untereinheiten, wovon 10 nukleär (nDNA) kodiert sind. Neben 47 Mutationen in Genen des Komplexes IV in der mtDNA (MITOMAP, 2005) wurde keine Mutation in den kernkodierten Untereinheiten gefunden. Einige Mutationen wurden in Proteinen kodiert, die für die Komplexassemblierung zuständig sind. Der Komplex V (ATP Synthase) mit einer relativen Masse von 600 kDa besteht aus 14 Untereinheiten, davon sind 12 nukleär kodiert. Auch für Gene des Komplexes V wurden nur Mutationen in der mtDNA, jedoch keine in der nDNA gefunden. Neben den OXPHOS Komplexen sind noch eine Vielzahl weiterer Proteine in das mitochondriale

Energie-Generierungssystem (MEGS) zur ATP Produktion einbezogen: Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (PDH_c), mitochondriale Transport und Assemblierungsproteine, etc. Am Anfang des MEGS steht die Acetyl-CoA Produktion durch die Oxidation von Pyruvat (PDH_c) oder β -Oxidation von Fettsäuren. Im Citratzyklus entsteht in mehreren Schritten durch Oxidation von Acetyl-CoA CO₂ und die Reduktionsäquivalente NADH/H⁺ und FADH₂. Die mitochondriale Atmungskette katalysiert die Oxidation der Reduktionsäquivalente, transportiert die gewonnenen Elektronen zu dem letztlichen Elektronenakzeptor O₂ bei gleichzeitigem Pumpen von Protonen aus der Matrix in den IMS (elektrochemischer Protonengradient; Mitchell, 1961). Die Reduktion von O₂ zu H₂O wird vom Komplex IV katalysiert. In der nativen Membran vervollständigen die beweglichen Elektronen-Carrier Ubichinon und Cytochrom C die Elektronen-Transportkette, indem sie zwischen den Enzymkomplexen pendeln. Der Protonengradient treibt die ATP-Synthase (Komplex V) in der IMM an, indem sie die freiwerdende chemie-osmotische Energie dazu nutzt, anorganische Phosphate auf ADP zu übertragen. Durch die ATP-Synthase fließen die Protonen zurück in die Matrix. Das in dieser Reaktion synthetisierte ATP stellt die wichtigste Speicher- und transportierbare Energieform für die Zelle dar.

1.1.3 Funktion während der Apoptose

Erst in jüngerer Zeit ist die zentrale Rolle der Mitochondrien in der Regulation und Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) erkannt worden (Kroemer, 1998). Im Gegensatz zur Nekrose (provozierter Zelltod), die meist durch eine Schädigung der Zelle von außen verursacht wird und zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe führt, kommt es bei der Apoptose zu keiner Entzündungsreaktion und zu keiner Schädigung des angrenzenden Gewebes.

Apoptose

- Intakte Plasmamembran
- Phosphatidylserin translokiert an die Zytoplasmamembranoberfläche
- Keine oder nur schwache Entzündung
- Zelluläre Enzyme führen zu typischen biochemischen und morphologischen Reaktionen, wie DNA Verdau, mitochondriale Fragmentierung und Öffnung der OMM
- Freisetzung von apoptogenen Faktoren (AIF; Cytochrom C; Endonuklease G; etc.)
- Selektive Proteindegradierung durch spezifische Proteasen (Caspasen)
- Zellschrumpfung

Primäre Nekrose

- Pathologisch
- Zerstörte Plasmamembran, frühes Austreten von Cytoplasma
- Entzündung
- Biochemische und morphologische Veränderungen, wie Anschwellen von Mitochondrien und der gesamten Zellen

Sekundäre Nekrose

- Zytolyse von apoptotischen Zellen, beim Ausbleiben der Phagozytose

Tab. 1: Eigenschaften im Verlauf von Apoptose und Nekrose. OMM: äußere Mitochondrienmembran; AIF: Apoptose Induktions Faktor;

Die Apoptose ist u.a. ein wichtiges Funktionselement bei der Strukturbildung innerhalb der Embryonalentwicklung (Jacobson *et al.*, 1997). Bei der Regulation der Apoptose unterscheidet man zwischen einem extrinsischen und intrinsischen Weg (Abb.2). Welcher der beiden Signaltransduktionswege tatsächlich wirksam wird, hängt neben dem apoptotischen Stimulus auch von dem jeweiligen Zelltyp ab.

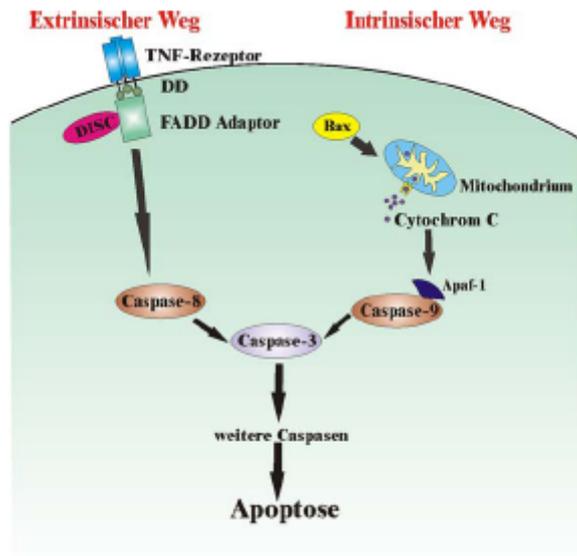


Abb. 2: Überblick über den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg.

Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Rezeptoren wie z.B. der TNF-Rezeptor (Tumor Nekrose Faktor) leiten apoptotische Signale in die Zelle weiter und führen zur Aktivierung einer Kaskade sich autokatalytisch spaltender Caspasen. Aktive TNF-Rezeptoren formen einen membrangebundenen Signalkomplex, welcher aus den zytoplasmatisch gelegenen DD (Todes Domänen), den Rezeptoren und den Adaptermolekülen FADD (Fas assoziierte Todes Domänen) besteht. Dieser Komplex rekrutiert durch die Adapterproteine FADD mehrere Procaspase 8 Moleküle. Caspasen gehören zur Familie von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Sie spalten Peptidbindungen C-terminal von Aspartat, daher ihr Name (Cysteinyl-Aspartat-spaltende Proteasen). Es wird zwischen Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden. Erstere spalten die Vorläuferformen nachgeschalteter Effektorcaspasen.

Der intrinsische Apoptoseweg wird über endogene Signale eingeleitet. Es kommt dabei zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Die zur Permeabilisierung der Membran führenden Mechanismen sind vielfältig. Zum einen bilden Proteine der Bcl-2 Familie (z.B. Bax und Bak) durch Oligomerisierung einen Kanal in der äußeren Membran (MOMP). Zum anderen kann eine Permeabilitätspore (PTP) gebildet werden, die aus dem spannungsabhängigen Anionen-Kanal (VDAC), Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) und Cyclophilin D besteht. Diese

Permeabilitätspore führt zu einer Öffnung der inneren und äußeren Membran (Green und Kroemer, 2004). Durch die Permeabilisierung der Membran werden proapoptotische Proteine (z.B. Smac/Diablo, AIF, Cytochrom C) aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt (Luo *et al.*, 1998). Das freie Cytochrom C bildet zusammen mit dem Apaf-1 (Apoptotischer Protease Aktivierungs- Faktor) und Pro-Caspase-9 das Apoptosom, welches zur Aktivierung von Caspasen führt, die wie bei dem extrinsischen Apoptoseweg den Zelltod herbeiführen.

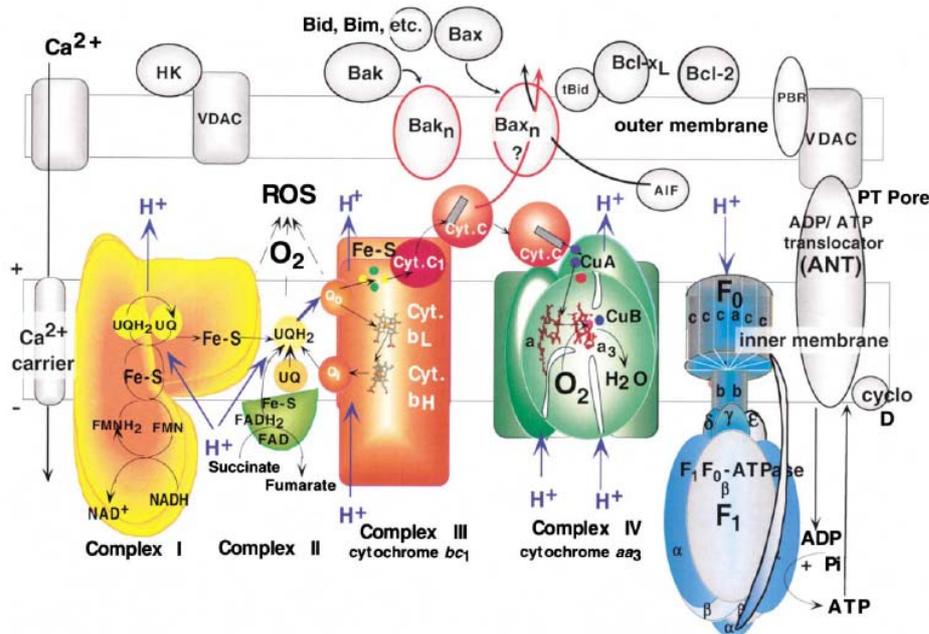


Abb. 3: Die mitochondriale Respirationskette im Zusammenhang mit Apoptose. In der IMM liegen die vier Komplexe der Respirationskette: Komplex I (gelb), -II (hellgrün), -III (braun), -IV (dunkelgrün). Angegeben sind außerdem die Substrate, Kofaktoren sowie Elektronenfluss (schwarze Pfeile). Der Protonenweg ist in den Aufbau des Membranpotentials involviert (blaue Pfeile und Schrift). Das Membranpotential wird vom Komplex V, der ATP Synthase (blau), genutzt, um die ATP Synthase anzutreiben. Radikale Sauerstoffverbindungen (ROS) entstehen bei Prozessen des Komplexes I und III, ebenso wie Ubiquinol (UQH₂). In der OMM interagiert die Proteinpore VDAC (Volt-abhängiger Anionenkanal) mit verschiedenen zytosolischen und mitochondrialen Proteinen sowie dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT). Durch diese Interaktionen bildet sich die Permeabilitätspore (PTP) aus, die zusammen mit dem Verlust des Membranpotentials während der Apoptose beobachtet werden kann. UQ: Ubiquinon (oxidiertes Ubiquinol) bzw. Coenzym Q; NAD: Nicotinamidadenindinukleotid; FMN: Flavinmononukleotid bzw. Riboflavin-5'-phosphat; Fe-S: Eisensulfat Cluster; FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid; Qo & Qi: äußere und innere Quinon Bindungsseite; Cyt.bL & Cyt. bH: Cytochrom b mit niedrigem und hohem Potential; Cyt.c1 & Cyt.c: Cytochrom C1 und C; CuA und CuB: Kupfer Seite A & B; a, a₃: Häm a & a₃; Fo & F1: membranständige und katalytische Matrix-ständige ATP Synthase Domänen; cyclo-D: Cyclophilin D; PBR: peripheraler Benzodiazepin Rezeptor; HK: Hexokinase; Baxn & Bagn: oligomerisiertes, in der OMM inseriertes Bax und Bak. (aus Newmeyer *et al.*, 2003).

Die Schnittstelle beider Signaltransduktionswege liegt in der Aktivierung der Caspase-3. Eine Interaktion zwischen den beiden Signaltransduktionswegen ist ebenfalls möglich. Der intrinsische Weg kann z.B. durch DNA-Schädigung, ROS Produktion oder hohe Ca²⁺-Konzentration

induziert werden (Newmeyer *et al.*, 2003). Mitochondrien bilden somit ein äußerst wichtiges Entscheidungszentrum für den Ablauf der intrinsischen Apoptose (Kroemer und Reed, 2000). Insbesondere die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen ist dabei ein wichtiger Parameter für die Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges.

1.1.4 Mitochondriale Dynamik

Obwohl die interne Struktur der Mitochondrien stark konserviert ist, kann ihre äußere Gestalt von Zelltyp zu Zelltyp stark variieren. Die Veränderung der Mitochondrienmorphologie stellt eine Reaktion auf externe und interne Signale der Zelle dar (z.B. Energiestatus, Apoptose). Die Vielfalt der Formen reicht von kleinen, kugelförmigen (vesikulären) Organellen bis hin zu lang gestreckten (tubulären), netzartigen Mitochondrien (Bereiter-Hahn und Voth, 1994). Die in den meisten Zelltypen auftretenden mitochondrialen Erscheinungsformen sind hoch dynamisch und komplex. Sie werden von kontinuierlichen Teilungs- und Verschmelzungsereignissen bestimmt (Abb.4, Abb.5). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Mitochondrienmorphologie durch ein ausgeglichenes Verhältnis von Fission und Fusion aufrechterhalten wird. Die an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine werden im Folgenden näher beschrieben.

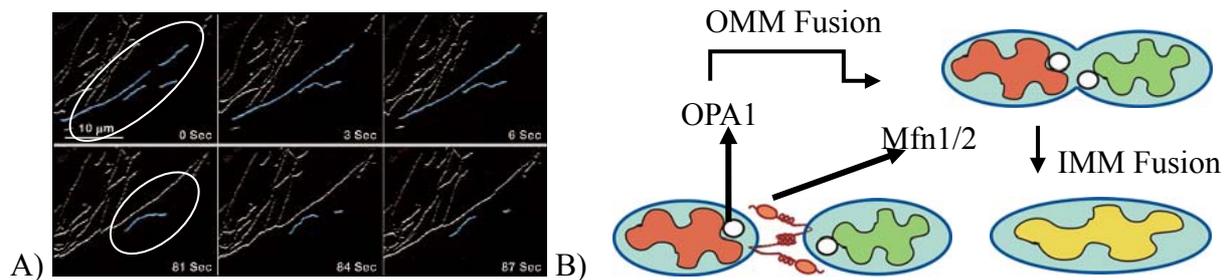


Abb. 4: Mitochondriale Fusion and Fission. A) Standbilder von Zeitschaltaufnahmen, mit fluoreszent gefärbten Mitochondrien in lebenden Maus Fibroblasten (MEF) Zellen. Die blau markierten Mitochondrien (s. Kreise) der oberen Reihe zeigen einen Fusionsvorgang, während die untere Reihe eine Fissions- (Teilungs-) Vorgang zeigt (aus Chen *et al.*, 2003). B) In Säugern erfolgt zuerst das Andocken und Annähern benachbarter Mitochondrien über Mfn1/Mfn2, wonach die OMM - und dann die IMM Fusion folgt. OMM: äußere Mitochondrienmembran; IMM: innere Mitochondrienmembran

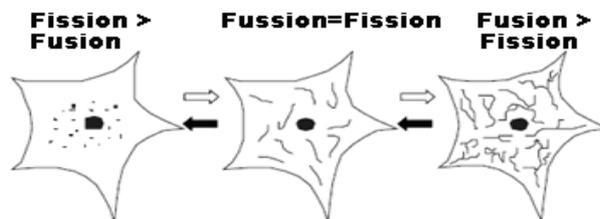


Abb. 5: Das mitochondriale Netzwerk wird durch ausbalancierte Fusions- (Verschmelzungs-) und Fissions- (Teilungs-) Ereignisse gebildet. Bei überwiegender Fission entstehen vesikuläre, bei überwiegender Fusion hochgradig vernetzte, tubuläre Mitochondrien. In Balance sind die Mitochondrien oft tubulär, einfach vernetzt.

Die Morphologie der Mitochondrien ergibt sich aus dem Gleichgewicht von Teilung (Fission) und Fusion der einzelnen Mitochondrien. Der Verlust von Proteinen, die an der mitochondrialen Teilung (Fission) beteiligt sind, führt zur Bildung von zusammenhängenden (tubulären), netzartigen Organellen. Der Phänotyp ergibt sich aus dem Fortschreiten der Fusionsvorgänge, während die Fission unterbunden ist. Wird die Fusion in den Mitochondrien inhibiert, kommt es zunehmend zur Fragmentierung der Mitochondrien.

Humanes Protein	<i>S. cerevisiae</i> Homolog	Lokalisierung	Funktion
OPA1	Mgm1	IMS, assoziierte an IMM	Fusion
Mfn1, Mfn2	Fzo1	integriert in OMM	Fusion
	Ugo1	integriert in OMM	Fusion
Drp1	Dnm1	Zytosol, assoziiert an OMM	Fission
hFis	Fis	integriert in OMM	Fission
	Mdv1	Zytosol, assoziiert an OMM	Fission
	Caf4	Zytosol, assoziiert an OMM	Fission

Tab. 2: Proteine, die die mitochondriale Dynamik beeinflussen. IMM: innere Mitochondrienmembran; OMM: äußere Mitochondrienmembran

1.1.4.1 Mitochondriale Fusion

Bei der mitochondrialen Fusion müssen sowohl die OMM als auch die IMM, die ein Membranpotential besitzt, von zwei benachbarten Mitochondrien verschmelzen, und damit die Fusion von vier Lipiddoppelschichten koordiniert werden. *In vitro* Experimente in Hefen haben gezeigt, dass die Fusion der OMM und IMM unabhängig voneinander verlaufen können (Meeusen *et al.*, 2004). So benötigt die IMM Fusion eine ausreichende GTP Konzentration und ein elektrisches Potential (Malka *et al.*, 2005).

Für die Fusion wird an der OMM Mitofusin (Mfn) benötigt, das die einzige in Säugern bekannte GTPase an der OMM darstellt (Chen *et al.*, 2003; Santel und Fuller, 2001). Die Mitofusine benachbarter Mitochondrien gehen eine *trans*-Interaktion miteinander ein und bringen so die Mitochondrien in die für die Fusion benötigte physikalische Nähe (Koshiba *et al.*, 2004). Zellen, denen Mfn1 oder Mfn2 fehlt, zeigen fragmentierte Mitochondrien und damit einhergehend den Verlust an Fusionsereignissen und der Mitochondrien Funktion. Hierbei können sich Mfn1 und Mfn2 gegenseitig funktional ersetzen. Beim Fehlen beider Varianten wird jedes Fusionsereignis verhindert (Chen *et al.*, 2005). Trotz Funktionsähnlichkeiten unterscheiden sich Mfn1 und Mfn2. So erlangt Mfn1 eine höhere GTPase Aktivität und bindet Mitochondrien enger aneinander (Ishihara *et al.*, 2004), wohingegen Mutationen in Mfn2 zu Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A führen (Züchner *et al.*, 2004). Über OPA1 RNAi Experimente zur Herunterregulierung der OPA1 Expression konnte erkannt werden, dass OPA1 für die IMM Fusion notwendig ist (Chen *et*

al., 2005). Derart behandelte Zellen zeigten fragmentierte Mitochondrien mit deutlich veränderter Cristastruktur (Griparic *et al.*, 2004). Bisher konnte die Funktionsweise nicht eindeutig geklärt werden, da die Überexpression von wildtyp OPA1 abhängig vom Zellsystem sowohl zur Fragmentierung als auch zur Tubulierung führen kann (Cipolat *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2007). Bislang ungeklärt ist die genaue Funktion der einzelnen OPA1 Domänen, insbesondere der GTPase und der zwei coiled-coil (CC) Domänen.

Für OPA1 liegt eine sehr hohe Sequenzidentität von 88% auf Nukleotidebene und 97% auf Aminosäureebene zwischen Mensch und Maus vor (Delettre *et al.*, 2003). Das *Saccharomyces cerevisiae* Ortholog Mgm1 weist eine 31%-ige Homologie auf. Die mitochondriale Fusion ist bisher in Hefe am weitesten erforscht. Dort fand man die drei Schlüsselproteine für die Fusion: Mgm1 (Ortholog von OPA1), Fzo1 (Ortholog von Mfn1/2) und Ugo1, für den kein orthologes Säugerprotein identifiziert werden konnte. Mgm1 und Fzo1 sind essentiell für die Fusionskompetenz von Hefemitochondrien. Dabei erfolgt die Fusion durch Bildung eines Fusionskomplexes. Dabei bindet Ugo1 C-terminal Mgm1 und N-terminal Fzo1, so dass Ugo1 als Verbindungsprotein zwischen OMM und IMM und damit wohl der Koordinierung dient (Sesaki und Jensen, 2004).

Die Deletion von Mgm1 in Hefen führt neben der mitochondrialen Fragmentierung auch zu aufgequollenen, rudimentären Cristae (Sesaki *et al.*, 2003). Für eine effektive Fusion muss Mgm1 von der Rhomboidprotease Rbd1p in der IMM prozessiert werden, so dass L-Mgm1 (lange Form) und S-Mgm1 (kurze Form) vorliegt. Auch OPA1 unterläuft eine *post*-translationale Prozessierung. Als mögliche Prozessierungsenzyme wurden das humane Rhomboid Ortholog PARL und die Protease Yme1 identifiziert (Cipolat *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). In OPA1 defizienten Zellen konnte nachgewiesen werden, dass nur vier Isoformen nach der Prozessierung sowohl in einer langen und kurzen OPA1 Form vorliegen (L-OPA1+S-OPA1). Nur die Kombination aus beiden Formen ermöglicht eine effektive Fusion von Mitochondrien. Aus den Isoformen 1, -2, -4, -7 können die OPA1 L- und S-Form entstehen (Song *et al.*, 2007).

1.1.4.2 Mitochondriale Fission

Da Mitochondrien nicht *de novo* entstehen können, müssen sie bei der Vererbung auf die Tochterzellen durch die Fission gleichmäßig verteilt werden. Bei der Fission spielt das Dynamin verwandte Protein Drp1 eine Hauptrolle. Es gehört zu der Familie der dynamin-ähnlichen GTPasen, welche GTP binden und dieses hydrolysieren (Fukushima *et al.*, 2001). Sowohl in Hefe als auch in humanen Zellen wurde gezeigt, dass Mutationen in der GTPase Domäne oder Transfektionen mit dominant negativem Drp1 (Drp1^{K38A}) sich in einer verminderten Fissionsaktivität widerspiegeln. Der Ablauf der mitochondrialen Teilung ähnelt sehr der Abschnürung von Vesikeln wie sie

z.B. aus der Endozytose und Sekretion bekannt ist. Dort oligomerisieren die beteiligten Dynamine zu Ringen und Helices (Sweitzer und Hinshaw 1998, Warnock *et al.*, 1996).

Ein weiteres Schlüsselprotein bei der mitochondrialen Fission ist das Fis1 Protein. Es liegt gleichmäßig über die OMM verteilt vor. Der C-Terminus von Fis1 ragt in den IMS, während der N-terminale Abschnitt ins Zytoplasma zeigt (Mozdy *et al.*, 2000). Bei der Herunterregulierung der Expression von Drp1 oder Fis1 wird die Fission inhibiert, so dass die Tubulierung von Mitochondrien erfolgt (Lee *et al.*, 2004). In Hefen bindet das Dnm1 (Ortholog von Drp1) das Fis1 an der OMM, was von den zwei Adapterproteinen Mdv1 und Caf4 unterstützt wird (Mozdy *et al.*, 2000; Griffin *et al.*, 2005). Das an zukünftige Abschnürungsstellen an der OMM rekrutierte Drp1 oligomerisiert, wodurch die GTPase Aktivität stimuliert wird (Warnock *et al.*, 1996). Anschließend wird vermutet, dass die Oligomere sich spiralförmig um die OMM winden und die Mitochondrien so abschnüren (Ingeman *et al.*, 2005; Cervený *et al.*, 2007a). Wahrscheinlich induziert die Hydrolyse von GTP eine Konformationsänderung der Spirale, die zur Trennung der Stränge führt (Fukushima *et al.*, 2001).

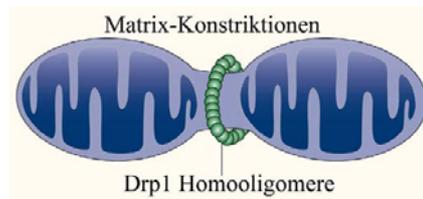


Abb. 6: Ausbildung von Matrixkonstruktionen Die Ausbildung von Einschnürungen (Matrix-Konstriktionen) ist einer der ersten Schritte bei der mitochondrialen Zerteilung. Dabei lagert sich Drp1 in Clustern an die OMM, bildet Homooligomere, die dann zu spiralförmigen Abschnürungen führen (Youle und Karbowski, 2005).

Neuere Studien, die sich u.a. mit dem Zellzyklus beschäftigten, wiesen den Einfluss der Phosphorylierung innerhalb der GED (GTPase Effektor Domäne) auf die Drp1-Aktivität nach. So kann die CyclinB-Cyclin abhängige Kinase die mitochondriale Fragmentierung durch erhöhte Drp1 Aktivität fördern, während die zyklische AMP- abhängige Kinase die Inhibierung der GTPase Domäne hervorruft. Des Weiteren wurde Drp1 auch im Zusammenhang mit der Fission während der Apoptose durch die Bax/Bak-abhängige Sumoylierung gebracht (Wasiak *et al.*, 2007). Neu Erkenntnisse zeigen eine Regulierung der Bindung von Drp1 an die OMM mittels Ubiquitinierung (Karbowski *et al.*, 2007) und durch das Protein Num1p (Cervený *et al.*, 2007b). Die genaueren Wirkmechanismen bedürfen jedoch noch weitergehender Forschung.

Das einzige bekannte Protein, welches bei der Fission der IMM involviert ist, wurde in Hefe entdeckt und als Mdm33 bezeichnet (Messerschmitt *et al.*, 2003). Zellen, denen das Mdm33-Protein fehlt, enthalten ringähnliche miteinander verbundene Mitochondrien, welche große Hohl-

kugeln ausbilden können. Diese Organellen weisen extrem auseinander gezogene Abschnitte der Außen- und Innenmembran auf, die einen sehr schmalen Matrixspalt umschließen.

1.2 Mitochondriale und neurodegenerative Erkrankungen

Im Hinblick auf den Alterungsprozess der Zelle als auch bei Neurodegenerationsprozessen steht durch ihren hohen Energiebedarf insbesondere das Mitochondrium im Mittelpunkt. Da die Nukleotide der mtDNA den membranassoziierten Atmungskettenkomponenten nah benachbart sind, unterliegen sie durch die bei der OXPHOS entstehenden freien Radikale einer erhöhten Mutationswahrscheinlichkeit. Das Mutationsrisiko wird in den Mitochondrien durch das Fehlen schützender Histone und ein nur geringeres Maß an DNA-Reparaturmechanismen verstärkt (Croteau *et al.*, 1999). Durch homologe Rekombination mit benachbarten Nukleotiden kann allerdings eine Häufung von somatischen Mutationen in den Mitochondrien verhindert werden (Nakada *et al.*, 2001; Navratil *et al.*, 2008). Hierbei stellen kontinuierliche Fusions- und Fissionsereignisse eine stetige Durchmischung der mtDNA sicher und können so mutationsbedingte Fehlfunktionen komplementieren und sogar verhindern. Kürzlich wurde die Abnahme von OPA1 in Mitochondrien im Zusammenhang mit Zellalterung beschrieben (Navratil *et al.*, 2008).

Beim Menschen ist eine Reihe von Erkrankungen bekannt, die auf Mutationen der mtDNA zurückzuführen sind. Meist sind Gewebe mit hohem Energiebedarf betroffen, wie z. B. das Herz, die Muskeln, neuronale Systeme. In einer Zelle können sowohl Mitochondrien mit normaler mtDNA als auch mit mutierter mtDNA vorliegen (Heteroplasmie). Neben mtDNA Mutationen können auch nDNA Mutationen regulierende Proteine betreffen, z.B. Proteine zum Zusammenbau der Respirationskettenkomplexe, Elongationsfaktoren oder Proteine des Krebszyklus (Jansen, 2007). Aufgrund ihrer Schlüsselstellung im aeroben Stoffwechsel der Zelle führt eine Störung der Mitochondrienfunktion meist zu einem klinischen Mischbild mit unterschiedlich starken Schweregraden. Bei Patienten mit mitochondrialen Krankheiten treten häufig klinische Abnormalitäten auf, die zu heterogenen und oft unspezifischen Symptomaten führen. Daher wird in der Regel erst von einer mitochondrialen Erkrankung gesprochen, wenn zwei entsprechende chronische und ansonsten unerklärliche Symptome bevorzugt in unterschiedlichen Geweben auftreten (Rustin *et al.*, 1994; DiMauro *et al.*, 1999). In der Regel sind das Gehirn (Epilepsie, Ataxie, mentale Retardierung), die Muskulatur (Myopathie, Kardiomyopathie), die endokrinen Organe (Hypothyreose, Diabetes mellitus I), die Sinnesorgane (Optikus-Atrophie, Retinitis pigmentosa, Innenohrschwerhörigkeit), die Erythropoese (Anämie) und die Nieren (Niereninsuffizienz, Fanconi-Syndrom) betroffen. Bei einigen Mitochondriopathien findet man typische Symptomenkomplexe: MELAS (mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und

Schlaganfall-ähnliche Episoden), MERRF (Myoklonusepilepsie mit Ragged-Red-Fibers) und NARP (Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa).

Krankheit	Gen	Funktion
Charcot-Marie-Tooth Typ 2A (CMT2A)	Mfn2	Mitochondrien-Fusion
Charcot-Marie-Tooth Typ 4A (CMT4A)	GDAP1	Mitochondriale Dynamik (Fission?)
Autosomal dominante Optikus Atrophie (adOA)	OPA1	Mitochondrien-Fusion und Cristae Struktur
Rezessive Optikus Atrophie	OPA3	unbekannt
Leber's vererbare Optikus Neuropathie (LOHN)	ND Gene in mtDNA	Oxidative Phosphorylierung (Komplex I)
Vererbare spastische Paraplegie	Paraplegin	Mitochondriale ATPase/Protease
Vererbare spastische Paraplegie	HSP60	Mitochondriale Hitzeschockprotein
Familiäre amyotrophische laterale Sklerose	SOD1	Superoxid-dismutase
Parkinson	PINK1	Mitochondriale Serin/Threonin Kinase
Friedreich's Ataxie	Frataxin	Formation von Fe-S Clustern in den Mitochondrien

Tab. 3: Kurze Übersicht über mutierte Mitochondrienproteine, die zu neurodegenerativen Krankheiten führen.

1.3 OPA1

1.3.1 OPA1 Expression

Die OPA1 cDNA ist ca. 6031 Nukleotide lang und besteht aus 31 Exonen (Delettre *et al.*, 2001). Die cDNA kodiert für eine mitochondriale dynamin-verwandte große GTPase mit 960 Aminosäuren (As). Durch alternatives Spleißen der Exone 4, 4b, 5b entstehen acht OPA1 Isoformen, die ubiquitär im menschlichen Gewebe exprimiert werden (Alexander *et al.*, 2000).

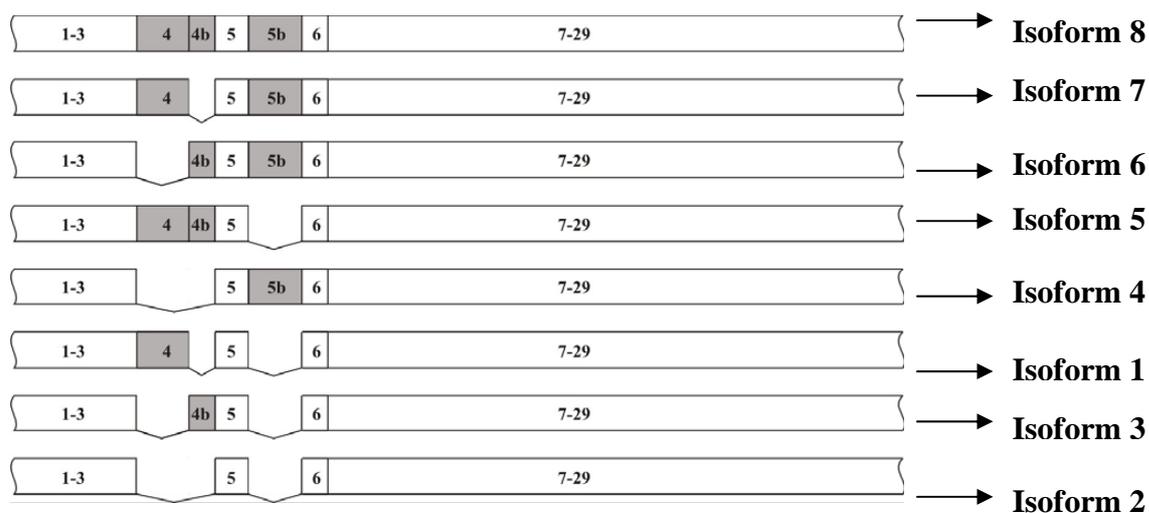


Abb. 7: Acht OPA1 Spliceformen entstehen durch alternatives Spleißen der Exone 4, 4b, 5b.

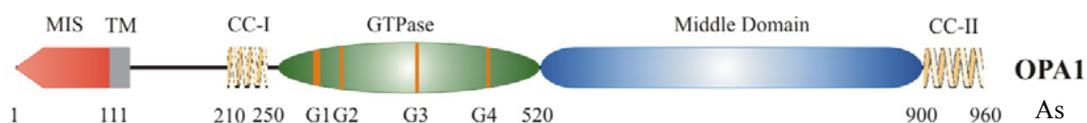
Im Gehirn dominiert die Isoform 1 (Delettre *et al.*, 2001). Das OPA1 Protein liegt nicht ausschließlich in den retinalen Ganglienzellen (RGC) vor, sondern wurde auch in der äußeren und

inneren Plexiform- sowie in der inneren nukleären Schicht in der Retina in erwachsenen Säugern nachgewiesen (Pesch *et al.*, 2004; Kamei *et al.*, 2005). Bislang wurden noch keine subzellulären Studien an Mitochondrien aus retinalen Ganglienzellen von adOA Patienten veröffentlicht. Kontroverse Ergebnisse liegen vor bezüglich der OPA1 Expression im optischen Nerv. Während bei der Maus eine hohe OPA1 Expression nachgewiesen werden konnte (Ju *et al.*, 2005), war dies in der Ratte nicht der Fall (Pesch *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte OPA1 im myelinisierten Bereich des menschlichen optischen Nerves, in dem weniger Mitochondrien als im unmyelinisierten und damit unisolierten Bereich vorliegen, nachgewiesen werden (Aijaz *et al.*, 2004).

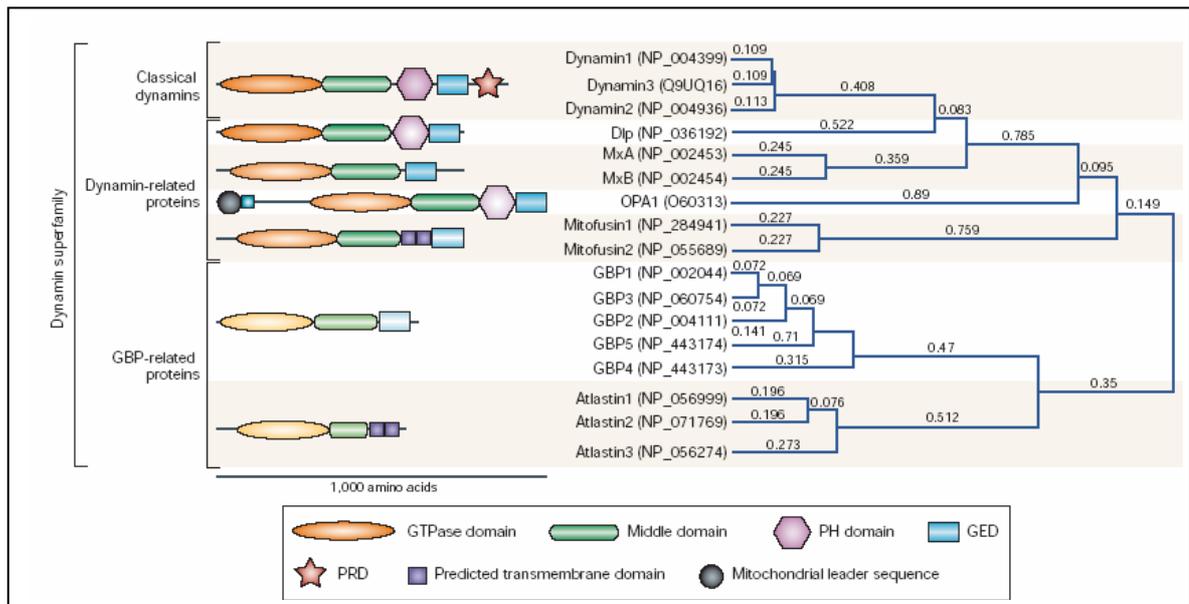
Da OPA1 ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert wird, ist bisher ungeklärt, warum hauptsächlich nur der optische Nerv betroffen ist. Auf der anderen Seite werden seit kurzem immer häufiger Veröffentlichungen von OPA1 im Zusammenhang mit anderen Krankheitsbildern wie Schädigung des Hörnerves (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Liguori *et al.*, 2008), Beeinträchtigung der Augenmotorik, makrozytischer Anämie (Ferraris *et al.*, 2008) und in β -Zellen mit einer möglichen Ausbildung von Diabetis (Twig *et al.*, 2008) beobachtet.

1.3.2 Proteinstruktur und subzelluläre Lokalisierung

Das OPA1 Protein gehört zur Unterfamilie der Dynamamin-verwandten GTPasen (DRP). Die dynamamin-verwandten GTPasen sind an Signaltransduktion, Proteinsynthese, Zelldifferenzierung und -proliferation, Regulation des vesikulären Transports und Membrantranslokation von Proteinen beteiligt. Anders als in den Dynamaminen sind in DRP keine PH (Pleckstrin Homologie) Domäne und PR (Prolin-reiche) Domäne enthalten (Praefcke und McMahon, 2004). Alle Dynamine ebenso wie Dynamamin-verwandte Proteine besitzen einen ähnlichen Aufbau (Abb.8B): eine N-terminale GTPase Domäne, eine Mitteldomäne und eine C-terminale GTPase-Effektor Domäne (GED). Die OPA1 Proteinstruktur weist zahlreiche Ähnlichkeiten mit den Dynamaminen auf: GTPase Domäne mit sequenzkonservierten GTP-Bindungsmotiven (G1-G4), Mitteldomäne und der Dynaminsignatur (Abb.8A).



A)



B)

Abb. 8: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Dynamin Superfamilie. A) Domänenstruktur des OPA1 Proteins; MIS: mitochondriale Importsequenz; TM: transmembran Domäne; CC: Coiled-coil Domäne. B) Unterschiedliche Domänen sind durch verschiedene Farben und Formen gekennzeichnet. Alle Dynamine besitzen eine GTPase Domäne (orange) zur Hydrolyse von GTP, eine Mitteldomäne (grün) und eine C-terminale GED (GTPase Effektor Domäne; blau), die in die Oligomerisierung des Proteins und damit in die Stimulierung der GTPase Aktivität involviert ist. Zusätzlich sind die meisten Dynamine im Besitz einer PH (Pleckstrin Homologie) Domäne (rosa) zur Interaktion mit Lipiden und einer PRD (Prolin-reiche Domäne; rot-braun), die zur Interaktion mit SH3 (Scr-Homologie-3) Domänen anderer Proteine dient. Die Mitglieder der humanen Dynamin Superfamilie sind gemäß ihrer Struktur gruppiert und die ID-Nummer ist angegeben. Der Familienbaum wurde mit Mac Vector Kalkuliert unter Anwendung der Aufbauemethode mit dem Poisson-korrigiertem Abstand. DLP1: Dynamin-ähnliches Protein1; GBP1: Guanylat-Bindungsprotein 1; OPA1: Opticus Atrophie 1 (aus Praefcke und McMahon, 2004).

N-terminal liegt die stark basische mitochondriale Importsequenz (MIS), die den Import des Proteins in das Mitochondrium ermöglicht. Die Sequenz wird von der MPP (mitochondrialen Prozessierungs- Peptidase) vom restlichen Protein während des Imports abgeschnitten. Im Inter-membranraum (IMS) der Mitochondrien liegt OPA1 eng assoziiert an die IMM vor (Misaka *et al.*, 2002; Olichon *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003). An die Importsequenz schließt sich eine Transmembran (TM) Domäne an. Die Dynamine binden über ihre PH Domäne Lipide, während OPA1 mit der Mitochondrienmembran über ihre Transmembran (TM) Domäne assoziiert ist. Strukturvorhersagen zeigen eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für eine CC Domäne N-terminal nach der TM Domäne (Exon 6-7; 100%) und nach der Mitteldomäne (Exon 27-28; 95%). Obwohl bislang ungeklärt blieb, ob OPA1 eine GED (GTPase Effektor Domäne) besitzt, vermutet man eine stimulierende Funktion durch die Oligomerisierung über die OPA1 CC (coiled-coil) Domänen. Diese Annahme ist u.a. deshalb nahe liegend, weil im Dynamin die CC Domäne der GED entspricht. Die Funktion der Bindungsmotive wurde insbesondere mittels Kristallstruktur

für das Dynamin DynA aus *Dictostelium discoideum* studiert (Niemann *et al.*, 2001). Das G1 Motiv, auch P-Loop genannt (GXXXXGKS/T), koordiniert das Phosphat des GTPs. Das Lysin bindet dabei nicht das β -Phosphat, sondern bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem G3 Motiv aus. Direkt vor dem G2 Motiv liegt die flexible Switch 1 Region, die durch die GTP Hydrolyse ihre Position verändern kann. Das Threonin im G2 Motiv koordiniert das Mg^{2+} im GTP gebundenen Zustand und ist in die Katalyse involviert. Die bewegliche Switch 2 Region überlappt mit dem G3 Motiv (DXXG), welche das Mg^{2+} über Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert. Hierfür entstehen im DynA Wechselwirkungen zum γ -Phosphat des GTP und vom Aspartat des G3 Motivs zum Lysin des P-Loops. Das G4 Motiv (N/TKXD) dient zur Koordinierung der Ribose und der Guanin-Base des Nukleotides GTP. Das Lysin interagiert mit dem endozyklischen Sauerstoff der Ribose und das Lysin bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Nukleotid aus. Die Funktion der C-terminal folgenden Mitteldomäne ist noch unbekannt.

1.3.3 OPA1 und autosomal dominante optische Atrophie (adOA)

Die autosomal dominante optische Atrophie (adOA; ADOA-MIM #165500), auch bekannt als Kjer's Optikusatrophie, ist mit einem Auftreten von 1:12.000 bis 1:50.000 die häufigste vererbare optische Neuropathie (Kjer *et al.*, 1996). Das für die adOA verantwortliche Gen liegt auf dem Chromosom 3q28 (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000) und wurde Opticus Atrophie Typ1 (OPA1) benannt. Als klinische Symptome treten innerhalb der ersten zwei Lebensdekaden zunehmender Verlust der Sehschärfe, Farbfeldstörungen (Blautöne; Tritanopia), Beeinträchtigungen des Gesichtsfeldes und temporale Abblassung der Papille auf (Hoyt, 1980; Votruba *et al.*, 1998).

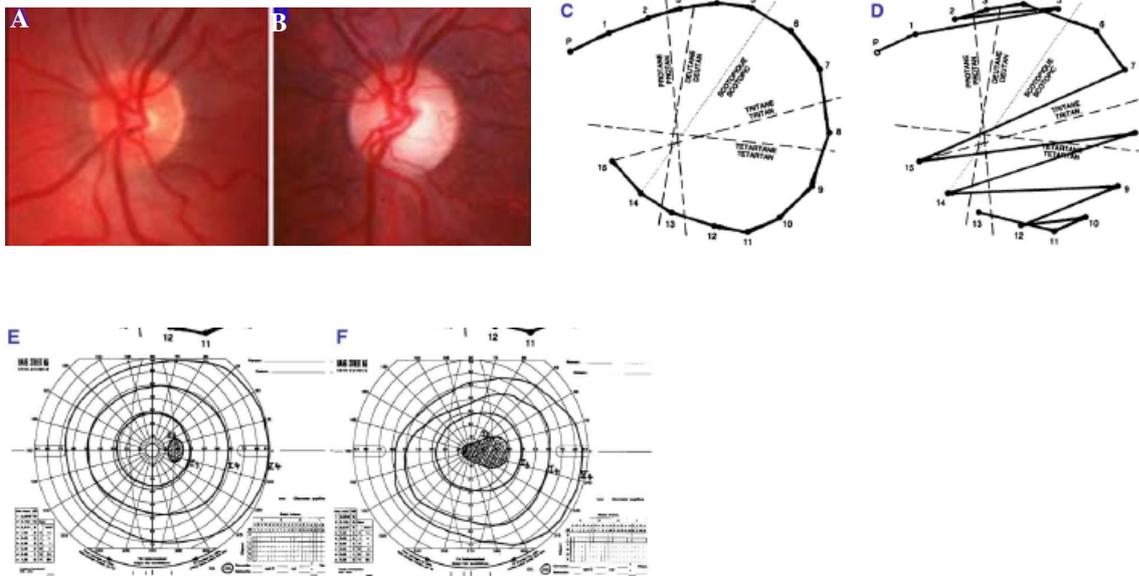
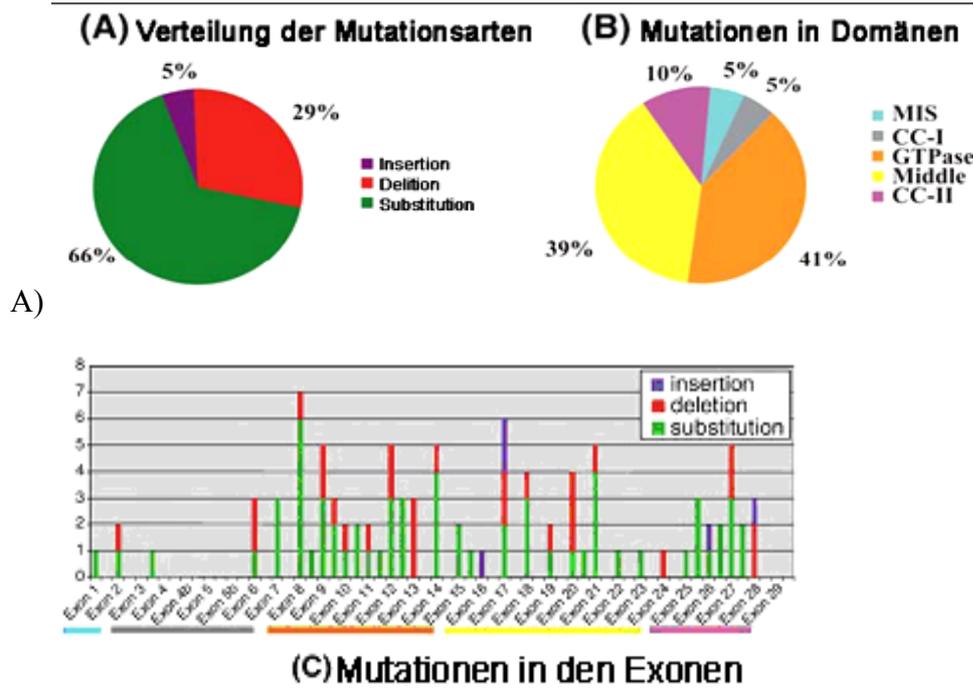


Abb. 9: Ophthalmologische Untersuchung eines adOA Patienten mit einer Mutation im OPA1 Gen (B, D, F) und einer gesunden Kontrollperson (A, C, E). A, B: Bild des Augenhintergrundes, die beim Patienten eine temporal abgeblasster Papille zeigt. C, D: Farbsehtest mittels 15-Farbtou Farnsworths Feld. Die zirkulären Linien weisen nach, dass die gesunde Kontrollperson in der Lage war harmonisch die 15 Farbtöne zu klassifizieren. Im Vergleich dazu, machte der adOA Patient eine disorganisierte Klassifizierung mit einer verwirrten blau-gelb Achse (Tritanopia). E, F: Dynamische Perimetrie unter Verwendung des Goldman Apparates. Die Vermessung des Gesichtsfeldes zeigt bei der gesunden Kontrollperson den blinden Fleck als kleinen schraffierten Bereich, während beim adOA Patienten der Fleck bis zum zentralen Gesichtsfeld (schraffierter Bereich) reicht; 3 Linien gleicher retinaler Empfindlichkeit sind dargestellt. (Olichon *et al.*, 2006a).

Dabei streuen die Symptome und deren Schweregrad inter- und intrafamiliär sehr stark und bislang ohne ersichtliche Korrelation zu Mutationsregionen (Votubra *et al.*, 1989). Über 100 Mutationen wurden in adOA Patienten mittlerweile beschrieben, wobei es sich hauptsächlich um Substitutions - Punktmutationen handelt (Abb.10; <http://lbbma.univ-angers.fr/eOPA1/>). Ungefähr die Hälfte der Mutationen führt zu einem vorzeitigen Translationsabbruch. Bei diesen Patienten geht man davon aus, dass nur noch die halbe Menge des OPA1 Proteins vorliegt und die Krankheit durch eine Haploinsuffizienz ausgelöst wird (Delettre *et al.*, 2001). Daneben existieren die Mutationen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz von OPA1 zumeist in der GTPase Domäne führen. In diesem Fall vermutet man als Ursache eine Funktionsstörung des OPA1 Proteins, das vom mutierten Allel abstammt („gain-of-function“).



B)

Abb. 10: Mutationsspektrum von OPA1. Verteilung der Mutationen im OPA1 Gen abhängig von der Mutationsart (A), der Domäne (B) und Lokalisation im Gen (C). In (B) wurden nur Mutationen im Exon berücksichtigt. Die Domänenbezeichnungen entsprechen denen aus der Abb.8B. In (C) entsprechen die Leerflächen zwischen den Exonlinien den Intronpositionen (Olichon *et al.*, 2006).

Die grundlegende Pathologie vermutet man in der Degeneration der retinalen Ganglienzellen gefolgt von der zunehmenden Atrophie des Sehnervs und Abnahme der Myelinschicht (Johnston *et al.*, 1979; Kjer *et al.*, 1983). Aggregierte Mitochondrien in Patienten Monozyten, lassen auf die Beeinflussung der mitochondrialen Dynamik und Verteilung schließen (Delettre *et al.*, 2000). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen adOA und dem Energiemetabolismus in Muskelzellen von Patienten, die eine verringerte ATP Synthese aufwiesen, beobachtet (Lodi *et al.*, 2004). In Lymphozyten von adOA Patienten wurde ein Verlust an mtDNA beschrieben (Kim *et al.*, 2005). Seit kurzem zeichnet sich zusätzlich ab, dass OPA1 Mutationen zunehmend sowohl mit Symptomen weiterer klassischer Enzephalomyopathien als auch mit anderen Erkrankungen assoziiert werden können. So wurde OPA1 im Zusammenhang mit Hörverlust (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Liguori *et al.*, 2008), Ophthalmoplegie (Ferraris *et al.*, 2008), Ptosis (Payne *et al.*, 2004), Ataxia (Amati-Bonneau *et al.*, in press; Hudson *et al.*, in press), aber auch Diabetes (Twig *et al.*, 2008) beschrieben.

1.3.4 OPA1 Funktion

In den Jahren seit Entdeckung des in adOA Patienten betroffenen OPA1 Gens (Alexander *et al.*, 2000) versucht man die Funktion des Proteins in den Zellen zu bestimmen. In Mgm1 defizienten Hefezellen und OPA1 RNAi Experimenten konnte die Relevanz von OPA1 in der Mitochondrien Dynamik nachgewiesen werden. Dabei verloren die Mitochondrien ihre Fusionskompetenz, so dass die Zellen mit fehlendem OPA1 ihre tubuläre Mitochondrienmorphologie verloren und in einer vesikulären Form resultierten (Chen *et al.*, 2005; Cipolat *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Außerdem konnte in der Feinstruktur der Mitochondrien, denen OPA1/Mgm1 fehlte, eine unorganisierte Cristaestruktur in z.T. aufgequollenen Mitochondrien festgestellt werden. Somit ist OPA1 an der Regulierung der Cristaestruktur beteiligt (Griparic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003) und könnte so in die Fusionsprozesse eingebunden sein. OPA1 kann in Mfn1 defizienten Zellen zwar die Cristaestruktur wiederherstellen, jedoch nicht die Fusionskompetenz (Frezza *et al.*, 2006). Das bedeutet, dass sowohl OPA1 als auch Mfn1 für eine vollständige Mitochondrienfusion notwendig sind. Weiterhin zeigten OPA1 defiziente Zellen auch eine eingeschränkte Respirationskapazität (Chen *et al.*, 2005). Ob es sich hierbei um einen direkten oder indirekten Effekt handelt, ist bis *dato* unerforscht geblieben. Auch in die Mitochondrienfunktion der Apoptose ist OPA1 involviert. Patientenfibroblasten gehen nach Apoptoseinduktion früher in die Apoptose als Kontrollzellen (Olichon *et al.*, 2007).

Zurzeit geht man von dem Modell aus, dass die Prozessierungsformen L-OPA1, das an die IMM assoziiert ist, und das im IMS lösliche S-OPA1 oligomerisieren. Diese Oligomere können die Weite der Cristae Junction regulieren, in deren Tasche sich ein Teil des Cytochrom C aufhält. Durch das pro-apoptotische Protein Bid werden die Oligomere zerstört, es kommt zu einer Umorganisation der Cristaestruktur und Öffnung der Cristae Junctions, so dass der Austritt von Cytochrom C in den IMS ermöglicht wird. Das nun frei vorliegende Cytochrom C kann anschließend ungehindert durch die MOMP in Zytosol austreten (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003; Frezza *et al.*, 2006). Die Mfn1-abhängige Mitochondrienfusion von OPA1 ist unabhängig von der möglichen Funktion während der Apoptose (Frezza *et al.*, 2006).

1.4 Fragestellung der Arbeit

OPA1 ist ein mitochondriales Protein, das mutiert zumeist in Patienten mit der neuroophthalmologischen Erkrankung adOA (Optikusatrophie) gefunden wird.

Da bislang der Wirkmechanismus von OPA1 nicht aufgeklärt werden konnte, ist noch offen, auf welche der mitochondrialen Funktionen OPA1 einen direkten oder indirekten Einfluss hat. Das Verständnis der Funktion der einzelnen OPA1 Proteindomänen kann dabei einen wertvollen Beitrag zur Erschließung des OPA1 Wirkmechanismus leisten. Die Aufklärung der Domänenfunktion könnte u.a. Aufschluss geben, warum bislang eine Korrelation von Mutationsort zu Schweregrad der adOA Symptomatik fehlt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, in wie weit Mutationen die Funktion der GTPase Domäne des OPA1 Proteins beeinträchtigen. Dabei soll u.a. geprüft werden, ob eine Korrelation der GTPase Aktivität auf die OPA1 Funktion, sowie dem zellulären Phänotyp besteht. Hierfür sollen Patienten-relevante OPA1 GTPase Mutanten biochemisch auf Veränderungen in ihrer GTPase Hydrolyseaktivität untersucht werden. Anschließend sollen zellbiologische Analysen der OPA1 Mutanten in HeLa- und OPA1^(-/-) MEF Zellen, wie auch in adOA Patienten-Lymphozyten durchgeführt werden. Die Auswirkungen auf die Mitochondrienmorphologie müssen dabei qualitativ und quantitativ analysiert werden. Zunächst erfolgt die Analyse in HeLa und OPA1^(-/-) MEF Zellen, die durch transiente Transfektion OPA1 Mutanten exprimieren. Im Anschluss wird die Veränderung der Mitochondrienmorphologie in den Lymphozytenzellen aus adOA Patient bestimmt. Zusätzlich soll in den Patientenlymphozyten die Respirationskapazität überprüft werden. Die gesammelten Daten zur Auswirkung der OPA1 GTPase Mutanten auf die gemessenen GTP-Hydrolyse-Aktivitäten und die Mitochondrienmorphologie sollen als Grundlage dienen, um den Einfluss der GTPase Domäne auf die OPA1 Funktion zu bewerten. Vor diesem Hintergrund soll im Anschluss durch Messungen der Respirationskapazität der OPA1^(-/-) MEF und adOA Patienten Zellen der Funktionsradius von OPA1 genauer definiert werden.

Das Ziel der Arbeit ist es, durch die Charakterisierung der GTPase Domäne einen Beitrag zur Aufschlüsselung des OPA1 Wirkmechanismus zu leisten.

2 Materialien

2.1 Geräte

Filmprozessor	Curix 60, Agfa-Gevaert, NV, Mortsel, Belgien
Gel Dokumentationssystem für Ethidiumbromid gefärbte Agarose Gele	Bio-Rad Chemidoc, BioRad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop	AxioPlan II, Carl Zeiss, Deutschland
Gelelektrophorese System	Bio-Rad Mini Protean II, Deutschland
GeneAmp PCR System 9600	PE Biosystems, The Perkin Elmer Corporation, USA
Glaspotter	Polytron, Schweiz
Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Phosphoimager Storm	Molecular Dynamics Inc., Californien, USA
Netzgerät	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific GmbH, Deutschland
Semi dry Western blot Apparatur	Bio-Rad Transblot SD apparatus; Deutschland
Sonifizierer UP200 S (Ultraschall Desintegrator)	Dr. Hielscher GmbH, Deutschland
Spektrophotometer	Bio-Rad Smart spec TM 3000, BioRad Laboratories GmbH, Deutschland
Thermozykler	PTC100, MJ Research, Inc.; Watertown, USA Biometra, Biometra GmbH, Deutschland Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Zentrifugen	RC-M150 GX, RC-5B, Ultra Pro80, Sorvall GmbH, Deutschland Mini spin plus, Eppendorf AG, Deutschland

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

ADP	Sigma, Deutschland
Agarose	Gibco Life Technologies, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Deutschland
Antimycin A	Sigma, Deutschland
Benzonase	Merck, Deutschland
Bacto Agar	Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD; USA
Bacto trypton	Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD; USA

Bacto Hefeextrakt	Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD; USA
BCIP/NBT Farbwentwicklungs-Substrat	Promega, Deutschland
Bromophenolblau	Sigma, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Deutschland
Cycloheximid	Sigma, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP sodium salt	Amersham Pharmacia, Deutschland
DNA molecular weight standards	MBI Fermentas, Deutschland
DNase (RQ1 DNase)	Promega, Deutschland
DTT	Serva, Deutschland
Digitonin	Merck, Deutschland
ECL-Lösungen	Amersham Biosciences, Deutschland
EDTA (Titrplex® III)	Merck, Deutschland
Ethidiumbromid, 1%	Fluka, Deutschland
FuGene 6 Transfektions Reagenz	Roche, Deutschland
Glucose	Merck, Deutschland
Glycerol	Merck, Deutschland
α -P ³² -GTP	Amersham, Deutschland
HEPES	Sigma, Deutschland
Hoechst 33342	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Hyperladder I DNA-Marker	Bioline, Deutschland
Image-iT FX Signal Enhancer	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Isopropanol	Merck, Deutschland
IPTG (Isolpropyl-1-thio- β -D-galactopyrosid)	Amersham Biosciences, Deutschland
Kanamycin	Sigma, Deutschland
KCN	Sigma, Deutschland
Lysozym	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland
MitoTracker Green und Red	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Deutschland
Nonidet P-40(NP-40)	Sigma, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deutschland

PageRuler, vorgefärbter Protein Marker	MBI Fermentas, Deutschland
PEG (Polyethylenglycol) 1500	Roche, Deutschland
Phenol	Carl Roth, Deutschland
Restriktions Enzyme	New England Biolabs, Amersham Pharmacia, Deutschland
Reverse Transcriptase (Superscript II)	Gibco Life Technologies, Deutschland
Poly-D-Lysin	Sigma, Deutschland
PROLONG GOLD Einbettmedium	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail, complete-EDTA frei	Roche, Deutschland
Rotenon	Sigma, Deutschland
Roti-Load1	Carl Roth, Deutschland
Roti-Fekt Transfektions Reagenz	Carl Roth, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck, Deutschland
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin)	Sigma-Aldrich, Deutschland
TRIS (2-Amino-2-[hydroxymethyl]propan-1,3-diol)	Merck, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deutschland
TRIzol	Invitrogen, Deutschland
Tryptophanblau	Invitrogen, Deutschland
Tween-20	Pierce Chemical, P/N 28320, Deutschland

Salze, Säuren, Basen und weitere Lösungen, die nicht aufgeführt werden, wurden als *pro analysis* Qualität von Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bestellt.

2.3 Kits

Elongase Enzyme Mix	Invitrogen, Deutschland
Gel Aufreinigungs Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HiSpeed Plasmid Aufreinigungs Kit (Mini, Midi)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mitochondrienisolierungs Kit	Pierce, Deutschland
PAGE Blue Protein Färbelösung	Fermentas, Deutschland
PCR Aufreinigungs Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Mini- und Midipreparation	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT-PCR	RETROScript, Ambion, Deutschland

Quick Change XL site directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
Taq & AccuPOL DNA Polymerase	Biomol, Deutschland
TOPO-XL PCR cloning kit	Invitrogen, Deutschland

2.4 Verbrauchsmaterialien

3 MM Blotting Papier	Whatman GmbH, Göttingen, Deutschland
Agar Platten Bio Assay Dish	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
Deckgläser (Durchmesser: 15mm, 22mm)	Carl Roth, Deutschland
ECL- Filme	Amersham biosciences, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Hybond-N Membran	Amersham biosciences, Deutschland
Rinder IgG	Bio-Rad, Deutschland
Polypropylen Röhrchen 15 ml and 50 ml, sterile	Greiner Labortechnik GmbH, Deutschland
Sterilfilter	Cellulose nitrate membrane 0,2 und 0,4 µm; Deutschland
Zellkulturflaschen, 12- und 6- well Platten (Zellkulturplatten mit Vertiefungen)	TPP, Schweiz
Zentrifugenfilter Microcon (Y-10 10kDa und Y-30 30kDa cut off)	Millipore, Deutschland

2.5 Zellen und Vektoren

BL21-(DE3)-RIL kompetente Bakterien	Stratagene, USA
COS7	M.Gossen, MDC-Berlin, Deutschland
DH5α chemokompetente Bakterien	Invitrogen, Deutschland
HeLa	M.Gossen, MDC-Berlin, Deutschland
LCL (lymphoblastoide Zelllinien)	M.Schülke und T.Rosenberg, Charite-Berlin, Deutschland
MEF (e8,5; viral immortalisierte Zelllinien)	D.Chen, California Institut für Technology, USA
pcDNA3 Vektor	Invitrogen, Deutschland
pET21d Vektor	Merck Bioscience, Deutschland
XL-Gold chemokompetente Zellen	Invitrogen, Deutschland

2.6 Lösungen, Puffer und Bakterienmedien

Antibiotika (1000x)	50 mg/ml Ampicillin; 30 mg/ml Kanamycin 34 mg/ml Chloramphenicol
AP-Substratpuffer	100 mM Tris-HCl 5 mM MgCl ₂ 0,01 mM ZnCl ₂ ; pH 9,7 16,5 µl (50mg/ml) BCIP + 33 µl (50mg/ml) NBT
6x DNA Ladepuffer	0,2% (w/v) Bromophenolblau 60% (v/v) Glycerinl 60 mM EDTA
<i>GTPase Hydrolyse Assay</i>	
Reaktionspuffer (10x)	500 mM Tris-HCl 1 mM DTT 5 mM MgCl ₂ 0,02%(w/v) BSA
Reaktionsmischung (4x)	1x Reaktionspuffer 0,6 mM GTP
Aktivitätspuffer	10 µCi α ³² P GTP ad 20µl H ₂ O 1x Reaktionsmischung 1x Reaktionspuffer 1 µg Protein auf 30µl H ₂ O
Laufmittel für DC	1M LiCl ₂ /Acetat
5x Laemmli Puffer	1,5 g [19,8 mM] SDS 3,5 ml [479,6 mM] Glycerin 3,2 ml von 1M Tris-HCl [320 mM] ; pH 6,8 100 mg [14,4 mM] Bromphenolblau 2,5 ml [0,358mM] β-Mercaptoethanol H ₂ O auf 10ml
LB Medium	Bacto-trypton 10 g Bacto-Hefeextrakt 5g NaCl 10 g; pH 7,2 H ₂ O auf 1L autoklaviert
LB-Agar	LB medium 15 g/l Bacto Agar
Mitochondrien Isolierungspuffer (für Enzymaktivitätsmessung)	Lösung A: 1,5 M Saccharose Lösung B: 1 mM Tris-HCl; pH 7,6

Polarografie

Antimycin A	10 μ M in Ethanol
Ascorbat	1 M in H ₂ O, pH 7,0
Digitononlösung	50 μ g/ml in Medium A
Dithionit	1 g/ml in H ₂ O, pH 7,0
Glutamat	1 M in H ₂ O, pH 7,0
Glycerol-3-Phosphat	1 M in H ₂ O, pH 7,0
KCN	200 μ M in Medium A, pH 8,0
Medium A	20 mM HEPES, pH 7,1 250mM Sucrose 10 mM MgCl ₂
Rotenon	100 μ M in Ethanol
TMPD	40 mM in Medium A
PBS	PBS Dulbecco ohne Mg ²⁺ , Ca ²⁺
Proteinelutionspuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
Proteinexpressionspuffer	P1 : 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl; 0,1%(v/v)Triton-X100, 1 mg/ml Lysozym, 1 U/ml Benzonase; pH 8,0 P2: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10%(v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 60 mM Imidazol; pH 8,0 P3: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10%(v/v) Glyzerin, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1M Imidazol; pH 8,0
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 190 mM Glycin 0.1% SDS
TE Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA; pH 8,0
50x TAE Puffer	242 g Tris 57,1 ml Acetat (min 99,8%) 100 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0 H ₂ O auf 1L
10x TBS	100 mM Tris-HCl 9% (w/v)NaCl; pH 7,4

Western Blot

Antikörper-Lösung	1x TBS 0,01% (v/v) Thimerosal 3% (w/v) BSA
Transferpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 15% Methanol
Waschpuffer	1x TBS
Blockierungslösung	0,5% (v/v) TWEEN 20 1x TBS 3% (w/v) BSA
Zelllysepuffer zur Proteinextraktion (für Zellkultur)	50 mM Tris HCl 150 mM NaCl 5mM EDTA 10 mM EGTA 1% (v/v) NP-40 1x Proteaseinhibitor Cocktail; pH 7,0

Plasmidklone wurden in 25% (v/v) Glycerol bei -80°C gelagert.

2.7 Zellkultur Lösungen:

Maus Fibroblasten Medium (Feeder):	500 ml Dulbecco's MEM (DMEM) mit Glutamax I-4,5 g/l Glucose- mit Pyridoxin, Natriumpyruvat (Gibco BRL) 60 ml fötales Kälberserum (FCS; Hitze inaktiviert bei 56°C für 45 min, Gibco BRL) 5,7 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL) 5,7 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin G/10 mg/ml Streptomycin; Gibco BRL) 1,2 ml 50 mM β -Mercaptoethanol (Gibco BRL)
HeLa Medium	500 ml Dulbecco's MEM (DMEM) mit Glutamax I-4,5 g/l Glucose, mit Pyridoxin, Natriumpyruvat (Gibco BRL) 60 ml fötales Kälberserum (FCS; Hitze inaktiviert bei 56°C für 45 min, Gibco BRL) 5,7 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin G/10 mg/ml Streptomycin; Gibco BRL)

Medium für Lymphoblastoide Zellen (LCL)	500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin 300 mg/ml- 2 mg/l Glucose- Glutathion 1 mg/ml- HEPES 25mM (Gibco BRL) 60 ml fötales Kälberserum (FCS; Hitze inaktiviert bei 56°C für 45 min, Gibco BRL) 5,7 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin G/10 mg/ml Streptomycin; Gibco BRL)
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin mit 0,53 mM EDTA*4Na (Gibco BRL)

2.8 Antikörper

2.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Monoklonal Maus anti- β actin	Sigma	1:5.000 WB
Monoklonal Maus anti-Cytochrom C	BD Pharmingen	1:300 IHC
Polyklonal Kanninchen anti-Cytochrom C	Santa Cruz Biotechnology	1:200 IHC; 1:500 WB
Monoklonal Maus anti-HSP60	Sigma	1:300 IHC
Monoklonal Maus anti-OPA1 (As 266-520; GTPase Domäne)	V.R. Akepati	1:5.000 WB; 1:1.000 IHC
Polyklonal Kanninchen anti-Porin	Abcam	1:300 WB
OXPHOS Complex Detection Cocktail	MitoScience	1:250 WB

Tab. 4: Liste verwendeter primärer Antikörper

2.8.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG, HRP gekoppelt Ziege anti-Maus IgG, AP gekoppelt	Sigma	1:8.000 WB
Ziege anti-Kanninchen, HRP gekoppelt Ziege anti-Kanninchen, AP gekoppelt	Sigma	1:8.000 WB
anti-Maus IgG AlexaFluo-594	Molecular Probes, Invitrogen	1:800 IHC
anti-Maus IgG AlexaFluo-488	Molecular Probes, Invitrogen	1:800 IHC
anti-Kanninchen IgG AlexaFluo-594	Molecular Probes, Invitrogen	1:800 IHC
anti-Kanninchen IgG AlexaFluo-488	Molecular Probes, Invitrogen	1:800 IHC

Tab. 5: Liste verwendeter sekundärer Antikörper

2.9 Primer (Oligonukleotide)

2.9.1 Primer zur Mutagenese

Name	Sequenz (5'-3')
Glu270Lys-F	CAT GTA TTC TAA AGT TCT TGA TG
Glu270Lys-R	CAT CAA GAA CTT TAG AAT ACA TG
Arg290Trp-F	CAT CTG CCA TGG GTT GTT GTG
Arg290Try-R	CAC AAC AAC CCA RTGG CAG ATG
Gly300Glu-F	GAG TGC TGA AAA GAC TAG
Gly300Glu-R	CTA GTC TTT TCA GCA CTC
Thr323Ala-F	GAA GAT GAT GGC ACG TTC TCC AG
Thr323Ala-R	CTG GAG AAC GTG CCA TCA TCT CC
Leu396Arg-F	AGG ATG GTG CGT GTT GAC TTA CC
Leu396Arg-R	TAA GTC AAC ACG CAC CAT CCT
Thr503Lys-F	GCT GTT GTA AAA GGA AAA GGG
Thr503Lys-R	CCC TTT TCC TTT TAC AAC AGC
905STOP-F	GAA GTT AGG TGA TTA GAG
905STOP-R	CTC TAA TCA CCT AAC TTC

Tab. 6: Liste verwendeter Oligo-Nukleotide für die Mutagenese PCR; F: vorwärts; R: rückwärts

2.9.2 Primer zur Proteinexpression

Name	Sequenz (5'-3')
F-Nhe-GTP_805	GTG GCT AGC ATG TAT TCT GAA GTT CTT GAT G
270_F-Nhe-GTP_805	GTG GCT AGC ATG TAT TCT AAA GTT CTT GAT G
R-Xho-GTP_1839	GCA CTC GAG AAC CTG GCT CAG ACT GAT AAC T

Tab. 7: Oligo-Nukleotide für die DNA Synthese zur Proteinexpression der OPA1 GTPase Domäne

2.10 Software

analySIS	Soft Image System GmbH, Deutschland
Axio vision 3.1	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
DNASar	Madison, Wisconsin, USA
Image Quant	Molecular Dynamics Inc., Californien, USA
Photoshop	Adobe, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Phenolextraktion und Ethanol-fällung

Für die Extraktion von DNA mit Phenol wurde die DNA-Lösung zuerst einmal mit einem Volumen Phenol und anschließend zweimal mit einem Volumen des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (Verhältnis 25:24:1) ausgeschüttelt (Sambrook, 1989). Dabei sammeln sich die Proteinverunreinigungen an der Grenzfläche zwischen organischer und wässriger Phase. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils für 5 min bei 16.100xg in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, bevor die obere wässrige Phase abgenommen wurde. Mit Hilfe der Ethanol-fällung wurden wässrige DNA-Lösungen konzentriert und unerwünschte Salze entfernt. Dazu wurde die Lösung mit einem Volumen an 100% (v/v) Ethanol (-20°C) versetzt und 30 min bei 4°C mit 16.000xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Präzipitat mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach erneuter 20 min Zentrifugation an der Luft getrocknet. Die isolierte DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen.

3.1.2 Reinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

2,5 ml LB Medium wurden mit einzelnen Kolonien angeimpft und entsprechend des Plasmid-resistenzgens mit Antibiotikum selektiv bei 37°C über Nacht unter Schütteln angezogen. Die Zellen wurden bei 10.000xg 1 min. pelletiert und die Plasmid DNA mittels QIAGEN Plasmid Mini Kit isoliert. Gemäß Herstellerprotokoll wurden die Zellen unter alkalischen Bedingungen durch SDS lysiert und die DNA denaturiert. Die anschließende Neutralisation unter hoher Salzkonzentration (3M) ermöglichte die Abtrennung der präzipitierten chromosomalen DNA, der Proteine, der Zelldebris und des SDS von der kleineren renaturierten in Lösung befindlichen Plasmid DNA. Letztere bindet an die Silica-Gel Membran, wird mit 70% Ethanol gewaschen und bei niedriger Salzkonzentration in TE Puffer eluiert. Die Reinigung, Entsalzung und Elution mit TE Puffer von PCR-Produkten erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Mikro-zentrifugationssäulen (Quiagen Kit) gemäß Herstellerprotokoll.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm (OD₂₆₀) mit einem UV/VIS Spektrophotometer bestimmt. Ein Wert von 1,0 bei OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Gegebenenfalls wurden die Lösungen so verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich (OD₂₆₀: 0,1 -1,0 Absorptions-

einheiten) erfolgte. Zur Bestimmung der Qualität und damit der Proteinfreiheit der Proben wurde der Quotient OD260/280 bestimmt, wobei ein Verhältnis von rund 1,8 als gut bewertet wurde.

3.1.4 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann durch wiederholtes Durchlaufen eines Reaktionszyklus - die Trennung der Matrizenstränge, Anlagerung von kurzen spezifischen einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primern) an die einzelsträngigen Matrizen und darauf folgende Verlängerung dieser Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase - eine exponentielle Vervielfältigung der Matrizen-DNA erreicht werden (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt 1-2 U der thermostabilen DNA-Polymerase, 5 µl zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers, 5 µM der beiden Oligonukleotide, 150 µM aller vier dNTPs und ca. 1-100 ng der Matrizen-DNA. Da die DNA-Polymerasen magnesiumabhängig sind, war im zehnfach konzentrierten Reaktionspuffer Magnesiumchlorid für eine Endkonzentration von 1,5 mM vorhanden. Als thermostabile DNA-Polymerase wurden die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Die *Taq*-Polymerase zeichnet sich durch hohe Prozessivität und Geschwindigkeit aus. Die *Pfu*-Polymerase ist langsamer und weniger prozessiv, besitzt aber eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die die Fehlerrate bei der Amplifikation erheblich verringert („*proofreading*“). Ein typischer Reaktionsverlauf begann mit einer fünfminütigen Vorinkubation bei 94°C, um die Matrizenstränge vollständig zu denaturieren. Es folgten 25-35 Reaktionszyklen aus Denaturierung der Matrizenstränge (mind. 1 min bei 94°C), Anlagerung der spezifischen Oligonukleotide (45 s bei 50-55°C) und Synthese der DNA (1 bis 6 min bei 72°C, je nach Länge des Matrizenstranges). Nach Ablauf der Reaktionszyklen wurden unvollständig synthetisierte DNA-Stränge durch fünfminütige Inkubation bei 72°C vervollständigt. Die Entstehung des entsprechenden Produkts wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

3.1.5 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen. Dabei wurden die vom Hersteller (New England Biolabs) mitgelieferten Puffer verwendet. Für 1 µg DNA wurden 1-2 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Ansätze wurden für mindestens 2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

3.1.6 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase (New England Biolabs). Dazu wurden ca. 50 bis 200 ng des linearisierten Vektors und ein ungefähr vierfacher molarer Über-

schluss des zu klonierenden Fragments eingesetzt. Außerdem enthielt ein 20 µl Ligationsansatz 2 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers (Endkonzentration: 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 µg/ml BSA; pH 7,5), 1 U T4-DNA-Ligase und die entsprechende Menge Wasser. Die Ligation erfolgte für mindestens 4 h, normalerweise über Nacht, bei 16°C.

3.1.7 Mutagenese von Punktmutationen in OPA1 pcDNA3

Gemäß Herstellerprotokoll des Mutagenese Kits (Stratagene) wurde Plasmid-DNA mit enthaltener humaner wildtyp OPA1-DNA (offener Leserahmen, Isoform1 KIAA0567 in pcDNA Vektor - Geschenk von C. Alexander) unter Verwendung spezieller o.g. Primer mittels PCR amplifiziert, so dass die Tochter-DNA eine Basensubstitutionsmutation trug, die zu einer Veränderung der ursprünglich kodierten Aminosäure führte. Da die eingesetzte DNA aus dam⁺ Bakterienzellen stammte und somit methyliert war, konnte durch einen Verdau mit DpnI festgestellt werden, ob die unmethylierte Tochter-DNA amplifiziert wurde. Nach dem Kontrollverdau mit DpnI wurde ungeschnittene Tochter-DNA in DH5α Zellen transformiert. Die gewachsenen Kolonien wurden sequenziert und bei positivem Ergebnis erneut angezogen, um Plasmid-DNA aufzureinigen.

Exon	Name	Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Referenz
8	270OPA	808G->A	Glu270Lys	Pesch <i>et al.</i> , 2001
8	290OPA	868C->T	Arg290Trp	Pesch <i>et al.</i> , 2001
9	300OPA	899G->A	Gly300Glu	Toomes <i>et al.</i> , 2001
9	323OPA	976A -> G	Thr323Ala	abgeleitet nach Frank <i>et al.</i> , 2001
12	396OPA	1188T->G	Leu396Arg	Delettre <i>et al.</i> , 2000
15	503OPA	1508C->A	Thr503Lys	Thiselton <i>et al.</i> , 2002
25	905OPA	2647 C->T	905STOP (fehlende CC2-Domäne)	abgeleitet nach Toomes <i>et al.</i> 2001,

Tab. 8: OPA1 DNA Mutationsvarianten erzeugt mittels Mutagenese

3.1.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte durch die Firmen Invitex (Berlin) oder MWG Biotech GmbH (Ebersberg).

3.1.9 Einklonierung der OPA1-GTPase Mutanten in den Bakterienexpressionsvektor pet21d

Mit den Primern F-Nhe-GTP_805 bzw.270_F-Nhe-GTP_805 und R-Xho-GTP_1839 und der DNA der OPA1 Mutationsvarianten als Matrize wurden die Mutationsvarianten der GTPase Domänen von OPA1 amplifiziert. Mit Hilfe der NheI und XhoI Schnittstellen wurden die PCR-

Produkte nach einer Gelextraktion in den Bakteriensexpressionsvektor pet21d, der eine C-terminale 6xHis Markierung enthielt, kloniert.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	
95	180	} 30 Zyklen
94	30	
52	45	
72	120	
72	300	

Tab. 9: PCR -Programm zur OPA1-GTPase Mutanten-DNA Amplifizierung

Unter Kontrolle des T7 Promotors wurden die sieben OPA1 Mutationsvarianten (270OPA, 290OPA, 300OPA, 323OPA, 396OPA, 503OPA) und die wildtyp OPA1 GTPase Domänen exprimiert.

3.1.10 Agarosegel Elektrophorese (DNA)

Die konventionelle Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA Fragmenten verwendet. Die elektrophoretische Mobilität der DNA hängt hauptsächlich von ihrer Größe ab, aber auch die Konformation beeinflusst den Lauf. Je nach Fragmentgröße wurden 1-2% Agarosegele verwendet, denen 1 µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA Banden zugesetzt war. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE Puffer durchgeführt.

3.1.11 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert und zum Abstoppen der Enzymreaktion in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 800xg für 6 min abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in Zellysepuffer aufgenommen, 30 min auf Eis stehen gelassen und dann ultraschallbehandelt:

Amplitude	Stärke [%]	Zeit [s]	Wiederholung	
0,5	40	20	3	Nach jeder Wiederholung erfolgte 20 s Inkubation auf Eis
1,0	30	15	1	

Tab. 10: Sonifizierungsintervalle zum Aufbrechen von eukaryontischen Zellen

Um die Zelldebris von den zytoplasmatischen Proteinen abzutrennen, wurde die Zellsuspension bei 16.000xg für 20 min bei 4°C abzentrifugiert, und die Konzentration der löslichen Proteine, die sich im Überstand befanden, nach Bradford bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.1.12 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurde das „BioRad Proteinassay“ Reagenz (BioRad) im Verhältnis 1:5 mit

Wasser verdünnt und 1 ml zu den Proben gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Anhand einer Eichkurve, ermittelt mit Rinder IgG, konnte die Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden.

3.1.13 SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in Laemmlipuffer erhitzt (95°C für 5 min) und je nach Proteingröße auf 8% -12% mini SDS-PAGE Gelen aufgetrennt (Mini-protein II Dual Slab Cell, Bio-Rad; Laemmli 1970). Die Hitzeinkubation wurde bei Proben für die Detektion der Respirationskomplexe ausgelassen, um die korrekte Antigenerkennung der Antikörper (OXPHOS Complex Detection Cocktail, MitoScience) zu gewährleisten. Die durch SDS denaturierten und durch β -Mercaptoethanol in ihren Thiol-Bindungen reduzierten Proteine erhalten eine stabähnliche Form und tragen eine einheitliche negative Ladung mit einem Ladungs-Massen-Verhältnis, das sich proportional zum Molekulargewicht verhält. Die Gele wurden mit kolloidalem Coomassie G-250 (PageBlue, Fermentas) gefärbt und die Größe anhand des Laufverhaltens eines vorgefärbten Molekulargewichtsmarkers bestimmt (PageRuler prestained Marker, Fermentas).

3.1.14 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Halbtrockenverfahren auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Es wurde ein Sandwich aus Nitrozellulosemembran und Gel zusammengestellt, die sich zwischen einer Lage extra dicken Whatman Filterpapier befanden. Alle Komponenten wurden zuvor in Transfer-Puffer (4°C) getränkt, in der o.g. Reihenfolge luftblasenfrei nacheinander auf die untere Graphitelektrode (Anode) aufgelegt und dann mit der oberen Graphitelektrode (Kathode) abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 55 min bei 10 V für Proteine zwischen 80-180 kDa und 35 min bei 10 V für Proteine kleiner als 50 kDa. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran zweimal kurz mit dH₂O gespült und bei RT 1 h in BSA- oder Magermilchpulver-haltiger Blockierungslösung geschwenkt. Danach erfolgte die Antikörperinkubation (Immundekoration). Zuerst wurde 1,5 h bei RT mit primären Antikörpern, der in Verdünnungspuffer vorlag, inkubiert und anschließend nach dem Waschen (3x10 min mit Waschpuffer) die Inkubation mit sekundärem Antikörper für 1 h. Dieser Antikörper war abhängig vom primären Antikörper gegen IgG von Kaninchen oder Maus gerichtet, die an Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt waren. Anschließend wurde erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase über ein Chemolumineszenz-Substrat (ECL, Amersham Biosciences) auf ECL-Film automatisch in einem Curix60 Filmprozessor entwickelt.

AP-gebundene Antikörper wurden durch Zugabe des AP-Substratpuffers in Dunkelheit entwickelt und durch Spülen mit destilliertem H₂O abgestoppt. Die so visualisierten spezifisch gefärbten Proteinbanden wurden zur Dokumentation mittels Matroxscanner eingelesen und als Bilddatei abgespeichert.

3.1.15 Expression und Aufreinigung von OPA1-GTPase Varianten

Die sechs Plasmide mit einer Punktmutation in der GTPase Domäne von OPA1 und der Wildtyp (ca. 42 kDa), sowie der Leervektor pet21 wurden in BL21(DE3)-RIL transformiert. Die transformierten Zellen wurden in 500 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln kultiviert und bei einer OD600 von 0,4-0,6 die Proteinexpression durch Zugabe von 40 µM IPTG und einer weiteren Inkubation bei 27°C für 2 h induziert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis und vorgekühlten Materialien und Lösungen. Die Zellen wurden 10 min bei 10.000xg abzentrifugiert, das Pellet mit Puffer P1 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde Proteaseinhibitorcocktail (Roche) zugesetzt und die Zellsuspension sonifiziert:

Amplitude	Stärke [%]	Zeit [s]	Wiederholung	
0,5	40	20	3	Nach jeder Wiederholung erfolgte 20 s Inkubation auf Eis
1,0	30	30	1	

Tab. 11: Sonifizierungsintervalle zum Aufbrechen von Bakterien

Die aufgebrochenen Zellen wurden bei 12.000xg 20 min abzentrifugiert und der Überstand auf mit P2-Puffer voräquiliبریerte Ni-NTA Säulen (Säulenvolumen 1ml) geladen. Zur Bindung der His-markierten Proteine an die Ni-NTA Matrix rotierte die Mischung für 1h auf einem Drehrad, um die Säule im Anschluss dreimal mit je einem Säulenvolumen P2 von unspezifisch gebundenem Protein zu befreien. Die Proteine wurden mit 1 ½ Säulenvolumen P3 von der Säule mittels kompetitiver Verdrängung des Histidin-Tags durch Imidazol eluiert und durch Zentrifugation in YM-30 Zentrifugenfiltrerröhrchen (Microcon, Millipore) bei 14.000xg aufkonzentriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford.

3.1.16 GTPase Hydrolyseaktivitätsmessung

Zuerst wurde der Aktivitätspuffer auf Eis zusammengemischt aus 2,5 µl Reaktionspuffer, 5 µl Reaktionsmischung, 1µg Protein in Proteinelutionspuffer bzw. keinem Protein als Leerwert und dann mit dH₂O auf 30 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 1 h unter leichtem Schütteln. Zur Auftrennung des GTP³² von den Reaktionsprodukten P und GDP³² wurden zweimal 1 µl Tropfen der Reaktion auf PEI-Zelluloseplatte aufgetragen und in eine Glaskammer mit Laufmittel gestellt. Nachdem das Laufmittel sich von unterhalb des Auftragungsortes bis kurz zum Plattenende hochgesaugt hatte, wurde die Platte getrocknet, in Frischhalte-

folie gewickelt und auf eine wiederverwendbare Expositionsplatte gelegt. Nach einer Belichtung von 1h in einer Fotokassette wurden die radioaktiven Banden auf dem Phosphorimager (Molecular Dynamics) eingelesen und mit ImageQuant die Intensitäten quantifiziert. Als Positiv-Kontrolle wurde wtGTP (100% Aktivität) und als Negativ-Kontrolle der Leervektor (pet; 0% Aktivität) verwendet.

3.1.17 Immunocytochemie

Säugerzellen (MEF, HeLa) wurden auf Deckgläsern ausgesät und setzten sich über Nacht ab. Mit 300-500 nM MitoTrackerGreen oder Red (Molecular Probes) wurden die Mitochondrien in lebenden Zellen gefärbt. Dabei durchdringt der Farbstoff die Zell- und Mitochondrienmembranen und verbleibt aufgrund des Aktionspotentials spezifisch in den Mitochondrien. Hierfür werden die Zellen in Zellkulturmedium mit MitoTracker für 45 min bei 37°C inkubiert, und durch Austausch mit normalem Medium gewaschen (1 h, 37°C).

Danach wurden die Zellen, wie nach jedem noch folgenden Inkubationsschritt, 3-mal mit PBS gewaschen. Bei notwendiger zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns wurde Hoechst 33342 (1µg/ml) im Medium für 5 min verwendet. Nach der sich anschließenden Fixierung der Zellen mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 30 min bei 4°C erfolgte entweder eine Antikörperfärbung oder eine direkt Betrachtung der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan II). Bei der Antikörperfärbung wurden dem Fixiermedium zur Permeabilisierung 0,01% (v/v) Triton-X100 zugesetzt, gefolgt von der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 20 min bei RT mit 3% BSA in PBS. Nach der Blockierung wurden zur Verminderung des Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe die Proben in Image-iT FX Signal Enhancer (Molecular Probes) weitere 20 min bei RT geschwenkt. Die primären Antikörper wurden in 3% (w/v) BSA/PBS verdünnt und bei 4°C über Nacht oder bei RT, 2 h geschwenkt. Zur Detektion wurden fluoreszenzkonjugierte (Alexa-488: grün; Alexa-594: rot) sekundäre Antikörper (2 h, RT) verwendet. Das Einbetten der Proben erfolgte mit ProLong Gold Antifade (Molecular Probes).

Filtersatz (Zeiss)	Excitation [nm]	Emission [nm]
02	365	397
09	450-490	515-565
00	530-585	615

Tab. 12: Zeiss Filtersätze wurden für das Fluoreszenzmikroskopie AxioPlan II verwendet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von LCL (lymphoblastoide) Zelllinien

Zum Erhalt lymphoblastoider Zellen wurden Lymphozyten aus Patienten isoliert und mit Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisiert. Folgende adOA-Patienten LCLs wurden uns von Dr. T. Rosenberg (Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt:

A)

LCL- Name/ Geschlecht	Sicht rechts Sicht links	Farbsehen	Visuelles Feld	Alter bei Diagnose/ Alter bei Untersu- chung
KSP/ m	0,1 0,05	schwer R/G	G IV/1e normal rechts, zentral Skotoma links	6 / 43
LN/ w	0,5 0,5	n.d.	O klein parazentral und peripheral Skotoma	28 / 37
MMN/ w	0,1 0,1	n.d.	G I/1e und IV/1e normal	7 / 48
MNJ/ w	0,3 0,3	Medium R/G/B	G I/4e normal	5 / 18
SBE/ m	0,1 0,1	Medium R/G/B	G II/4e normal rechts, kleines parazentrales Skotoma links	7 / 35

B)

LCL-Name	Mutation im OPA1 Gen
LN	Bisher keine Mutation im OPA1 Gen detektiert
KSP	18 Nukleotid Deletion in Exon 2 (mitochondriale Leitsequenz) zwischen den Nukleotiden 112-129, dadurch fehlen 6 Aminosäuren (c.112_129del 18)
MNJ, MMN	Deletion von 16As, Insertion von 22As in Exon 28 (CC2-Domäne), mit Stop Kodon → Leserahmenverschiebung (c.2826delT)
SBE	4 Nukleotid Substitution nach Exon 24 von Adenin zu Guanin, wodurch Exon 24 übersprungen wird (Exon 24 c.2496+4A>G)

Tab. 13: A) Klinische Übersicht LCLs Zellen aus Patienten mit optischer Atrophie. B) Übersicht der Mutationen im OPA1 Gen für adOA LCL Zellen. m: männlich, w: weiblich, R: rot, G: grün, B: blau, n.d.: nicht detektierbar, G: Goldmann, O: Octopus

Prof. Dr. M. Schülke (Charite, Berlin) überließ uns folgende Kontroll-LCLs:

LCL-Name/ Geschlecht	Art
171/ w	Komplex I Mangel
324/ m	Komplex IV Mangel
531/ m	Komplex I Mangel
552/ w	Normalkontrolle
267/ m	Normalkontrolle
081/ m	Normalkontrolle
109/ m	Normalkontrolle
119/ w	Normalkontrolle

Tab. 14: Übersicht über Kontroll-LCLs; bei den Komplexen handelt es sich um die Respirationskomplexe

3.2.2 Kultivierung primärer MEF (Maus embryonale Fibroblasten) Zellen

Entnommene in PBS gewaschene Mausembryonen ($OPA1^{+/+}$, $OPA1^{+/-}$) des 12-ten embryonalen Tages (e12) wurden mit einem Skalpell zerschnitten und in 0,05% Trypsin/EDTA mit DNase (1U) 45 min bei 37°C inkubiert. Nach der enzymatischen Aufspaltung wurden die Zellklumpen erneut durch Scherkräfte mittels mehrfachen Auf- und Abpipettierens durch eine 1 ml Pipette zerkleinert. Die Zellen wurden dann auf einer 12-Well Zellkulturplatte ausgesät und setzten sich über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit ab. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 85% mit Trypsin/EDTA passagiert.

3.2.3 Kultivierung Viral-immortalisierter MEF Zellen

Maus embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden aus $OPA1^{+/+}$ und $OPA1^{-/-}$ Embryonen des 8,5-ten embryonalen Tages (e8,5) im Labor von D. C. Chan (USA) gewonnen. $OPA1^{+/-}$ Mäuse (C57BL/6 gekreuzt mit 129/Ola) wurden zuerst mit dem Black Swiss Stamm rückgekreuzt, der Wurf wurde sezirt und die embryonalen Fibroblastenzellen wurden in DMEM mit 15% fötalem Kälberserum, 1 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat und 50 µg/ml Uridin kultiviert. Nach der ersten Passage wurden die wildtyp ($OPA1^{+/+}$) und $OPA1$ defizienten (knock-out; $OPA1^{-/-}$) Zellen (MEF_wt, MEF_ko) mittels SV40 large T Antigen viral immortalisiert (Chen et al., 2003). Anschließend wurden die Zellen in Feeder Medium kultiviert und bei einer Zelldichte von 85% mittels Trypsin/EDTA passagiert.

3.2.4 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation auf Eis aufgetauter chemokompetenter Zellen von *E. Coli* (*DH5a*, *BL21-(DE3)-RIL*) mit Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 2-4 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz. Die Suspension wurde 30 min auf Eis stehen gelassen, anschließend 45 s bei 42°C inkubiert, sofort wieder 2 min auf Eis gestellt und dann in 900 µl LB-Medium aufgenommen. Danach wurde die Suspension für 1 h bei 37°C rotiert. Anschließend wurden 100-300 µl der Suspension auf LB-Agar Platten mit 100 µg/ml Ampicillin für pcDNA in *DH5 α* und zusätzlich 35 µg/ml Chloramphenicol für pet21D in *BL21-(DE3)-RIL* ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.5 Transiente Transfektion und Expression von OPA1 Varianten in Säugerzelllinien

Unter Kontrolle des CMV Promotors des pcDNA Vektors wurden die sieben OPA1 Mutanten (270OPA, 290OPA, 300OPA, 323OPA, 396OPA, 503OPA, 905OPA) und das wildtyp OPA1 Konstrukt in HeLa Zellen mit Rotifect (Carl Roth) oder MEF Zellen mit Fugene6 (Invitrogen) gemäß Herstellerprotokoll transfiziert. Als Negativ-Kontrolle erfolgte die transiente Transfektion des Leervektors pcDNA. Die Expression wurde mittels fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper über mikroskopische Aufnahmen nach 24 h oder 48 h dokumentiert und mit AxioVision (Zeiss) ausgemessen.

3.2.6 PEG-Fusionsassay zur Verschmelzung von Zellmembranen

Der PEG-Fusionsassay wurde mit leichten Veränderungen nach Chen *et al.* (2003) durchgeführt. MEF Zellen wurden in 12-Wells Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht über Nacht in den Inkubator gestellt. Dann erfolgte die Färbung der einen Population A mit MitoTrackerGreen in grün und die andere Population B mit MitoTrackerRed in rot (entsprechend Herstellerprotokoll). Anschließend wurde möglichst unter Lichtausschluss im Dunkeln weitergearbeitet. Die unterschiedlich gefärbten Zellen wurden vorsichtig trypsiniert und auf ein mit Poly-D-Lysin beschichtetes Deckglas in eine 6-Well Platte zusammen ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 55 s mit 50% PEG1500 (Roche) behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit Medium wurden die Zellen für mind. weitere 8 h -16 h in Medium mit 25 µg/ml Cycloheximid in den Inkubator gestellt. Das PEG erlaubte die Verschmelzung der Zellmembranen benachbarter Zellen und damit auch verschiedener Zellpopulationen. Dadurch kamen die Mitochondrien der verschieden gefärbten Zellen in eine räumliche Nähe, die in wildtyp Zellen die Mitochondrienfusion ermöglichte. Cyclo-

heximid wurde zugesetzt, um die Neusynthese von Proteinen zu blockieren und so Verfälschung der Ergebnisse durch Zellteilungen zu vermeiden. Um die Expression transfizierter Konstrukte in Population B nachzuweisen, erfolgte die Rotfärbung nicht mit MitoTrackerRed sondern nach der PEG Behandlung mittels spezifischen Antikörper gegen das exprimierte Protein und einem fluoreszenten sekundären Antikörper (rot: Alexa 594). Zur Auswertung wurden die Zellen fixiert (4% PFA), falls gewünscht mit Antikörpern gefärbt und in ProLongAntifade (Molecular Probes) eingebettet. Die Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, wobei das Fehlen (rot oder grün) oder die Existenz ausgetauschter mitochondrialer Fluoreszenzfarbstoffe (überlappende Signale rot+grün=gelb) als Indikator für die mitochondriale Fusionskompetenz der Zellhybride galten.

3.2.7 Mitochondrienanreicherung zur Messung der Respirationskomplex-Aktivität

Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 600xg 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. 4°C durchgeführt. Das Material wurde mit 2,9 ml Lösung A resuspendiert und mit einem Potterstab homogenisiert, mit 0,6 ml Lösung B vorsichtig gevortext und erneut abzentrifugiert. Zuvor wurde aus dem Homogenat ein Aliquot von ca. 300 µl entnommen und für anschließende Western Blots bei -20°C eingefroren. Der letzte 600xg Überstand wurde im Anschluss bei 14.000xg zentrifugiert. Das abgesetzte Mitochondrienpellet wurde mit 500 µl Lösung A resuspendiert und aliquotiert. Die eingefrorenen Aliquots wurden in Kooperation mit Dr. A. Janssen (Labor für Pädiatrie und Neurologie; Universität Radboud; Nijmegen, Niederlande) vermessen. Die Komplex I (NADH-Dehydrogenase) Aktivität wurde spektrophotometrisch gemessen. Die vom Komplex I durch Oxidation von NADH produzierten Elektronen reduzierten das künstliche Substrate Decylubiquinon. Dieses wiederum überträgt Elektronen an DCIP (2,6-Dichloroindophenol), dessen Reduktion bei 600 nm gemessen werden konnte. Aus der Tatsache, dass nur Elektronen vom Komplex I und nicht von anderen NADH-Dehydrogenasen von Decylubiquinone akzeptiert wurden, ergab sich eine hohe Rotenonempfindliche Aktivität (Jansson *et al.*, 2007). Diese wurde kontrolliert, indem die Rotenonsensitivität für den Komplex I (C1-RS) bestimmt wurde. Dafür wird die NADH Oxidation in Ab- und Anwesenheit von Rotenon gemessen. Die Messung der Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) Aktivität erfolgte durch Succinat-abhängige Reduktion von DCIP und wurde ebenfalls bei 600 nm vermessen (Rustin *et al.*, 1994). Die Reduktion von Cytochrom C wurde in Anwesenheit von Rotenon bei 550/540 nm betrachtet und so die Aktivität des Komplexes III (Cytochrom C Re-

duktase) ermittelt (Zheng *et al.*, 1990). Umgekehrt ermöglichte die Abnahme des reduzierten Cytochrom C bei 550 nm durch Oxidation von Cytochrom C die Bestimmung des Komplexes IV (Cytochrom C Oxidase) Aktivität (Cooperstein und Lazrow, 1951). Die Komplex V (ATP Synthase) Aktivität wurde über die Oxidation von NADH bei 340 nm gemessen (Buckle *et al.*, 1986). Dies wurde durchgeführt in Anwesenheit von Rotenon, Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase und Laktat-Dehydrogenase. Die Reaktion begann durch Zugabe von ATP, das vom Komplex V in ADP+P umgesetzt wurde. ADP reagierte zusammen mit Phosphoenolpyruvat unter Einsatz von Pyruvatkinase u.a. zu Pyruvat und NADH, das wiederum von der Laktatdehydrogenase oxidiert wurde. Dieser Umsatz diente damit indirekt zur Messung der ATP Synthase. Als Marker für die Messungen wurden entweder die Komplex II Aktivität, da Krankheiten im Zusammenhang mit dem Komplex II nur sehr selten auftreten und dieser nuklear kodiert wird, oder die Citratsynthase Aktivität verwendet. Abhängig von der Stabilität der Enzymaktivitäten in den jeweiligen Zelllinien wurde ein Marker gewählt, um ein Verhältnis mit den übrigen Komplexaktivitäten zu bilden und so einen Vergleich innerhalb der Gruppen (z.B. Kontrolle vs. Patient) zu ermöglichen. Die Citratsynthase wurde bestimmt, indem nicht das Citrat direkt, sondern das Nebenprodukt CoA-Thiol aus der Reaktion von Oxalacetat und Acetyl-CoA detektiert wurde. Das CoA-Thiol reagierte mit dem Elmansreagenz DTNB [5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)] zu einem Merkaptidion mit starker Adsorption bei 412 nm, so dass man auf die Citratsynthaseaktivität rückschließen konnte (Srere, 1969).

3.2.8 Polarografische Respirationsmessung von MEF Zellen

OPA1 wildtyp (OPA1^{+/+}: MEF_wt) and homozygote knockout (OPA1^{-/-}: MEF_ko) MEF Zellen wuchsen bis zur Konfluenz, wurden trypsiniert, pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte direkt vor der Messung mit 50 µg/ml Digitonin für 30 s und wurde mittels Trypanblau Ausschlusstest überprüft. Waren die Zellen blau gefärbt, war die Permeabilisierung lebender Zellen, die im Normalzustand Trypanblau nicht aufnehmen, erfolgreich. 8×10^6 Zellen wurden in die Reaktionskammer (WPI, Sarasota, USA) injiziert und die Sauerstoffkonzentration wurde in 1 ml Reaktionsvolumen bei 37°C gemessen, gemäß dem Standardprotokoll (Hofhaus et al. 1996). Sukzessiv wurden Substrate und Respirationskomplex-Inhibitoren in die luftdicht geschlossene Kammer injiziert.

Alle Messungen wurden mindestens 3-mal wiederholt.

Schritt	Zugabe von Substrat bzw. Komplexinhibitor	Komplexaktivitätsbestimmung
---------	---	-----------------------------

1.	Je 7,5 µl Malat, Glutamat	Komplex 1,-3,-4
2.	Rotenon	Komplex 1 Inhibitor
3.	Je 7,5 µl Succinat, Glycerol-3-Phosphat	Komplex 2, -3,- 4
4.	Antymycin A	Komplex 3 Inhibitor
5.	15 µl Ascorbat + 7,5 µl TMPD	Komplex 4
6.	7,5 µl KCN	Inhibierung gesamter Respiration
7.	100 µl Dithionit (DT)	Sauerstoff Nulllinie

Tab. 15: Schritte bei der polarografischen Messung der Respirationskette.

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war (Zeiss Plan Neofluar, 1000x, numerische Apertur 1,3). Digitale Aufnahmen der untersuchten Zellen wurden mit einer CCD-Kamera (Zeiss) bei Raumtemperatur erstellt. Die Auswertung erfolgte über die AxioVision (Zeiss) und Photoshop (Adobe) Software.

3.3.2 Elektronenmikroskopie (EM)

EM-Aufnahmen wurden in Kooperation von Fr. Schrader (Charite, Berlin) und Fr. Dr. Erdmann (MDC, Berlin) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 800xg, 5 min zentrifugiert mit Fixans (5% Glutaraldehyd) resuspendiert und dann 3 x 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1,5 h mit 2% OsO₄, dann wurde 2 x 10 min mit Cacodylatpuffer gespült. Anschließend wurde 100 ml Zellsuspension in ca. 100 ml 2% Agarose eingebettet. Das erstarrte Pellet wurde nun in kleine Stücke von ca. 1-2 mm Kantenlänge geschnitten. Folgende Schritte schlossen sich an:

Reagenz	Inkubationszeit
---------	-----------------

50 % Ethanol	15 min
70 % Ethanol	2 x 10 min
95 % Ethanol	2 x 10 min
100 % Ethanol	3 x 10 min
Aceton , reinst	2 x15 min
Aceton / Epon Gemisch(2:1)	1 h
Aceton / Epon Gemisch (1:1)	1 h
Aceton / Epon Gemisch (1:2)	1 h
reines Epon	über Nacht

Tab. 16: Inkubationsschritte am ersten Tag der Zellpräparation für das EM

Die einzelnen Probenstücke wurden in entsprechende Einbettformen (z.B. Beemkapseln) überführt, mit frischem reinen Epon aufgefüllt und 48 h bei 60°C auspolymerisiert. Nach zwei Tagen wurden die Einbettformen entfernt. Der verfestigte Eponblock mit der Probe wurde anschließend getrimmt. Es wurden Semidünnschnitte ($d= 0,5\mu\text{m}$) mit einem Leicamesser des Gerätes RM 2065 hergestellt und mit Richardson Lösung (Methylen/Azurblau) gefärbt. Nach kurzer Prüfung der Semidünnschnitte wurden Ultradünnschnitte ($d= 60\text{-}70\text{ nm}$) mit Ultra Cut-S Leica auf Ni- oder Cu-Gittern hergestellt. Die so erhaltenen Gitter wurden mit 5% Uranylacetat 15 min kontrastiert und anschließend mit dest. Wasser gewaschen. Nach der Färbung nach Reynolds mit Pb-Citrat für 4 min wurden die so erhaltenen Schnitte getrocknet und mit EM 905 von Zeiss mikroskopiert. Die Messungen der Cristae und Mitochondrienflächen erfolgten über das Programm AnalySIS.

3.4 Statistische Auswertung

Der *Mittelwert* \bar{x} gibt den durchschnittlichen mittleren Wert einer Datenreihe an. Er ist der Quotient aus der Summe der Einzelwerte x_i und der Anzahl der Beobachtungen n :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Um festzustellen wie stark die Werte streuen, wurde die Standardabweichung bestimmt. In der Statistik ist die *Varianz* ein Streuungsmaß für die Abweichung einer Zufallsvariable von ihrem Erwartungswert. Die Varianz ist die Summe der quadrierten Abweichungen der Einzelwerte x_i der Versuche vom Mittelwert \bar{x} dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen n minus 1. Da die Varianz eine andere Einheit als die Werte besitzt, wird die Quadratwurzel gezogen, so dass man die *Standardabweichung* (StAbw) erhält.

$$\text{Varianz} = \frac{\sum (x - \bar{x}_i)^2}{n}$$

$$\text{StAbw} = \sqrt{\frac{n-1}{n} \text{Varianz}}$$

Für die Darstellung der Daten wurden Balkendiagramme mit eingetragenen Standardabweichungen oder Boxplots verwendet. In einer Boxplot Darstellung entspricht die Ausdehnung der Box dem Bereich zwischen 1. und 3. Quartil, umfasst damit die Hälfte der Fälle. Der *Median* gibt den Wert an unter den 50% der Werte liegen. Quartile sind spezielle Perzentile. Das 50% Perzentil gibt den Median an, während das 25% Perzentil den Wert angibt, unter dem 25% und über 75% aller Fälle liegen, das *untere Quartil*. Das 75% Perzentil bezeichnet man auch als *oberes Quartil*. Balken geben die kleinsten bzw. größten gemessenen Werte wieder. Ausreißer (Abweichung um mehr als 1,5x Boxlänge vom oberen bzw. unteren Quartilwert) werden mit einem Kreis, Extremwerte (Abweichungen um mehr als 3x Boxlänge) mit einem Stern markiert. Liegt der Median nicht mittig, ist die Verteilung unsymmetrisch. Aufgrund der Quadrierung der Abweichungen kann die Varianz von Ausreißern und Extremwerten stark beeinflusst werden, so dass dann oft der weniger effiziente Median herangezogen wird. Die Bestimmung der Normalverteilung erfolgte über ein Histogramm. Für die Berechnung der signifikanten Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen (z.B. gesund-krank; Wildtyp-Mutante) wurde bei fehlender Normalverteilung der nicht-parametrische Mann-Whitney Test verwendet. Der Mann-Whitney-Test ("U-Test") dient zur Überprüfung, ob zwei unabhängige Verteilungen A und B (z.B. gesund und krank) zu derselben Grundgesamtheit gehören. Der Test wurde von Henry Mann und Donald Whitney (1947) sowie Frank Wilcoxon (1945) entwickelt und wird deshalb auch MWW-Test genannt. Signifikante Unterschiede bestehen bei zweiseitiger Signifikanz mit $\alpha < 0,05$ bzw. für Transfektionsexperimente mit sieben verschiedenen OPA1 Mutanten mit $\alpha < 0,005$. Die statistischen Berechnungen und Boxplot Darstellungen erfolgten mittels SPSS Software Programm.

Bei nicht weiter aufgeführten Anwendungen wurden die Protokolle der Herstellerfirma verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Mutationen in der OPA1 GTPase-Domäne verändern die GTP-Hydrolyseaktivität

Um die Auswirkungen von pathogenen Mutationen in der OPA1 GTPase Domäne zu studieren, wurden in adOA Patienten beschriebene Punktmutationen in die wildtyp Sequenz der OPA1-cDNA (KIAA0567) eingeführt (Tab.8).

Name	Aminosäureaustausch	GTP-Bindungs-Motiv	Referenz
270GTP	Glu270Lys	G1	Pesch <i>et al.</i> , 2001
290GTP	Arg290Trp	G1	Pesch <i>et al.</i> , 2001
300GTP	Gly300Glu	G1	Toomes <i>et al.</i> , 2001
323GTP	Thr323Ala	G2	abgeleitet nach Frank <i>et al.</i> , 2001
396GTP	Leu396Arg	G3	Delettre <i>et al.</i> , 2000
503GTP	Thr503Lys	nach G4	Thiselton <i>et al.</i> , 2002

Tab. 17: Liste der OPA1 GTPase Mutanten; Definition der Bezeichnungen, der Mutation (Position, Aminosäure), beeinflusster Ort im GTP-Bindungs-Motiv und entsprechende Referenz zu der Mutationen.

Die Aminosäuren 268-613 kodierten für die OPA1 GTPase Domäne. Dieser Sequenzabschnitt wurde in den pet21d Bakterienexpressionvektor kloniert und die Expression der GTPase Domäne (ca. 39 kDa) induziert. Über einen C-terminalen His-Tag wurden die Proteinfragmente auf einer Nickelsäule gereinigt (Abb.11B). Die Konzentration des eluierten Proteins lag abhängig vom Grad der Aufkonzentrierung zwischen 0,4-0,8 mg/μl bei einer Reinheit von durchschnittlich 90% (Abb.11).

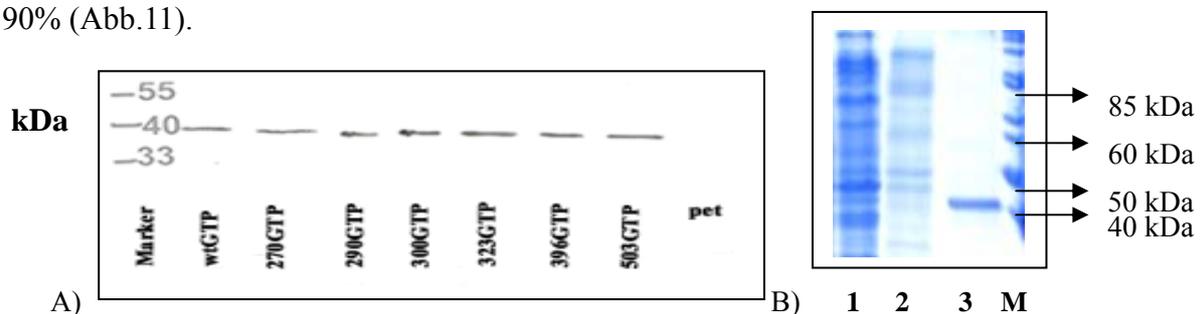


Abb. 11: A) Western Blot der exprimierten OPA1 GTPase Mutanten; Detektion mittels anti-OPA1; pet: Leervektor. B) SDS-PAGE. 1: auf die Säule geladenes Proteinlysate; 2: Fraktion nach dem Waschen der Säule; 3: Eluat aufkonzentriert; M: Proteinmarker.

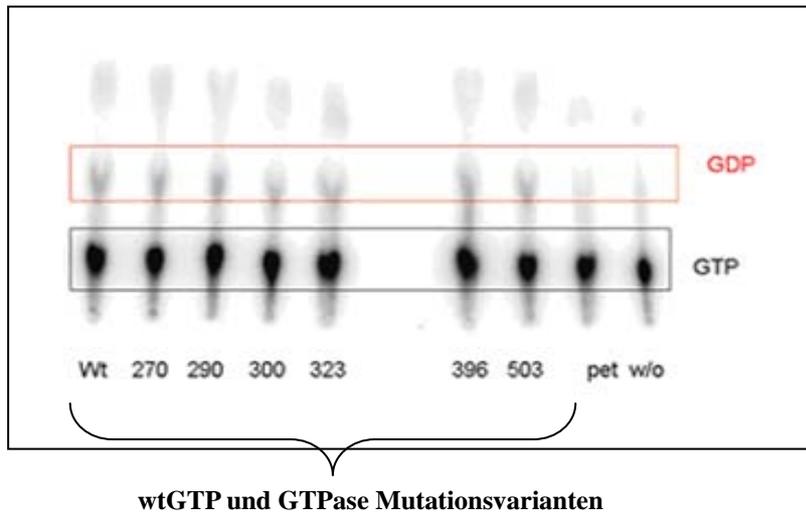


Abb. 12: Aktivitätsmessung der OPA1 GTPase Domänen; Wt-Wildtyp, Zahlen stehen für die GTPase Mutationsvarianten, s.o.; pet: Leervektor; w/o: Wasserkontrolle; GTP: radioaktives GTP; GDP: radioaktives GDP

Die Aktivität der GTPase Mutanten wurde über den Umsatz von radioaktiv markiertem GTP zu GDP+P bestimmt (Abb.12; Kap.3.1.16).

Die Intensität der Signale wurde über ImageQuant quantitativ bestimmt. Durch Subtraktion der Intensität der Selbsthydrolyse (pet-Leervektor) von den jeweiligen Umsatzintensitäten der GTPase-Varianten, ergab sich folgende Hydrolyseaktivität in Prozenten (Abb.13):

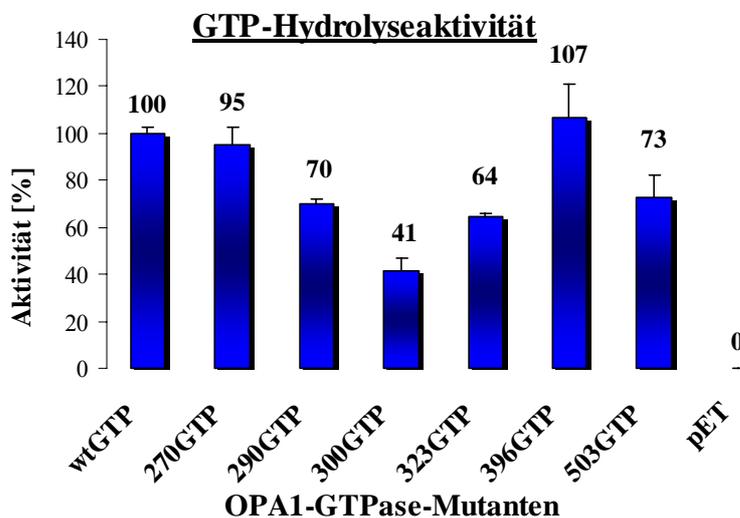


Abb. 13: Hydrolyseaktivität [%] der OPA1 GTPase-Varianten ermittelt aus je 3 unabhängigen Messungen; Standardabweichungen markiert

Während die Mutation 270GTP mit 95% eine ähnliche Hydrolyseaktivität wie die wildtyp OPA1-GTPase (100%) aufwies, zeigten 290GTP mit 70%, 323GTP mit 64% und 503GTP mit 73% einen um 30% bis 40% reduzierten GTP-Umsatz (Abb.13). Ein außergewöhnlicher Aktivitätsverlust wurde für 300GTP mit nur 41% gemessen. Unerwartet hoch war hingegen die Aktivi-

tät für 396GTP mit 107%. Damit zeigten OPA1 GTPase Mutanten mit einer Substitution von einer hochkonservierten Aminosäure die größten Abweichungen zur wildtyp GTPase Aktivität.

4.2 OPA1 in HeLa und MEF Zellen

4.2.1 OPA1 Lokalisation

Ein wesentlicher Faktor für das Verständnis der Funktion von OPA1 ist die Klärung seiner Lokalisierung. Die OPA1 Isoformen liegen in den Mitochondrien sowohl löslich im intermembranen Raum (IMS) als auch mit der Innenmembran (IMM) assoziiert vor. Dabei ist OPA1 über die vorhergesagte N-terminale Transmembrandomäne in der Innenmembran verankert und zeigt mit dem C-terminalen Teil in den IMS hinein (Olichon *et al.*, 2002; Griparic *et al.*, 2004; Frezza *et al.*, 2006).

In den in dieser Arbeit verwendeten HeLa und MEF Zellen wurden die Mitochondrien mittels MitoTracker oder mit Cytochrom C Antikörper und Alexa594 in rot gefärbt. Anschließend erfolgte der Nachweis mit OPA1 Antikörper und Alexa488 (grün), um auf Einzel-Zell-Ebene die Lokalisation des OPA1 Proteins zu betrachten (Abb.14, Abb.15). Die Farben wurden mittels entsprechendem Filtersatz getrennt aufgenommen und anschließend überlappt. Die Kolo-kalisation von OPA1 mit den Mitochondrien ließ sich durch Farbveränderung (grün+rot=gelb) feststellen (Abb.15).

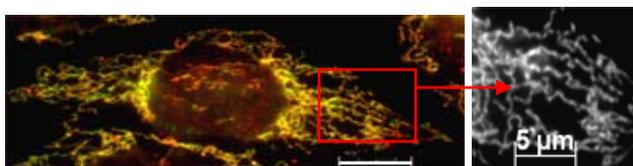


Abb. 14: Kolo-kalisation von OPA1 und mitochondrialem Marker in tubulären Mitochondrien in MEF_wt Zellen. rot: mOPA1; grün: MitoTracker Green; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien

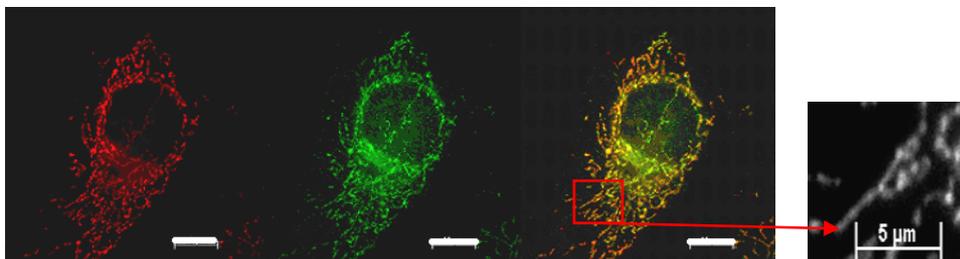


Abb. 15: Kolo-kalisation von OPA1 und mitochondrialem Marker in tubulären Mitochondrien in HeLa Zellen. rot: MitoTrackerRed; grün: OPA1; weißer Maßstab: 10µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm

Die OPA1- und die Mitochondrien-Färbung stimmten überein, wobei keine flächendeckende Überlappung der punktförmigen OPA1 Färbung mit den mitochondrialen Markern stattfand. Cytochrom C liegt im IMS und der Matrix der Mitochondrien vor, während MitoTracker hauptsächlich in der Matrix lokalisiert. Das Auflösungsvermögen eines Fluoreszenzmikroskopes (max. 1.000-facher Vergrößerung) ist nicht in der Lage die feinen subkompartimentelle Unterschiede (IMS, Matrix) und mögliche funktionsbedingte Konzentrierungen der Proteine in *foci* eindeutig aufzulösen (Misaka *et al.*, 2002).

In HeLa und wildtyp MEF (MEF_wt) Zellen wurden die Mitochondrien als längliche, vernetzte Fäden (Tubuli) sichtbar, die sich im gesamten zytoplasmatischen Raum um den Nukleus herum erstreckten (Abb.14, Abb.15). Die MEF Zellen zeigten dabei im Durchschnitt längere Mitochondrien als HeLa Zellen. Die transiente Kontroll-Transfektion mit dem Leervektor (pcDNA) führte zu keiner Veränderung der Zell- oder Mitochondrien Morphologie.

4.2.2 Überexpression von OPA1 Mutationsvarianten in HeLa Zellen verkürzen die Mitochondrien

Im Normalzustand weisen Zellen tubuläre Mitochondrien auf. In respirationsdefizienten MERRF Zellen (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007) und in apoptotischen Zellen (Kroemer *et al.*, 1998) wurde eine Verkürzung bis hin zur völligen Vesikulierung von Mitochondrien beobachtet. Mitochondrienverkürzungen können durch fehlende mitochondriale Fusionsprozesse entstehen. OPA1 ist ein mitochondriales Protein, das zusammen mit anderen Proteinen in die Mitochondrienfusion involviert ist (Cipolat *et al.*, 2004). Wie OPA1 die Fusion begünstigt, ist bisher unbekannt. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Dynaminfamilie vermutet man eine aktive Beteiligung der OPA1 GTPase Domäne während des Fusionsprozesses. Aus diesem Grund wurde die Mitochondrienmorphologie in mit OPA1 GTPase Mutanten transfizierten Zellen untersucht.

Die verschiedenen OPA1-Mutationskonstrukte im pcDNA Vektor (270OPA, 290OPA, 300OPA, 323OPA, 396OPA, 503OPA, 905OPA) sowie der Wildtyp (wtOPA) wurden in HeLa bzw. MEF Zellen transient transfiziert, um morphologische Veränderungen der Mitochondrien in den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten (Kap.3.2.5). Die transfizierten und fixierten Zellen wurden mit einer hohen OPA1 Antikörperverdünnung immungefärbt, so dass für endogenes OPA1 gegenüber den OPA1 exogen exprimierenden Zellen nur eine sehr schwache, kaum detektierbare Färbung auftrat. Dadurch konnten OPA1 überexprimierende Zellen (= transfizierte Zellen) mikroskopisch von den Zellen mit endogenem Expressionsniveau unterschieden werden. In beiden Zelltypen blieb dabei die spezifische Kofärbung der Mitochondrien (MitoTracker, Cytochrom C) unverändert (Kap.3.1.17).

Zur qualitativen Auswertung wurden die Erscheinungsformen der Mitochondrien eingeteilt in: tubulär-Stäbchen/globulär-vesikulär.

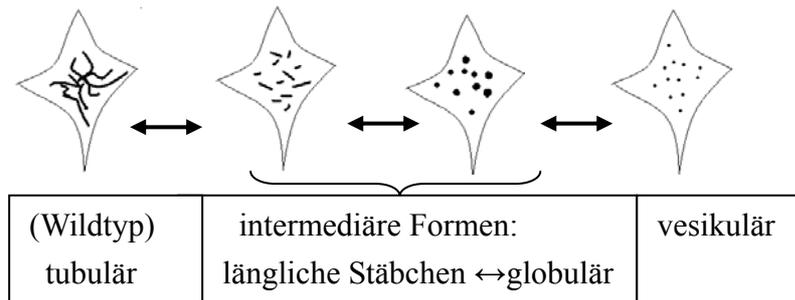


Abb. 16: Unterteilung der Mitochondrienmorphologien

Zur quantitativen Auswertung wurden die Morphologien der Mitochondrien Längenmaßen zugeordnet. Die Mitochondrien wurden mittels AxioVision Programm (Zeiss) vermessen und die erhaltenen Daten statistisch ausgewertet. Dadurch wurde der Vergleich der Auswirkungen der unterschiedlichen Konstrukte miteinander erleichtert. Die Mitochondrienformen wurden in vesikuläre (klein, rund; $l \leq 0,8 \mu\text{m}$), tubuläre (lang gestreckt; $l > 4,5 \mu\text{m}$) und die beiden intermediären Formen globulär (größer, rund; $l > 8 \mu\text{m} \leq 1,5 \mu\text{m}$) und Stäbchen (kurz, länglich; $l > 1,5 \leq 2,5 \mu\text{m}$ bzw. $4,5 \mu\text{m}$ für MEF Zellen) unterteilt (Abb.16). Grafisch am eindeutigsten konnte die Diversität an Formen und Längen anhand der mittleren Längen zusammen mit der Standardabweichung dargestellt werden.

Variabilität der Mitochondrienmorphologie nach Transfektion in HeLa Zellen

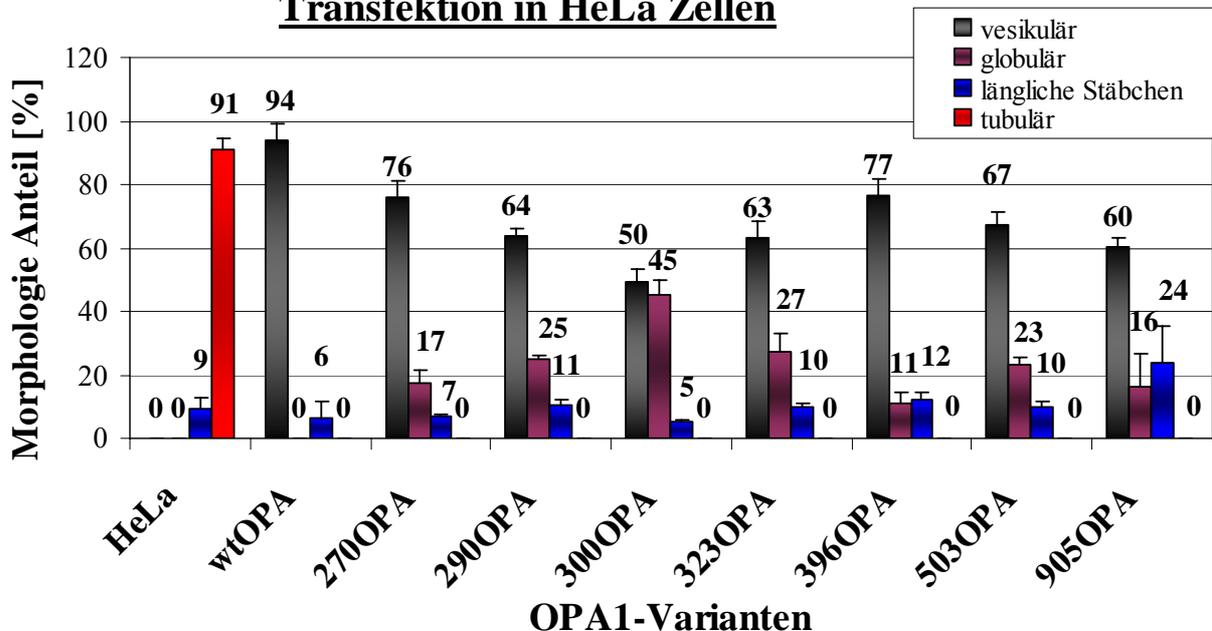


Abb. 17: Mitochondrienmorphologien [%] in unbehandelten (HeLa) und in HeLa Zellen nach Transfektion mit OPA1 Varianten; Balken repräsentieren die Standardabweichung; n=100 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten

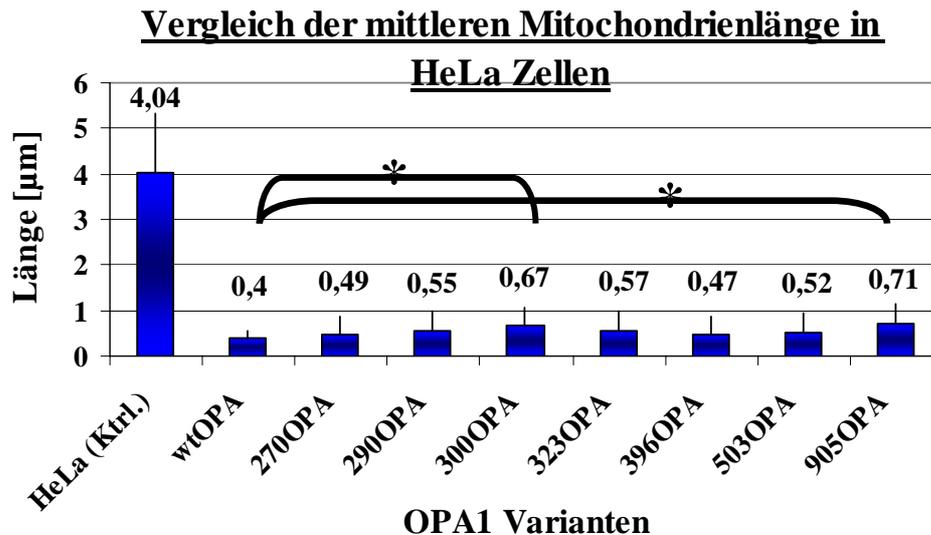


Abb. 18: Gemessene mittlere Länge der Mitochondrien in HeLa Zellen mit (re. Teil ab wtOPA) und ohne (Ktrl.) Expression von OPA1 Mutanten; Balken repräsentieren die Standardabweichung; je OPA1-Variante n=100 transfizierte Zellen aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; *: signifikanter Unterschied zwischen wtOPA und 300OPA (p=0,003) sowie 905OPA (p=0,000).

Auffällig war die einheitliche Dominanz der vesikulären Mitochondrien in allen exogen OPA1 exprimierenden Zellen.

Bei wtOPA Transfektion lagen im Durchschnitt 94% der Mitochondrien vesikulär vor, die zusätzlich oft in perinukleären Clustern aggregierten (Abb.17, Abb.19). Nur vereinzelt wurden noch längliche stäbchenförmige Mitochondrien gefunden.

Ähnliche morphologische Veränderungen wurden für 270OPA beobachtet. Jedoch führte die Transfektion mit der Mutation OPA1^{E270K} neben den vesikulären (76%) und stäbchenförmigen (7%) Mitochondrien zusätzlich zu (17%) globulären Mitochondrienstrukturen (Abb.17, Abb.20). Eine weitere leichte Zunahme der globulären Mitochondrien (25%) fand sich bei OPA1^{R290T} (290OPA; Abb.17, Abb.21). OPA1^{R290T} Zellen wiesen außerdem 11% stäbchenförmige und 64% vesikuläre Mitochondrien auf.

Herausstechend war die Mitochondrienmorphologie in OPA1^{G300E} überexprimierenden Zellen (Abb.17, Abb.22). Hier lagen die globulären und vesikulären Mitochondrien (45% bzw. 50%) in nahezu gleichen Anteilen vor. Daraus folgte auch der kleinste beobachtete Anteil an vesikulären (50%) Mitochondrien.

Die zweitstärkste globuläre Anhäufung (27%) an Mitochondrien fand sich in Zellen, die OPA1^{T323A} überexprimierten (Abb.17, Abb.23). Der Anteil stäbchenförmiger Mitochondrien lag bei 10%. Der Anteil vesikulärer Mitochondrien (ca. 63%) war vergleichbar mit OPA1^{R290T}-HeLa Zellen (64%).

Bei OPA1^{L396R} exprimierenden Zellen konnten nur sehr geringe Anteile an globulären (11%) und stäbchenförmigen (12%) Mitochondrien gesehen werden. Stattdessen lag die Mehrheit der Mitochondrien (77%) vesikularisiert vor (Abb.17, Abb.24). Dieser Phänotyp ähnelte dem der OPA1^{E270K} transfizierten Zellen.

Die Expression von OPA1^{T503K} führte zu 67% vesikulären, 23% globulären und 10% stäbchenförmigen Mitochondrien (Abb.17, Abb.25). Diese Werte ähnelten dem mitochondrialen Phänotyp der OPA1^{R290W} exprimierenden Zellen.

Die stärkste Morphologievarianz und Standardabweichung wurde für OPA1^{905STOP} beobachtet, das als einziges Protein mehr stäbchenförmige (ca. 24%) Mitochondrien als globuläre (ca. 16%) induzierte. Aber auch hier war die am häufigsten gebildete Form die vesikuläre Form (60%; Abb.17, Abb.26, Abb.27).

Neben den Morphologieformen wurde zur statistischen Auswertung die Mitochondrienlängen der transfizierten Zellen unter Verwendung des AxioVision Programmes (Zeiss) ausgemessen. Das ermöglichte den Vergleich der mittleren Mitochondrienlängen, die durch exogene Expression der verschiedenen OPA1 Konstrukten resultierte. Die breite Varianz der Mitochondrienlängen in den transfizierten Zellen wurde anhand der hohen Standardabweichungen der gemessenen Längen deutlich, bei der wtOPA die geringste Standardabweichung aufwies (Abb.18). Für die OPA1 Mutationsvarianten hingegen wurden Standardabweichungen von über 50% gemessen. Während wtOPA im Durchschnitt zur Fragmentierung und zu kleinen Organellen von $0,4 \pm 0,15 \mu\text{m}$ führte, vergrößerten sich die Mitochondrienlängen bei den Mutationsvarianten auf bis zu $0,67 \pm 0,41 \mu\text{m}$ für OPA1^{G300E} und $0,71 \pm 0,45 \mu\text{m}$ für OPA1^{905STOP}. Insgesamt zeigten sich im Hinblick auf die mittleren Mitochondrienlängen Ähnlichkeiten zwischen wtOPA ($0,4 \mu\text{m}$), OPA1^{R270T} ($0,49 \mu\text{m}$), OPA1^{L396R} ($0,47 \mu\text{m}$) einerseits und OPA1^{R290W} ($0,55 \mu\text{m}$), OPA1^{T323A} ($0,57 \mu\text{m}$) und OPA1^{T503K} ($0,52 \mu\text{m}$) andererseits. OPA1^{905STOP} ($0,71 \mu\text{m}$), das keine Mutation in der GTPase Domäne besaß, sondern zu einem verfrühten Stopcodon und damit zu einem OPA1 Protein ohne CC2 Domäne führte, zeigte Ähnlichkeiten in der mittleren Mitochondrienlänge mit OPA1^{G300E} ($0,67 \mu\text{m}$). Durch den vergleichbar hohen Anteil an intermediären Stäbchen konnte die höchste Durchschnittslänge von $0,71 \pm 0,45 \mu\text{m}$ für das CC2 defiziente Konstrukt gemessen werden. Die Berechnungen nach Mann-Whitney zeigten für 300OPA und 905OPA einen signifikanten Unterschied zu wtOPA in HeLa Zellen.

Aus den Beobachtungen war ersichtlich, dass alle OPA1 GTPase Mutationsvarianten in HeLa Zellen zu unnatürlich kurzen Mitochondrien führten. Es konnten keine tubulären Mitochondrien in transfizierten Zellen gesehen werden. Die veränderten GTPase Aktivitäten führten deutlich zu Morphologieveränderungen der Mitochondrien. Die transfizierten Zellen, die die Mutante

300OPA mit der niedrigsten gemessenen GTPase Aktivität exprimierten (Kapitel 4.1), besaßen signifikant verkürzte Mitochondrien. Es konnten ähnliche Anteile an Mitochondrienformen zwischen den Konstrukten 270OPA und 396OPA, sowie zwischen 290OPA, 323OPA und 503OPA beobachtet werden. Neben der GTPase Domäne hatte auch die CC2 Domäne entscheidenden Einfluss auf die Mitochondrienstruktur. Das CC2 Domänen defiziente OPA1 Konstrukt 905OPA führte ebenfalls zu einer signifikanten Veränderung der Mitochondrienmorphologie. Die Streuung der Mitochondrienlängen konnte auf die hohe Vielfalt der intermediären (globulär, stäbchenförmig) Mitochondrienstrukturen zurückgeführt werden. Die hohe Streubreite beruht vermutlich auf Nebenreaktionen durch das in HeLa Zellen endogen exprimierte OPA1 Proteinreservoir.

4.2.2.1 Überexpression von wtOPA1 in HeLa

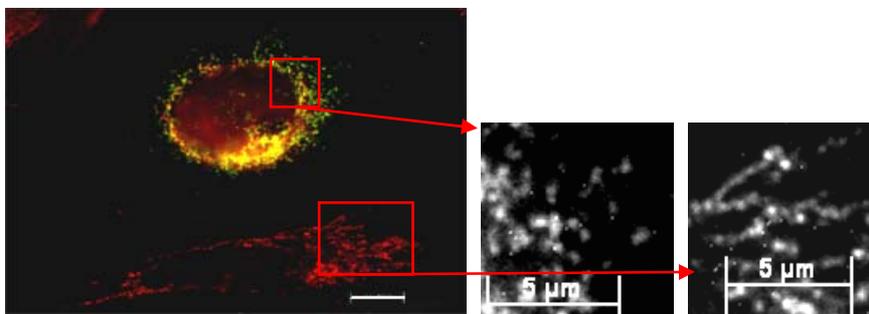


Abb. 19: Transfektion von wtOPA in HeLa Zellen führt zur fast vollständigen Vesikulierung aller Mitochondrien. rot: MitoTrackerRed, grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm bzw. markierte 5 µm; Box: Vergrößerung.

4.2.2.2 Überexpression von 270OPA in HeLa

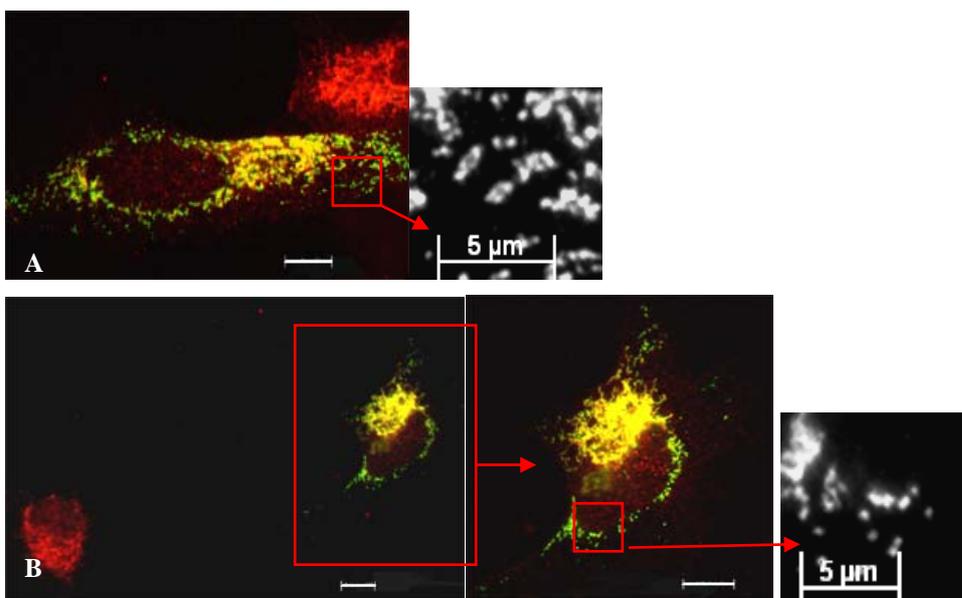


Abb. 20: A, B Transfektion von 270OPA in HeLa Zellen ergibt einen sehr hohen Anteil vesikulärer Mitochondrien bei einem Restanteil von einem Viertel an intermediären, globulären Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.2.3 Überexpression von 290OPA in HeLa

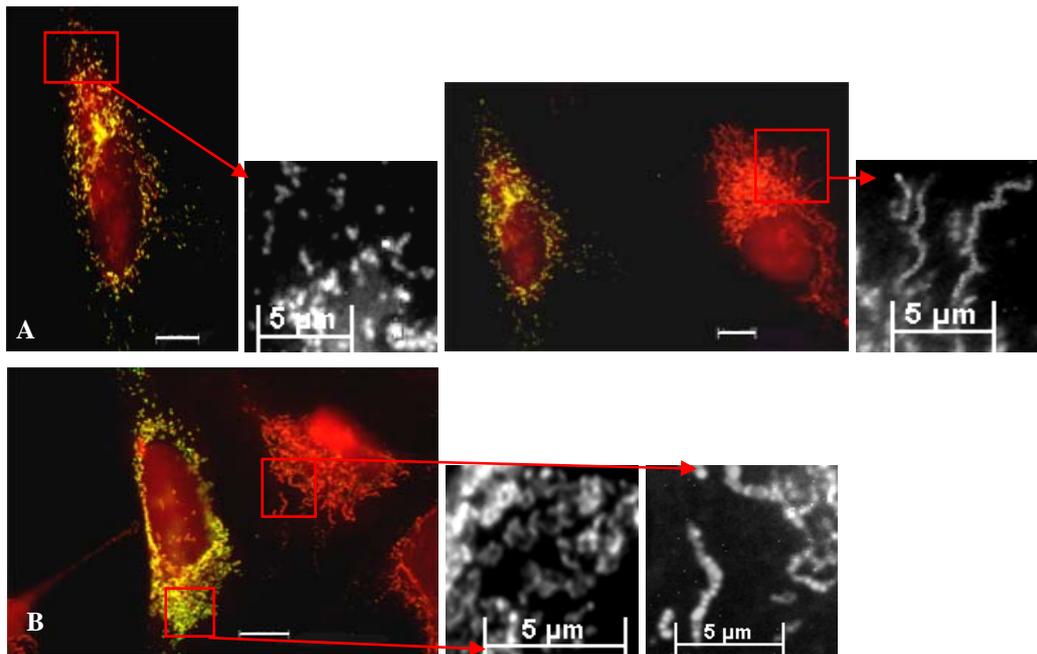


Abb. 21: A, B Transfektion von 290OPA in HeLa Zellen führt in ¼ der Zellen zu globulären und einem Hauptanteil an vesikulären Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.2.4 Überexpression von 300OPA in HeLa

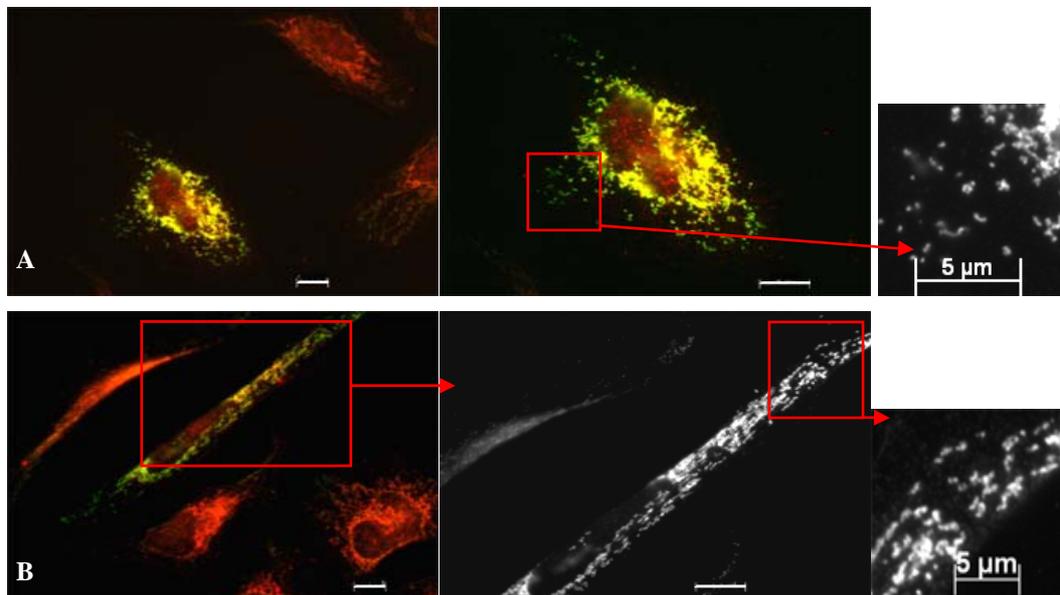


Abb. 22: A, B Transfektion von 300OPA in HeLa Zellen ergab in bis zu 49% vesikuläre und 45% der Zellen globuläre Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.2.5 Überexpression von 323OPA in HeLa

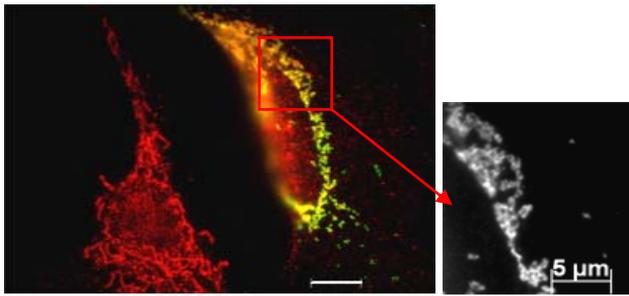


Abb. 23: Transfektion von 323OPA in HeLa Zellen ergab neben vesikulären in ca. $\frac{1}{4}$ der Zellen globuläre Mitochondrien. rot: Cytochrom C94, grün: OPA1; weißer Balken: 10 μm oder markierte 5 μm ; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.2.6 Überexpression von 396OPA in HeLa

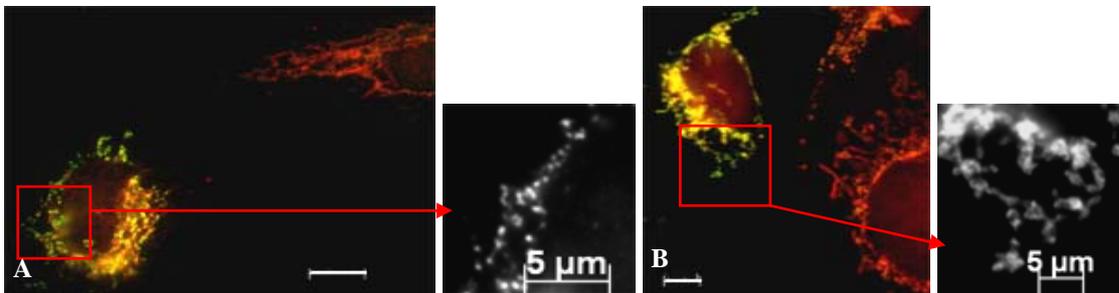


Abb. 24: A, B Transfektion von 396OPA in HeLa Zellen führte zum größten Teil zu vesikulären und in $\frac{1}{3}$ der Zellen zu intermediären (globulären, länglichen) Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 μm oder markierte 5 μm ; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.2.7 Überexpression von 503OPA in HeLa

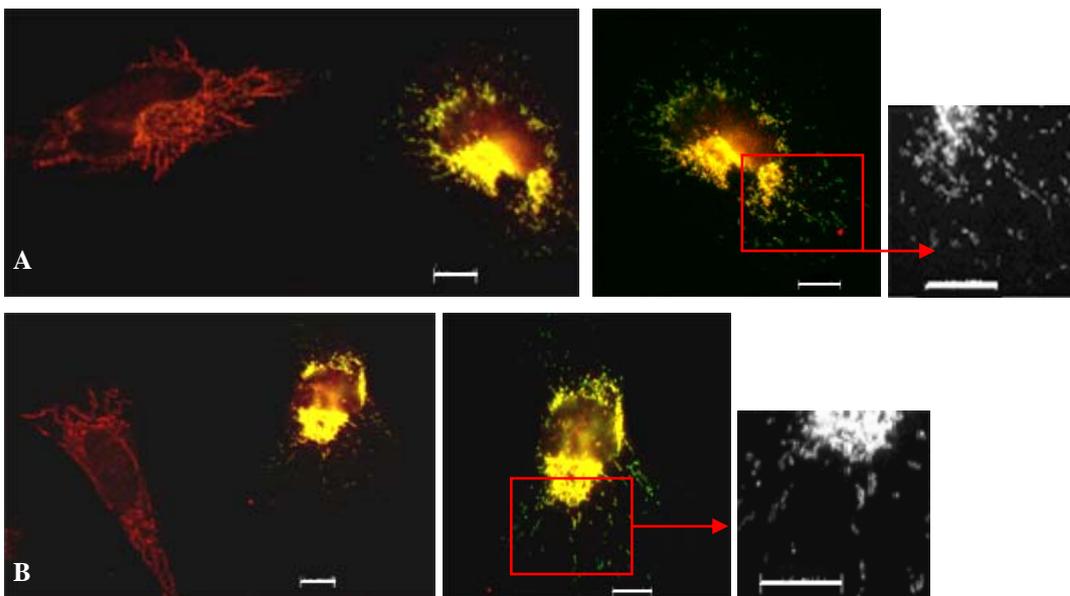


Abb. 25 A, B: Transfektion von 503OPA in HeLa Zellen zum größten Teil zu vesikulären und in $\frac{1}{3}$ der Zellen zu intermediären Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 μm oder markierte 5 μm ; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.2.8 Überexpression von 905OPA in HeLa

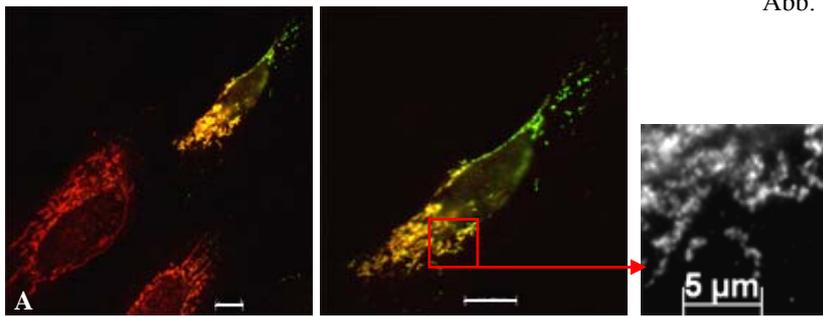


Abb. 26: Transfektion von 905OPA in HeLa Zellen führt in 40% der Zellen zu globulären und länglichen (intermediären) Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien

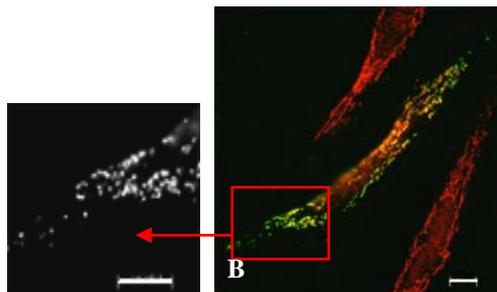


Abb. 27: Transfektion von 905OPA in HeLa Zellen ergab in den meisten Zellen vesikuläre Mitochondrien. rot: Cytochrom C, grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.3 OPA1 Mutationen führen zu drastischen Veränderungen der Mitochondrienmorphologie in OPA1^(-/-) MEF Zellen

Aus einem OPA1-defizienten Mausmodell konnten aus Maus Embryonen Fibroblasten (MEF) gewonnen werden. Diese OPA1^(-/-) (MEF_ko) Zelllinie ist weltweit die erste OPA1 defiziente Zelllinie (Song *et al.*, 2007). Die Abwesenheit aller OPA1 Isoformen in den MEF_ko (OPA1^{-/-}) Zellen wurde in der Western Blot Analyse (Abb. 28) und immunohistochemisch auf Einzel-Zellebene (Abb.32) gezeigt.

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal diese OPA1 defizienten Zelllinie (MEF_ko) genutzt werden, um individuell einzelne OPA1 Mutationsvarianten vor einem genetischen OPA1 null Hintergrund zu untersuchen. Die Mutationskonstrukte wurden über FuGene 6 vermittelte Transfektion transient exprimiert. Während die MEF_wt Zellen im Normalzustand ein tubuläres mitochondriales Netzwerk aufwiesen (Abb.29, Abb.30), in dem Cytochrom C, OPA1 und MitoTracker kolokalisierten, wiesen die MEF_ko (OPA1 defizienten) Zellen nur ungleichförmige, vesikuläre Mitochondrien auf, ohne spezifische OPA1 Immuno-Färbung (Abb.31, Abb.32). Die Lokalisation der anderen verwendeten mitochondrialen Marker (MitoTracker, Cytochrom C) ist nicht beeinträchtigt. Aufgrund der größeren globulären Mitochondrienstrukturen und auf der EM Ebene sichtbaren aufgequollenen Mitochondrien mit rudimentären, unorganisierten Cristae-Strukturen (Abb.33) wäre zu vermuten, dass die Respirationskomplexe (OXPHOS) oder das mitochondriale Energiegenerierungssystem (MEGS: Pyruvatdehydrogenase Komplex, Citratzyklusenzyme, ANT) beeinträchtigt sind.



Abb. 28: Western Blot von ca. 50 μ g Proteinextrakt aus MEF_wt und MEF_ko Zellen zeigen fehlendes OPA1 Protein in MEF_ko Zellen. Detektion mittels OPA1 Antikörper.

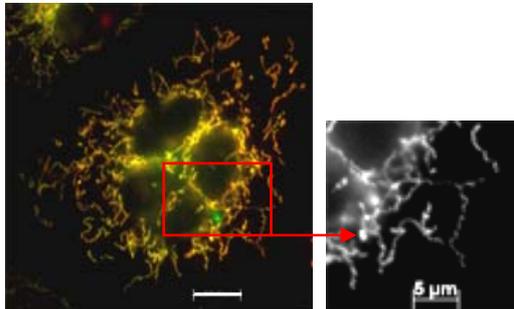


Abb. 29: MEF_wt Zellen zeigen tubuläres Mitochondrien-Netzwerk. rot: Cytochrom C; grün: MitoTrackerGreen; weißer Balken: 10 μ m oder markierte 5 μ m; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

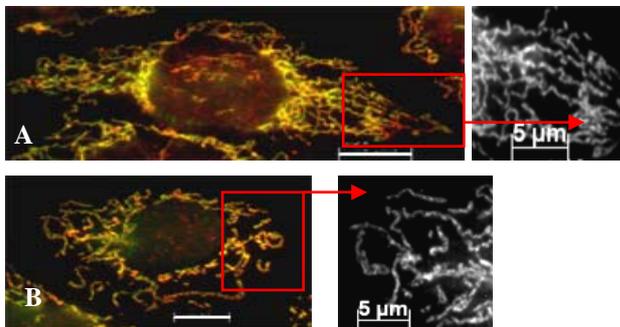


Abb. 30: A, B In MEF_wt lokalisiert OPA1 in den Mitochondrien. rot: mOPA1; grün: MitoTracker Green; weißer Balken: 5 bzw. 10 μ m; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

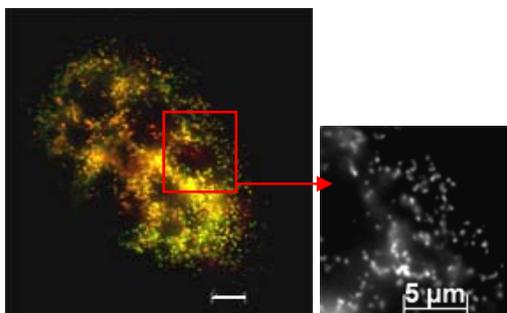


Abb. 31: MEF_ko Zellen besitzen vesikuläre Mitochondrien. rot: MitoTrackerRed; grün: Cytochrom C; weißer Balken: 10 μ m oder markierte 5 μ m; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

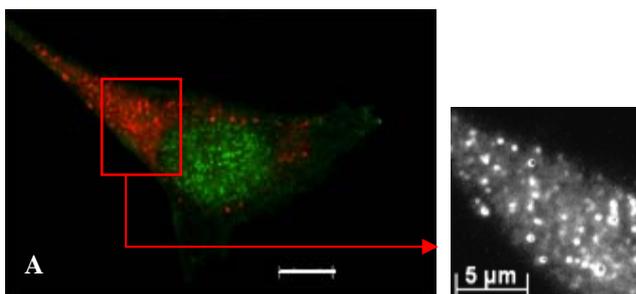
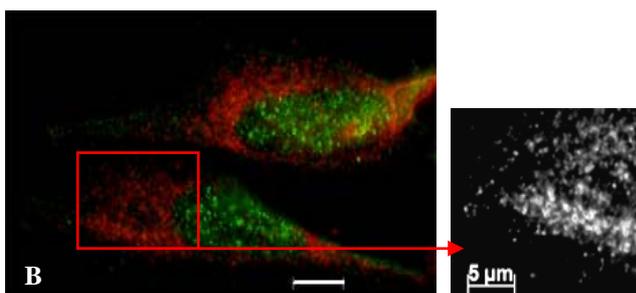


Abb. 32: A, B In MEF_ko Zellen konnte keine Färbung mit OPA1 Antikörpern festgestellt werden. rot: Cytochrom C; grün: mOPA1; weißer Balken: 10 μ m oder markierte 5 μ m; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.



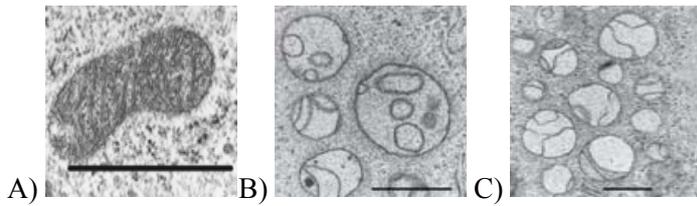


Abb. 33: EM Aufnahmen von MEF Zellen. A) Kontrolle. B), C) MEF_ko Zellen zeigen aufgequollen Mitochondrien und unorganisierte, rudimentäre Cristae; schwarzer Balken: 1 μ m.

Es wurde geprüft, ob die Expression von wildtyp OPA1 in MEF_ko Zellen die wildtyp-artige, tubuläre Mitochondrienmorphologie wiederherstellt, wie sie in MEF_wt Zellen vorherrscht.

Variabilität der Mitochondrienmorphologie nach Transfektion in MEF ko Zellen

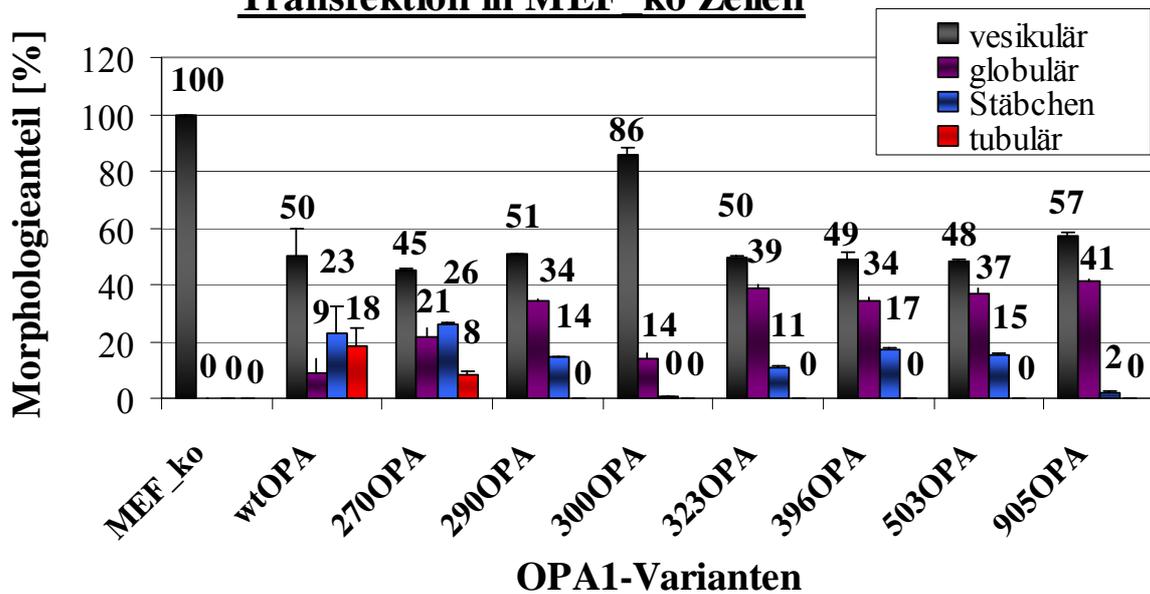
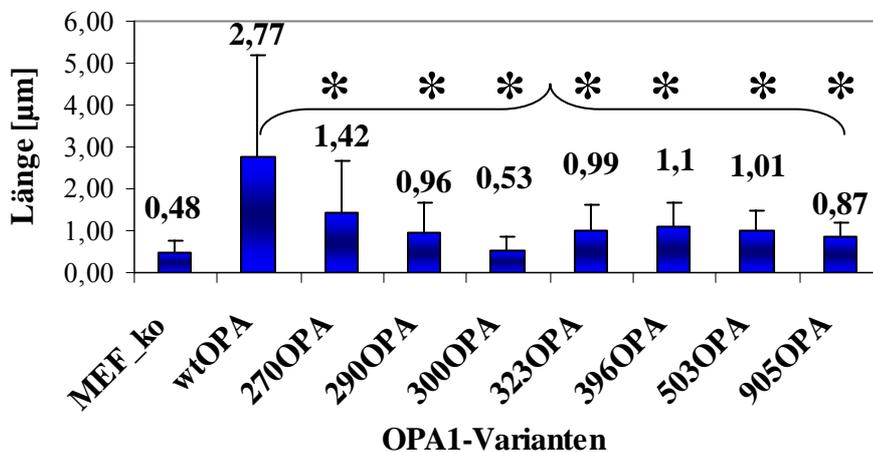
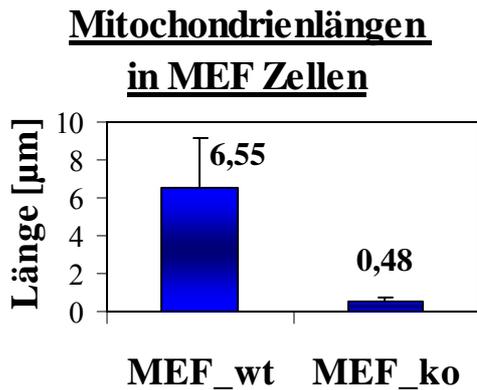


Abb. 34: Morphologie Verteilung von unbehandelten und mit OPA1 Varianten transfizierten MEF_ko Zellen. Balken repräsentieren die Standardabweichung; je Konstrukt wurden n=100 transfizierte Zellen aus mind. 3 unabhängigen Versuchen zu Grunde gelegt.

Vergleich der mittleren Mitochondrienlänge nach Transfektion in MEF_ko Zellen



A)



B)

Abb. 35: A) Mittlere Mitochondrienlängen in unbehandelten (MEF_ko) und OPA1 Mutanten exprimierenden MEF_ko und Zellen; je Konstrukt erfolgten n=100 Messungen aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. *: signifikanter Unterschied (p=0,000) wurde zwischen allen OPA1 Mutanten zu wtOPA gemessen. B) Mittlere Mitochondrienlänge in unbehandelten MEF_wt und MEF_ko; n=100 Messungen; Balken: Standardabweichung.

Tatsächlich konnte eine Wiederherstellung der wildtypartigen tubulären Strukturen nach Transfektion mit dem Wildtyp OPA1 und einer der OPA1 Mutanten beobachtet werden. In wtOPA Zellen waren ca. 18% der Mitochondrien tubulär. 50% der Zellen, die wtOPA exprimierten, blieben vesikulär, 9% globulär und 23% besaßen stäbchenförmige Mitochondrien (Abb.34, Abb.36). Neben dem wtOPA Konstrukt zeigte als einzige Mutante 270OPA ebenfalls ein Wiederherstellungspotenzial mit 8% tubulären Mitochondrien (Abb.34, Abb.37). In OPA1^{R270T} transfizierten MEF_ko Zellen wurde neben den tubulären als zweitgrößte Fraktion die intermediären Stäbchen mit 26% gezählt (Abb.34, Abb.37). Damit war dieses Mutationskonstrukt dem mitochondrialen Phänotyp von wtOPA am ähnlichsten. Alle anderen Mutanten waren nicht in der Lage tubuläre Mitochondrien wiederherzustellen.

In mit OPA1^{R290W} transfizierten MEF_ko Zellen (Abb.34, Abb.38) konnten 51% vesikuläre, 34% globuläre und 14% stäbchenförmige Mitochondrien beobachtet werden. Bei der Mutante OPA1^{T323A} wurden 50% vesikuläre 39% globuläre und 12% stäbchenförmige Mitochondrien gezählt (Abb.35A, Abb.40). In OPA1^{L396R} MEF_ko Zellen konnten 49% vesikuläre, 34% globuläre und 17% stäbchenförmige Mitochondrien festgestellt werden (Abb.34, Abb.41). Zu 48% vesikuläre, 37% globuläre und 15% stäbchenförmige Mitochondrien führte die Expression von OPA1^{T503K} (Abb.34, Abb.42). Damit ergab sich eine hohe Ähnlichkeit der Anteile an Mitochondrienformen für die Mutanten OPA1^{R290W}, OPA1^{T323A}, OPA1^{L396R} und OPA1^{T503K}.

Trotz der Unterteilung in vier Klassen erschwerte die hohe Variabilität der verschiedenen Mitochondrienformen die Möglichkeit die unterschiedlichen Expressionstypen in Gruppen zu fassen. Der mitochondriale Phänotyp der OPA1^{G300E} Mutante erwies sich in MEF_ko Zellen als ebenso markant wie in HeLa Zellen. So waren die Mitochondrien der MEF_ko, in denen OPA1^{G300E} exprimiert wurde, zu 86% vesikulär, mit einem kleinen globulären Anteil von 14% und einem verschwindend geringen Anteil länglicher Formen (Abb.34, Abb.39). Daher konnte diese Mutante nicht eingruppiert werden.

Auch eine eindeutige Zuordnung von OPA1^{905STOP} exprimierenden MEF_ko Zellen war nicht möglich (Abb.34, Abb.43). Durch den hohen Anteil vesikulärer Formen (57%) bestand eine Ähnlichkeit von 905OPA mit den übrigen Mutationskonstrukten. Jedoch konnte das Konstrukt durch die nahezu fehlenden stäbchenförmigen Mitochondrien bei vergleichbar hohem Anteil globulärer Formen (41%) den anderen OPA1 Mutanten nicht zugeordnet werden (Abb.34). Anders als in HeLa transfizierten Zellen, wo OPA1^{905STOP} der Gruppe der 290OPA /323OPA /503OPA exprimierenden Zellen deutlicher ähnelte.

Wie bei den HeLa Zellen wurden zur quantitativen Auswertung die Mitochondrienlängen für alle OPA1 Konstrukte mit dem AxioVision Programm (Zeiss) vermessen. Entsprechend der Morphologieverteilung zeigten sich auch Ähnlichkeiten in den Mittelwerten der gemessenen Mitochondrienlängen (Abb.35A). Während die mittleren Längen bei 270OPA (1,42µm) und 396OPA (1,10µm) über 1µm lagen, waren sie für 290OPA (0,96µm), 323OPA (0,99µm) und 503OPA (1,01µm) mit rund 1µm kleiner. 905OPA lag mit 0,87µm zwischen den Werten der Gruppe 290OPA/323OPA/503OPA und dem Wert für 300OPA (0,53µm). Auffällige Werte wurden wie in HeLa Zellen auch in MEF_ko Zellen für wtOPA (2,77µm) und 300OPA (0,53µm) dokumentiert. Zusätzlich war der Wert für 905OPA (0,87µm) in den OPA1 defizienten Zellen auffällig (Abb.35A). Anhand der Standardabweichungen im Balkendiagramm war zu erkennen, dass die Werte zwar streuten, jedoch homogener waren als bei den Messungen in HeLa Zellen. Dies erleichterte den Vergleich der Mutanten untereinander. Die Berechnungen nach Mann-Whitney zeigten signifikante Unterschiede der Mitochondrienlänge für alle OPA Mutanten zu wtOPA in MEF_ko Zellen.

Die aufgeführten Daten beweisen, dass OPA1 Mutanten mit hohen GTPase Aktivitäten (wtOPA, 270OPA) in OPA1 defizienten (MEF_ko) Zellen eine Wiederherstellung der tubulären Mitochondrien erzielen konnten.

Das Ausbleiben einer 100% Wiederherstellung der Mitochondrien Morphologie durch das OPA1 Wildtyp Konstrukt (wtOPA) würde die Vermutung nahe legen, dass neben der reinen GTPase Aktivität weitere Faktoren auf die Tubulierung der Mitochondrien Einfluss haben; beispielsweise das Einhalten eines bestimmten Expressionsniveaus oder das Zusammenspiel mit anderen Isoformen.

Die Ausnahme des Effektes, dass eine hohe GTPase Aktivität ein hohes Potential zur Wiederherstellung tubulärer Mitochondrien beinhaltet, bildete das Konstrukt 396OPA. Trotz gemessener hoher GTPase Aktivität für die GTPase Domäne konnte OPA1^{L396R} keine Tubulierung der Mitochondrien herbeiführen. In diesem Fall könnte die Tertiärstruktur des Gesamtproteins Aufschluss in der Regulierung der Mitochondrienstruktur geben. Im Kapitel 4.1 wurde die separate GTPase

Domäne betrachtet. Der Aminosäureaustausch in OPA1 in Position 396 könnte zu fehlerhaften Interaktionen mit einer GED Domäne nach sich ziehen, so dass die GTPase Domäne nicht aus dem basalen in den stimulierten (50-100-fach erhöhten) Aktivitätszustand wechseln konnte.

Das OPA1 Konstrukt 300OPA mit der geringsten GTPase Aktivität hatte den geringsten positiven und damit verlängernden Einfluss auf die Mitochondrien in den MEF_ko Zellen. Auch das CC2-Domänen defiziente OPA1 Konstrukt 905OPA führte nur zu geringen Verlängerungen der Mitochondrien. Damit wurde die Relevanz der OPA1 CC2 Domäne für die Verlängerung der Mitochondrien bestätigt.

Die Expression von OPA1 im OPA1 defizienten Zellsystem führte einerseits zu Werten, die weniger streuten als in HeLa Zellen, und andererseits zu signifikanten Unterschieden für alle OPA1 Mutationskonstrukte.

4.2.3.1 Expression von wtOPA in MEF_ko

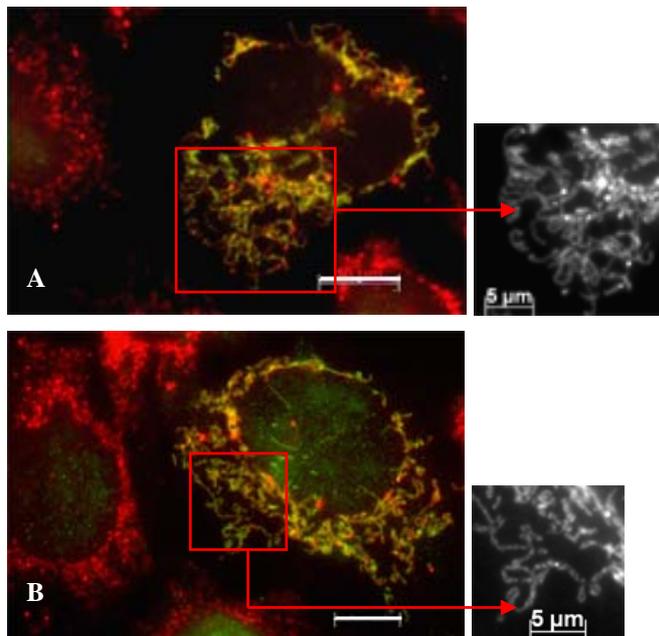
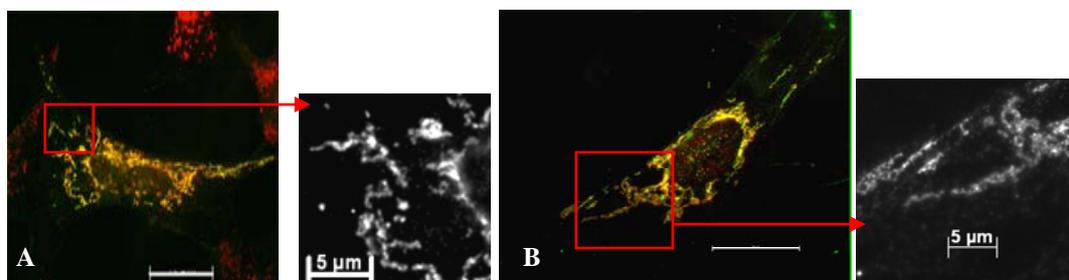


Abb. 36: A, B Transfektion von wtOPA in MEF_ko Zellen führte in knapp jeder fünften Zelle zur Wiederengewinnung wildtypartiger tubulärer Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 μm oder markierte 5 μm ; Box: Vergrößerung des markierten Bereiches der Mitochondrien.

4.2.3.2 Expression von 270OPA in MEF_ko



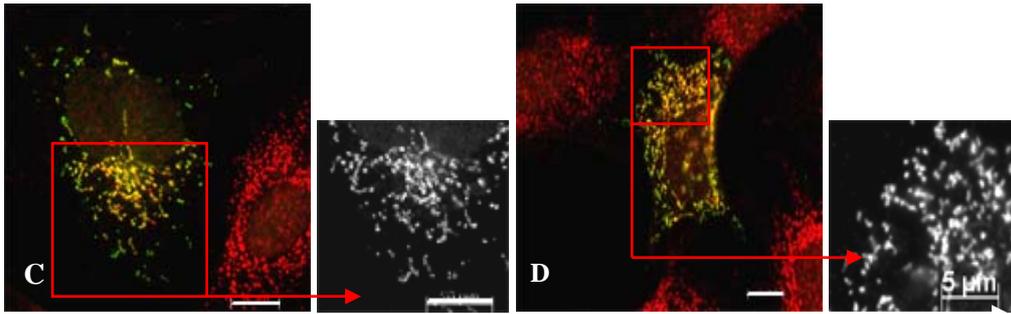


Abb. 37: A, B, C, D Transfektion von 270OPA in MEF_ko Zellen ergab zu geringem Anteil tubuläre (8%) und zu größeren, annähernd gleichen Teilen vesikuläre und intermediäre Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.3.3 Expression von 290OPA in MEF_ko

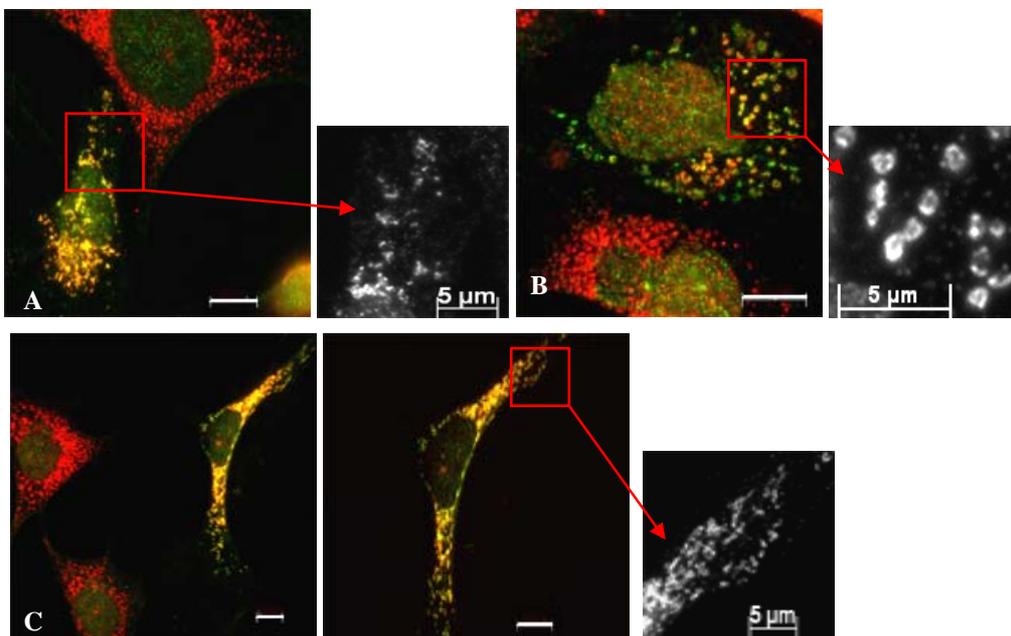


Abb. 38: A, B, C Transfektion von 290OPA in MEF_ko Zellen wies zum größten Teil vesikuläre, aber auch globuläre Mitochondrien auf. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.3.4 Expression von 300OPA in MEF_ko

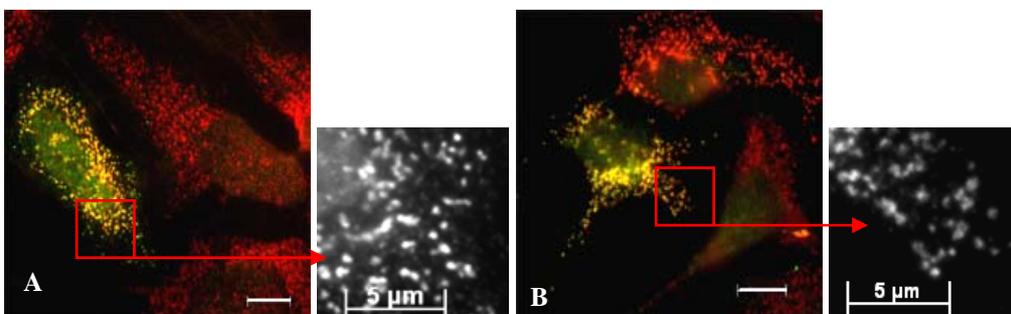


Abb. 39: A, B Transfektion von 300OPA in MEF_ko Zellen führte fast ausschließlich zu vesikulären Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.3.5 Expression von 323OPA in MEF_ko

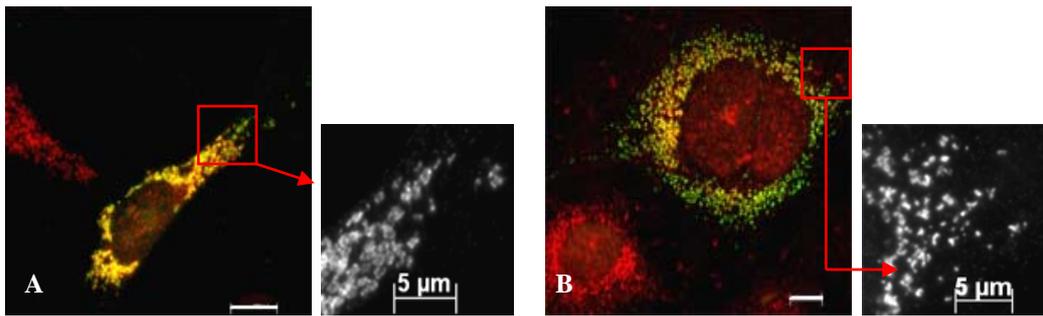


Abb. 40: A, B Transfektion von 323OPA in MEF_ko Zellen führte hauptsächlich zu vesikulären und globulären Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung des der Mitochondrien.

4.2.3.6 Expression von 396OPA in MEF_ko

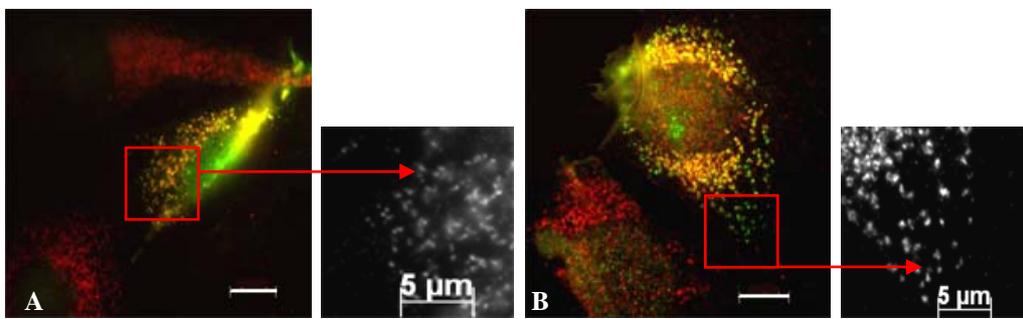


Abb. 41: A, B Transfektion von 396OPA in MEF_ko Zellen führte am Häufigsten zu vesikulären und globulären Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.3.7 Expression von 503OPA in MEF_ko

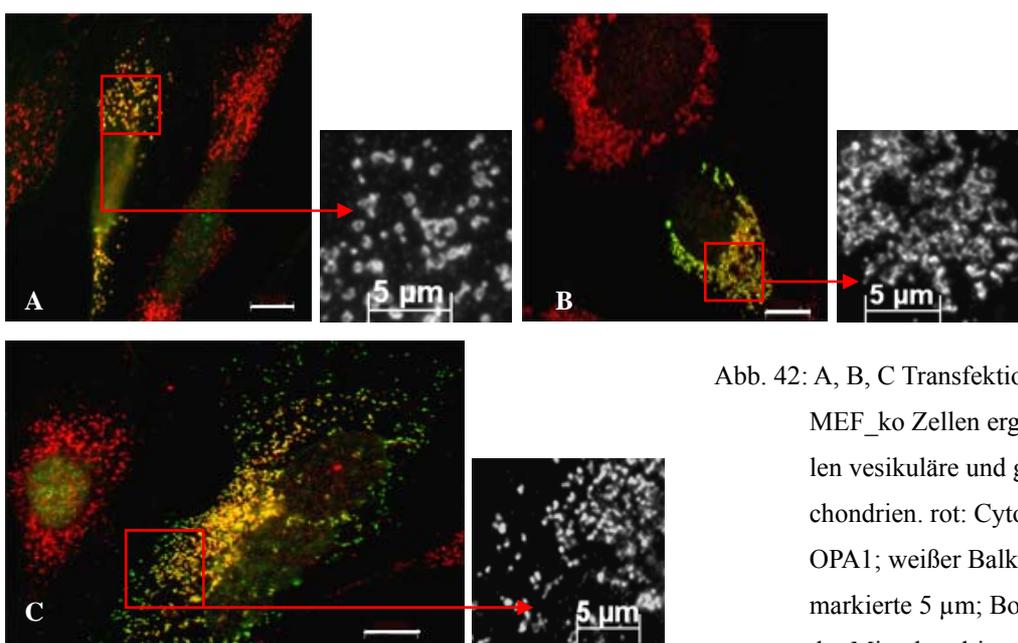


Abb. 42: A, B, C Transfektion von 503OPA in MEF_ko Zellen ergab zu großen Teilen vesikuläre und globuläre Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.3.8 Expression von 905OPA in MEF_ko

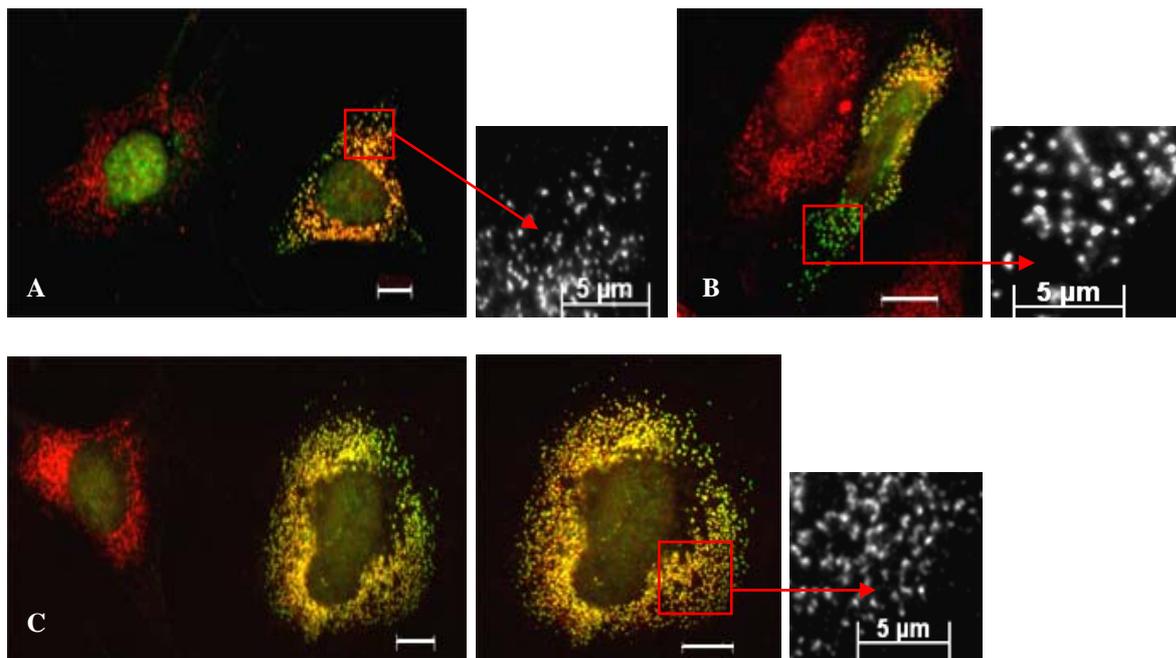


Abb. 43: A, B, C Transfektion von 905OPA in MEF_ko Zellen ergab einen großen Anteil globulärer und am häufigsten vesikuläre Mitochondrien. rot: Cytochrom C; grün: OPA1; weißer Balken: 10 µm oder markierte 5 µm; Box: Vergrößerung der Mitochondrien.

4.2.4 Fusionseigenschaften der Mitochondrien in MEF Zellen

Die Mitochondrienmorphologie einer Zelle ergibt sich aus stetigen Fusions (Verschmelzungs)- und Fissions (Teilungs)-Prozessen in den Zellen. Hierdurch entstehen die verschiedenen Formen (z.B. tubulär, vesikulär), die in einer Momentaufnahme dokumentiert werden können (Abb.16). Durch die Anwendung eines Fusionassays sollte aufgeklärt werden, in wie weit die Mitochondrien der beiden Zelllinien fusionskompetent sind. Hierfür wurden zwei verschiedene Zellpopulationen (MEF_wt, MEF_ko, MEF_ko mit OPA1 Konstrukten transfiziert) getrennt voneinander mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (MitoTracker oder konjugierte-Antikörper) angefärbt. Anschließend wurden sie kokultiviert und dann erfolgte die durch PEG eingeleitete Zellmembranfusion der Zellen (Zellhybride). Dies ermöglicht den Mitochondrien zweier Zellpopulationen in eine räumliche Nähe zu kommen, um miteinander fusionieren zu können. Sind die Mitochondrien fusionskompetent, so können sich die Mitochondrienfarbstoffe (rot und grün zu gelb: ) vermischen und ein gelbes Farbsignal abgeben (Kap.1.1.5)

Hierbei wurde festgestellt, dass MEF_wt Zellhybride gelb leuchteten, also verschmolzen waren (Abb.44A). Für MEF_ko Zellen konnte keine Fusion beobachtet werden (Abb.44B). Stattdessen lagen die Mitochondrien in den MEF_ko Zellen immer getrennt (nur rot oder grün) voneinander

in den Zellhybriden vor, was die mitochondriale Fusions-Inkompetenz der MEF_ko Zellen bewies (Abb.45).

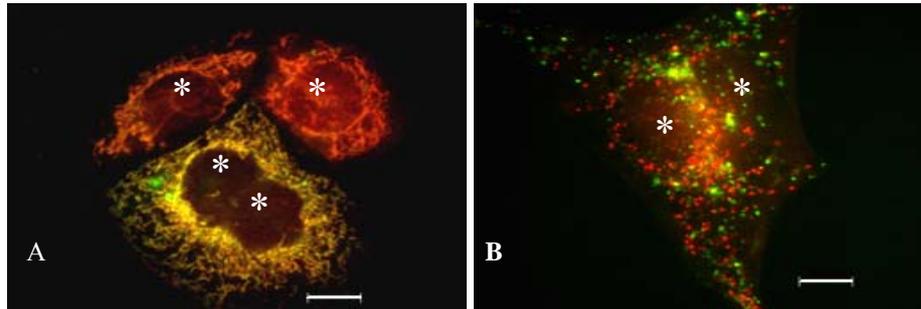


Abb. 44: PEG-Fusionsassay der MEF_wt oder der MEF_ko Zellen. MEF Zellen wurden vor der Fusion mit MitoTrackerRed oder MitoTrackerGreen gefärbt. Gleichzeitiges Auftreten beider Farbstoffe in einem Mitochondrium (gelb) weist eine erfolgreiche mitochondriale Fusion nach. A) MEF_wt Zellen. B) MEF_ko Zellen. weißer Balken: 10µm. Stern markiert Zellkern.

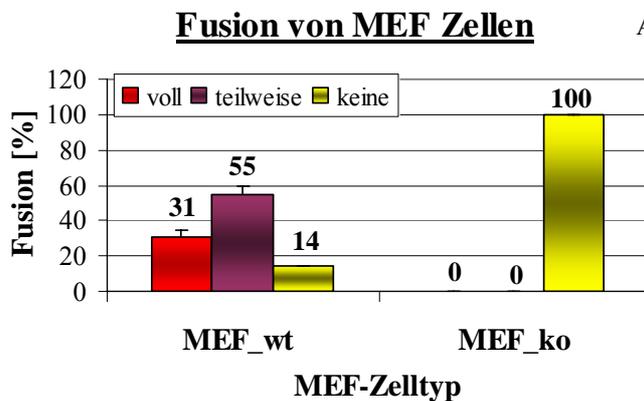


Abb. 45: Fusionsassay von MEF_wt und MEF_ko; n=50 aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: Standardabweichungen; voll: volle Fusion Mitochondrien im Zellhybrid sind gelb; teilweise: das stellenweise Ausbleiben einer Überlappung (Fusion) der Farbstoffe in einem sonst fusionierten Zellhybrid; keine: keine Fusion

Nach PEG Fusion von MEF_wt mit MEF_ko Zellen wurden fusionkompetente Mitochondrien beobachtet, die allerdings nur in kurzen stäbchenförmigen Mitochondrien (Abb.46) resultierten.

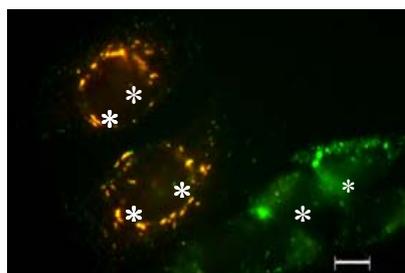


Abb. 46: Fusionsassay zwischen MEF_wt und MEF_ko; rot: MEF_wt mit MitoTrackerRed gefärbt; grün: MEF_ko mit MitoTrackerGreen gefärbt. weißer Balken: 10 µm. Stern markiert Zellkern.

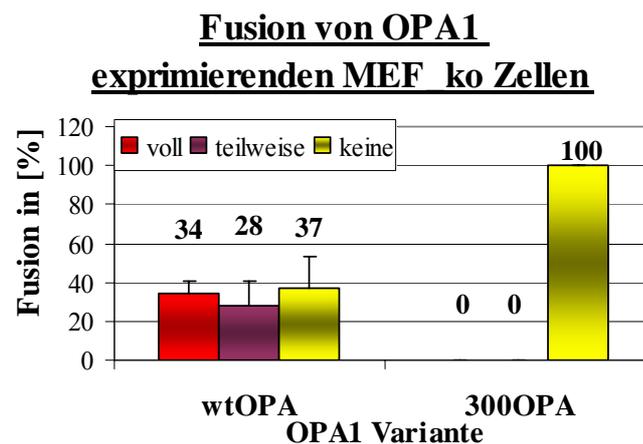
Die MEF_ko (OPA1 defiziente) Zellen wurden bis *dato* einmal (Song *et al.*, 2007) publiziert, um die OPA1 Prozessierung (Isoform 1-8) zu studieren. In diesem Zusammenhang konnte auch festgestellt werden, dass das wildtyp OPA1 Isoform 1 Protein den Verlust mitochondrialer Fusion wiederherstellen konnte (Song *et al.*, 2007). Die für diese Arbeiten verwendeten OPA1 Mutanten entsprachen alle der OPA1 Isoform 1. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die Expression der OPA1 GTPase Mutanten in den fusions-inkompetenten MEF_ko Zellen die mito-

chondriale Fusion beeinflussen. Diese Daten sollen Aufschluss über den Einfluss der GTPase Domäne auf die Funktion des OPA1 Proteins geben.

Die Dynamik der Mitochondrien wird beeinflusst durch die Fusionsereignisse. Die Fähigkeit der OPA1 Mutanten, in den Zellen die Mitochondrienmorphologie zu Gunsten längerer Mitochondrien zu beeinflussen, ermöglicht Rückschlüsse auf die Fusions- und damit Funktionsfähigkeit der OPA1 Proteine.

4.2.4.1 Mutationen in OPA1 beeinträchtigen seine Funktion zur Fusionierung von Mitochondrien

Um zu überprüfen, ob die OPA1 GTPase Aktivität den Einfluss von OPA1 auf die Fusion von Mitochondrien verändert, wurden OPA1 defiziente MEF (MEF_ko) Zellen mit der OPA1 Mutante 300OPA transfiziert (Population A). Für diese OPA1 GTPase Mutation wurde die geringste GTPase Aktivität von nur 41% gemessen. Da die Expression von OPA1 wildtyp in den Mitochondrien von fusions-inkompetenten MEF_ko in der Lage war, die Mitochondrien wider fusionieren zu lassen, diente dieses Konstrukt als Positivkontrolle. Für den Fusionstest wurden unbehandelte fusions-inkompetente MEF_ko Zellen (Population B) mit MitoTracker Green in grün angefärbt und mit den 300OPA oder wtOPA transfizierten Zellen (Population A) auf einer Platte gemeinsam ausgesät. Nach der Zellmembranverschmelzung (PEG-Fusionsassay, Kap.3.3.6) erfolgte die Färbung des exprimierten OPA1 in den Mitochondrien durch Färbung mit OPA1 Antikörper (grün: OPA1-Alexa488). Die Mitochondrien aus Zellhybriden mit beiden Farben (rot → OPA1 exprimierende MEF_ko Zellen und grün → MEF_ko Zellen) wurden ausgewertet.



A)

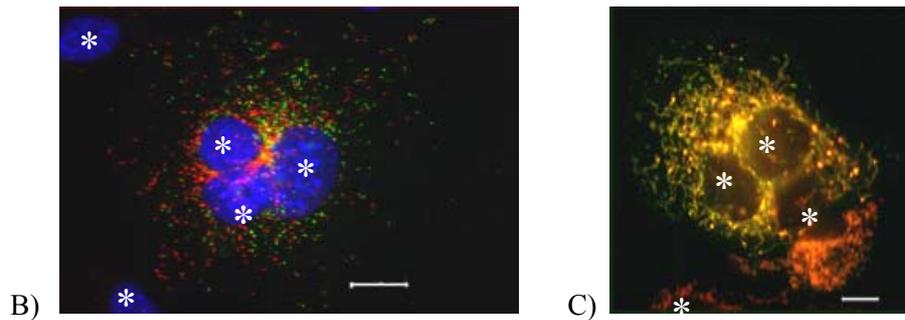


Abb. 47: A) Fusionsassay von MEF_wt und MEF_ko; n=50 aus 3 unabhängigen Experimenten; Balken: Standardabweichungen; voll: volle Fusion; teilweise: das stellenweise Ausbleiben eines Farbstoffaustausches in einem Zellhybrid; keine: keine Fusion. B) und C) PEG-Fusionsassay für OPA1 Varianten OPA1^{G300E} (B) und wtOPA1 (C) exprimierende MEF_ko Zellen (rot) mit unbehandelten MEF_ko Zellen (grün). B) OPA1^{G300E} exprimierende MEF_ko Zellen. C) wtOPA1 exprimierende MEF_ko Zellen. Es konnte eine Mitochondrienfusion von wtOPA1 exprimierenden MEF_ko Zellen mit unbehandelten MEF_ko Zellen, aber keine Fusion für die OPA1^{G300E} exprimierenden MEF_ko Zellen mit unbehandelten MEF_ko Zellen gesehen werden. Grün: MitoTrackerGreen; rot: OPA1; weißer Balken: 10µm; Stern markiert Zellkern.

Die Ergebnisse zeigten, dass das OPA1 wildtyp Konstrukt die Fusion der ansonsten nicht fusionfähigen MEF_ko Mitochondrien ermöglichte (34% volle Fusion). Die Mitochondrien mit dem OPA1^{G300E} Protein konnten keine Fusion durchführen.

Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der Morphologieanalysen (Kap.4.2.2; Kap.4.2.3), dass eine normale GTPase Aktivität essentiell für die Funktion bei der Fusion der Mitochondrien von OPA1 ist.

4.3 OPA1 Defizienz in MEF Zellen führt zu einer Verringerung der Respirationskapazität

Um festzustellen, ob das Fehlen von OPA1 Protein in den Zellen einen Einfluss auf die Respirationskettenkomplexe hat, wurden diese zuerst polarografisch mittels Sauerstoffmesselektrode analysiert (Abb.48). Die Datenwerte wurden vom Programm direkt aufgezeichnet. Aus dem Verbrauch an Sauerstoff innerhalb der Messkammer, konnte der absolute Differenzwert aus den Werten der Steigungen nach Substratzusatz und Inhibitorzugabe berechnet werden, die mit der Komplexaktivität korrelierten. Das bedeutete: Je aktiver der Komplex, desto größer der Sauerstoffverbrauch, desto höher der Differenzwert.

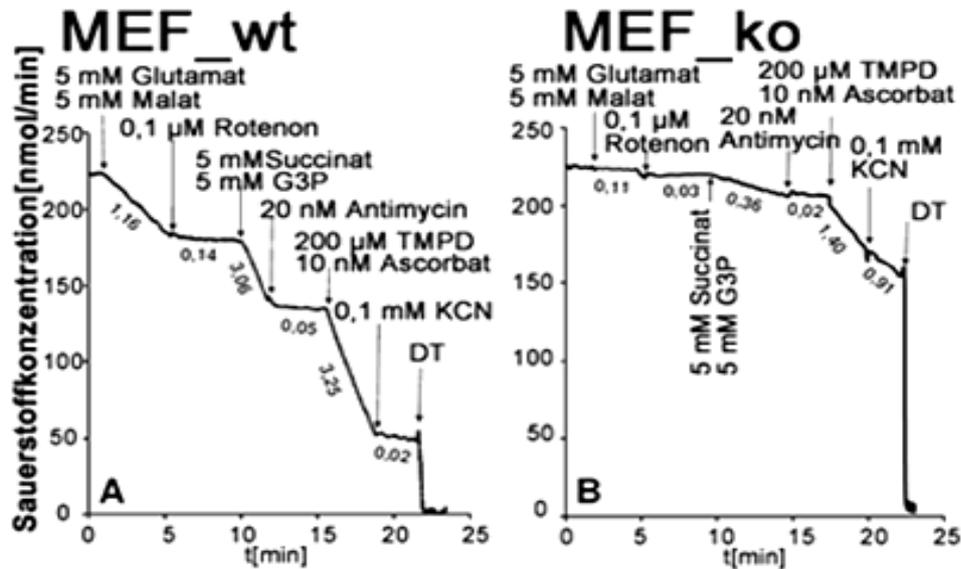


Abb. 48: Darstellung aus dem Messprogramm für die polarographische Analyse der Oxidationsrate in permeabilisierten MEF_wt (OPA^{+/+}) und MEF_ko (OPA^{-/-}) Zellen; y-Achse entspricht der Sauerstoffkonzentration [nmol/min]. A) Normale Respirationsrate von MEF_wt mit Inhibition der Respiration durch spezifische Inhibitoren. B) MEF_ko Zellen zeigen globuläre Respirationsdefizienz. DT: Dithionite; G3P: Glycerol-3-phosphate; TMPD: N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenyldiamin.

Steigungen des Sauerstoffverbrauchs (Komplexaktivität)		
Substrate + Inhibitoren	MEF_wt	MEF_ko
Malat, Glutamat + Rotenon	1,02	0,08
Komplex I Aktivität		
Succinat, Glycerol-3-Phosphat + Antymycin A	3,01	0,34
Komplex III Aktivität		
Ascorbat, TMPD + KCN	3,23	0,49
Komplex IV Aktivität		

Tab. 18: Datentabelle der Polarografiemessungen von 10⁶ MEF_wt und MEF_ko Zellen. Steigungsdifferenz nach Substrat- und Inhibitorzugabe, entspricht der Komplexaktivität und zeigt, dass in MEF_ko kaum OXPHOS Komplexaktivität messbar war; mind. 3 unabhängigen Messungen.

Anhand der Grafik (Abb.48) ließ sich erkennen, dass MEF_wt nach Zugabe von Substraten mit Sauerstoffverbrauch (Absenken der Kurve) reagierte und nach Zugabe von Komplexinhibitoren eine Verbrauchsstagnation (Gerade mit einer Steigung von nahe 0) eintrat. Damit zeigten MEF_wt Zellen einen normalen Respirationsverlauf. Ganz anders verhielt es sich bei den MEF_ko Zellen, dessen Respirationskomplexe kaum auf Substrat- oder Inhibitorzugabe reagierten. Es wurde auf eine globuläre Respirationsdefizienz geschlossen (Tab.18). Die stärkste Beeinträchtigung wurde für die Komplex I Aktivität beobachtet. Die polarographische Messmethode

ermöglicht die Messung der Atmungskettenkomplexe abhängig voneinander, so dass nicht klar ersichtlich war, ob es sich um eine Einschränkung eines (Komplex I) oder mehrerer Komplexe (Komplex I und IV) handelte. Um festzustellen, ob nur einer oder gleich mehrere Komplexe verringerte Aktivitäten besaßen, wurden die Komplexe separat voneinander gemessen. Bei den Messungen wurden auch primäre e12 wildtyp (MEF_wt e12: OPA1^{+/+}) und heterozygote (MEF_het e12: OPA1^{+/-}) MEF Zellen eingeschlossen, um zu testen, ob die Respirationskomplexe in heterozygoten MEF Zellen eine Veränderung aufwiesen. Die MEF OPA1 heterozygoten e12 Zellen waren im Vergleich zum wildtyp (MEF_wt e12) in ihrer Mitochondrienmorphologie unverändert (Abb.49).

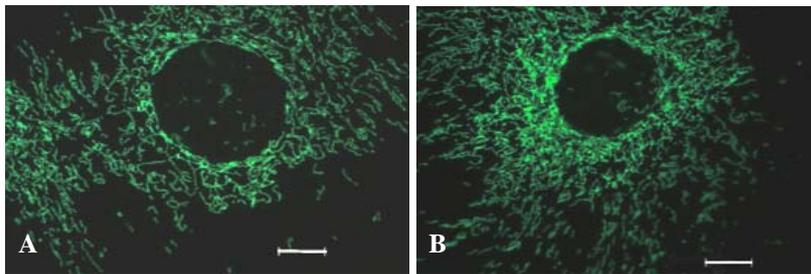


Abb. 49: A) Wildtyp und B) OPA1 heterozygote e12 MEF Zellen zeigten die gleiche Mitochondrienmorphologie. grün: MitoTrackerGreen; weißer Balken: 10 µm.

Um die OXPHOS-Aktivitäten miteinander vergleichen zu können, mussten sie in gleiche Verhältnisse zueinander gesetzt werden. Dies wurde erreicht, indem die OXPHOS-Aktivitäten im Verhältnis zu einem Markerenzym gesetzt wurden, der als Basislinie diente. Aufgrund seiner stabilen Aktivität (mU/mg Protein) in allen MEF Zelllinien wurde der Komplex II als Marker gewählt. Er dient zum quantitativen, mitochondrialen Angleichen der Komplexaktivitäten (Kap.3.2.7).

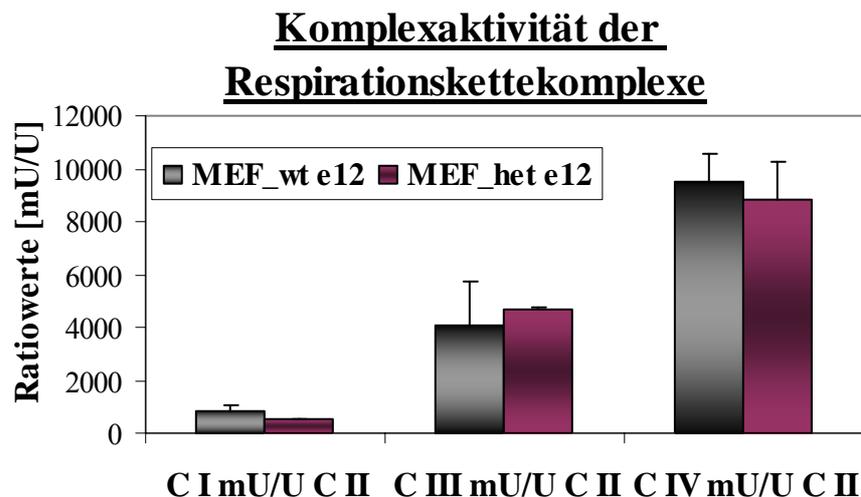


Abb. 50: Komplexaktivitäten für Komplex I, -III und -IV in e12 MEF Zellen zeigten keinen Unterschied zwischen OPA1 wildtyp und heterozygoten Zellen. Ratio mit der Komplex II Aktivität als Markerenzym. CI: Komplex I; CII: Komplex II (Marker); CIII: Komplex III; CIV: Komplex IV.

Bei der Betrachtung der Aktivitäten, konnten keine Unterschiede der OXPHOS Komplexaktivitäten zwischen den e12 heterozygoten und wildtyp MEF Zellen festgestellt werden. Vielmehr lagen die Werte für Komplex I, III und -IV nahe beieinander (Abb.50).

Für die MEF Zellen des embryonalen Tages e8,5 (wildtyp: MEF_wt; OPA1 defizienten: MEF_ko) wurde die Expression der Respirationskomplexe mittels Western Blot betrachtet. Um möglichst einheitliche Mitochondrienmengen zu vergleichen, wo die OXPHOS-Komplexe lokalisieren, wurde ein mitochondriales Außenmembranprotein (Porin) zur Standardisierung der Lademengen verwendet (Abb.51A). Auf dem Western Blot (Abb.51B) konnte man für die Respirationskomplexe I und IV stark reduzierte Mengen erkennen.

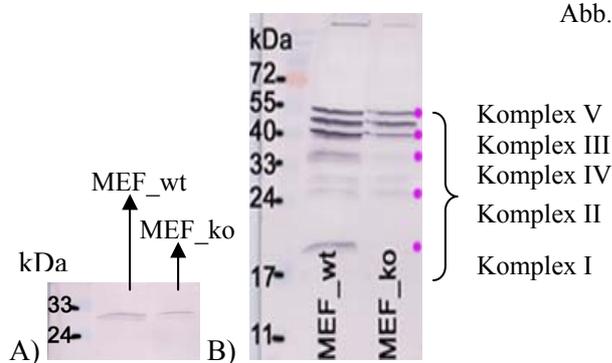


Abb. 51: Western Blot zur Darstellung der Expression der Respirationskomplexe I-V in wildtyp (MEF_wt) und OPA1^(-/-) MEF Zellen (MEF_ko). A) Angleichen der Lademenge mit Porin Antikörper (Mitochondrienmarker). B) Laden gleicher Mitochondrienmengen, Detektion mit OXPHOS Complex Detection Cocktail (MitoScience) Antikörpern; pinke Punkte entsprechen von oben (ca. 55 kDa) nach unten (ca. 20 kDa): Komplex V, -III, -IV, -II, -I.

Aufgrund der stabilen Werte für Komplex II wurde dieser wie bereits oben als Markerenzym für die Aktivitätsmessung gewählt.

Komplexaktivität der Respirationskettenkomplexe

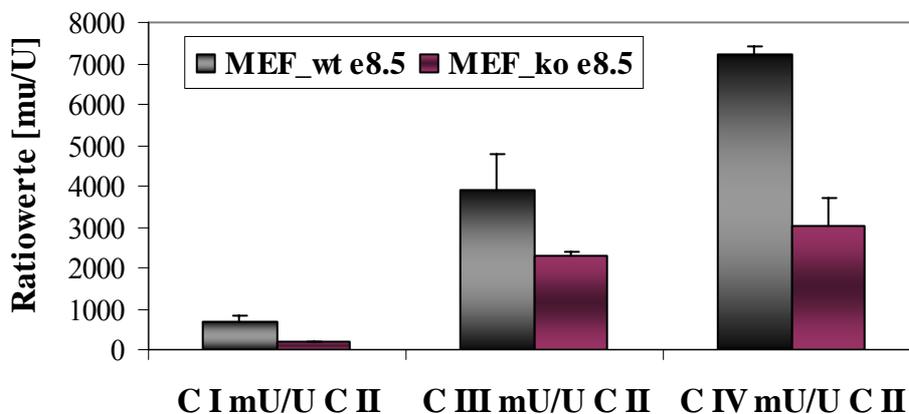


Abb. 52: Komplexaktivitäten für Komplex I, -III und -IV in e8,5 MEF Zellen zeigten eine starke Reduktion der Komplex I und -IV Aktivität für die OPA1^(-/-) (MEF_ko) Zellen. Ratio mit der Komplex II Aktivität als Markerenzym. CI: Komplex I; CII: Komplex II (Marker); CIII: Komplex III; C4: Komplex IV.

MEF Zellen	Genotyp	CI /CII [mU/U]	C III /CII [mU/U]	C IV/CII [mU/U]
MEF_wt e12	OPA1 wt e12	807	4043	9532
MEF_het e12	OPA1 het e12	525	4652	8828
MEF_wt	OPA1 wt e8,5	667	3888	7224
MEF_ko	OPA1 ko e8,5	182	2312	3001

Tab. 19: Wertetabelle für die Aktivitäten der Respirationskomplex in MEF Zellen. E12 MEF Zellen Abb.50; e8,5 MEF Zellen Abb.52; wt: wildtyp, OPA1^(+/+); het: heterozygot, OPA1^(+/-); ko: OPA1^(-/-); e: embryonaler Tag; CI: Komplex I; CII: Komplex II (Markerenzym); CIII: Komplex III; CIV: Komplex IV.

Die Abbildung 52 verdeutlichte, dass für die MEF Zellen des embryonalen Tages e8,5 deutliche Aktivitätsunterschiede der OXPHOS-Komplexe zwischen den wildtyp (MEF_wt) und OPA1 defizienten (MEF_ko) Zellen vorhanden waren. Insbesondere die Aktivität des Komplexes I (CI/CII), aber auch die des Komplex IV (CIV/CII) waren in den MEF_ko Zellen stark vermindert.

Bei der Untersuchung von OPA1 defizienten Zellen des embryonalen Tages 8,5 (MEF_ko) konnte im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Abnahme der Respirationskapazität nachgewiesen werden. Insbesondere lag eine verringerte Komplex I und -IV Aktivität vor. Geringer war die Aktivität des Komplexes III herabgesetzt.

4.4 Wachstum der MEF Zellen

Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens der OPA1 defizienten MEF_ko Zellen im Vergleich zu den MEF_wt Zellen wurde eine Wachstumskurve aufgenommen.

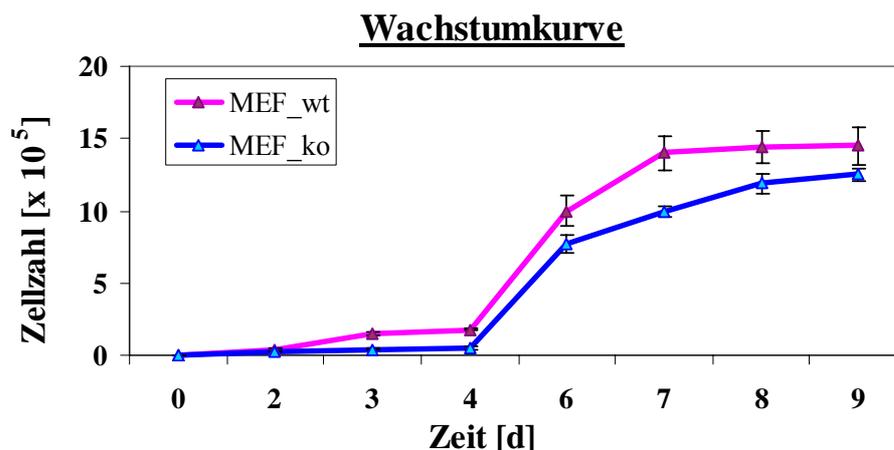


Abb. 53: Wachstumskurve für MEF_ko und MEF_wt Zellen zeigt eine Wachstumshemmung für die OPA1^(-/-) (MEF_ko) Zellen; ermittelt aus drei unabhängigen Messungen.

Die Wachstumskurve (Abb.53) dokumentierte, dass die MEF_{ko} Zellen nicht nur langsamer wuchsen, sondern auch mit einer geringeren Zelldichte in die stationäre Phase eintraten. Das schwächere Wachstumsverhalten der OPA1 defizienten MEF Zellen war durch die verringerte OXPHOS Komplexaktivität zu erwarten (Atmungskette; Kap.4.3).

4.5 Analyse Lymphoblastoider (LCL) Zellen aus adOA Patienten

Aus dem Blut von fünf adOA Patienten (KSP, LN, MMN, MNJ, SBE) und fünf Normalkontrollen wurden lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) mittels Transfektion mit dem Epstein Barr Virus gewonnen (Kap.3.2.1, Tab.13, Tab.14). Die aus adOA Patienten gewonnenen LCL Zellen wurden auf ihre OPA1 Expression untersucht. Das typische humane OPA1 Bandenmuster bestehend aus fünf Banden zwischen 75 und 100 kDa (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006) konnte sowohl in der Normalkontrolle (Abb.54) als auch in den Patienten LCL Zellen beobachtet werden. Es zeigte sich, dass MNN- und MNJ-Zellen, die dieselbe Mutation trugen, gleich starke OPA1 Banden aufwiesen. Die OPA1 Expression in KSP-Zellen hingegen war um ca. $\frac{1}{3}$ reduziert und in den LN-Zellen leicht erhöht. Die Reduktion des OPA1 Proteins in KSP Zellen könnte auf das Fehlen des OPA1 Proteins zurückzuführen sein, das von dem mutierten OPA1 Allel gelesen wird. Da die Mutation im Exon 2 lokalisiert war und damit noch innerhalb der mitochondrialen Importsequenz lag, könnte es zu einer Behinderung des Imports des OPA1 Proteins in die Mitochondrien und zur anschließenden Degradierung durch regulierende Proteasen innerhalb der Zelle gekommen sein.

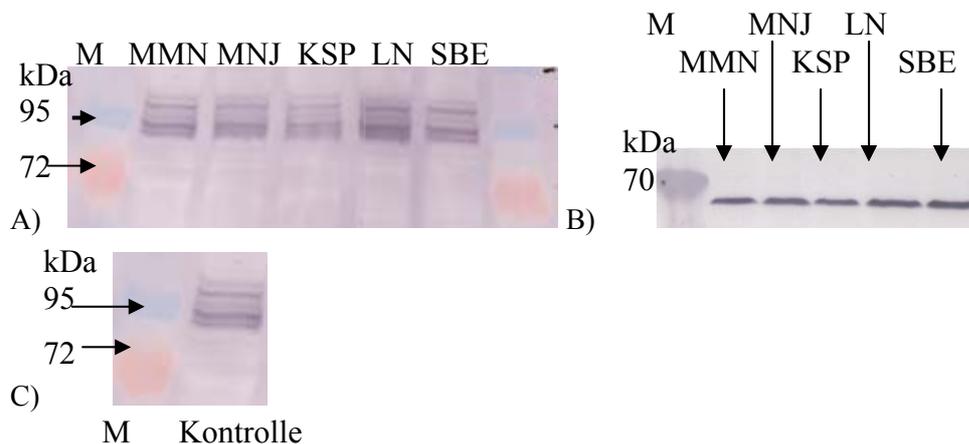


Abb. 54: Western Blot A) Detektion von OPA1 im Zellhomogenat von Patienten-LCL Zellen. Für alle Patientenzellen wurde das OPA1 typische Bandenmuster beobachtet. B) Zur Ladung gleicher Mengen wurden die Proben mittels mitochondrialem Protein HSP60 vorher angeglichen. C) OPA1 Banden in Normalkontrolle. M: Marker; MMN, MNJ, KSP, LN, SBE: adOA Patienten LCL Zellen (Tab.13, Kap.3.2.1)

Alle fünf aus adOA gewonnenen Patientenzelllinien zeigen das normale OPA1 Protein-Bandenmuster und unterscheiden sich nur geringfügig in der Expressionsstärke.

4.5.1 Patientenzellen besitzen eine veränderte mitochondriale Feinstruktur

Aufgrund der geringen Größe der LCL Zellen ($0,3-4\mu\text{m}$), führte eine Morphologieanalyse der Mitochondrien mittels gängiger Mikroskopie mit einem Vergrößerungsfaktor von 1000 zu unbefriedigenden Ergebnissen. Daher wurde die Analyse unter Verwendung der Elektronenmikroskopie (EM) vorgenommen. Es wurden EM Aufnahmen von den 5 Patienten-LCLs (KSP, LN, MMN, MNJ, SBE) und Kontroll-LCLs gefertigt (Abb.55). Sowohl Cristaelängen als auch Mitochondrienflächen wurden mit Unterstützung des AnalySIS Programmes ermittelt (Abb.56). Dabei wurden gleichstarke Anzahlen an Messungen pro Linie ausgewertet. Die Patientenzellen wurden zu einer Gruppe zusammengefasst, um diese mit den Zellen der Normalkontrollen als Kontrollgruppe zu vergleichen. Um die Varianzen innerhalb der zwei Gruppen möglichst niedrig zu halten, wurden zur Auswertung die Boxplot Darstellung gewählt. Im Boxplot wird u.a. der Median (Wert, der 50% der Gesamtwerte entspricht) dargestellt (Kap.3.4).

Im Allgemeinen streuten die Patientenwerte etwas stärker als die Kontrollwerte. Während die Mitochondrienfläche der Patientenzellen (Median= $0,257\mu\text{m}^2$) deutlich größer war als die der Kontrollzellen (Median= $0,185\mu\text{m}^2$), waren die Cristaelängen mit einem Median von $199,02\mu\text{m}$ deutlich kürzer als bei den Kontrollen mit einem Median von $264,23\mu\text{m}$. Beim Vergleich der Patientenmitochondrien mit denen der Kontrollzellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl bei den Mitochondrienflächen als auch bei den Cristaelängen.

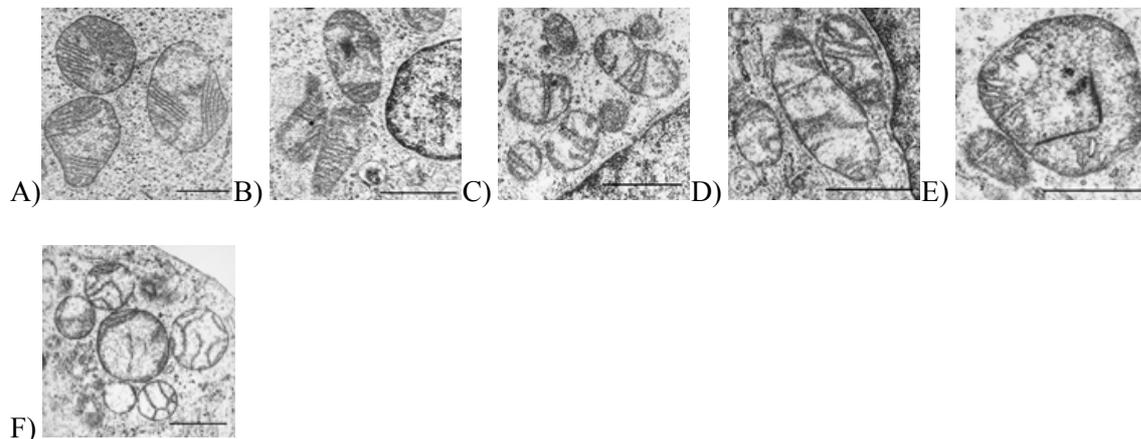


Abb. 55: EM Aufnahmen von LCL Zellen. Die Aufnahmen der Patientenzellen zeigten zum Teil aufgequollene Mitochondrien mit unorganisierten, rudimentären Cristae. A) Kontrolle; B) KSP-LCL; C) LN-LCL; D) MNJ-LCL; E) MNN-LCL; F) SBE-LCL; schwarzer Balken entspricht $1\mu\text{m}$.

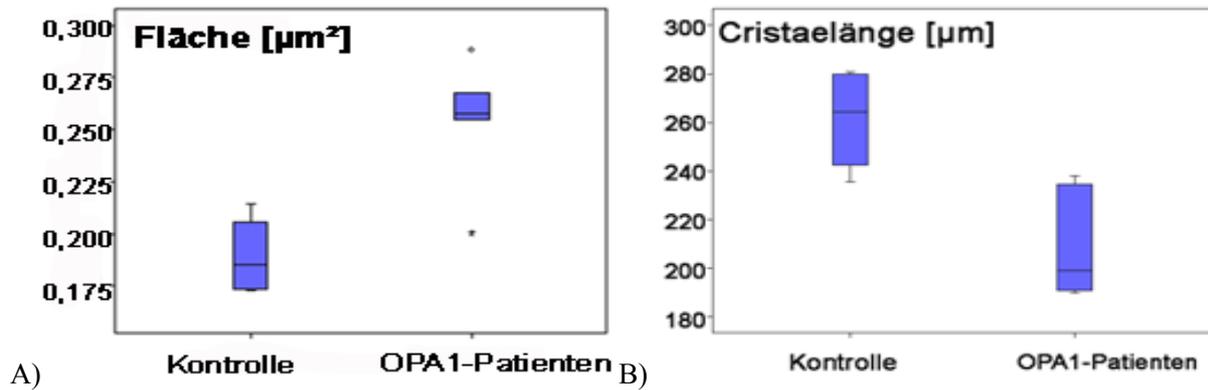


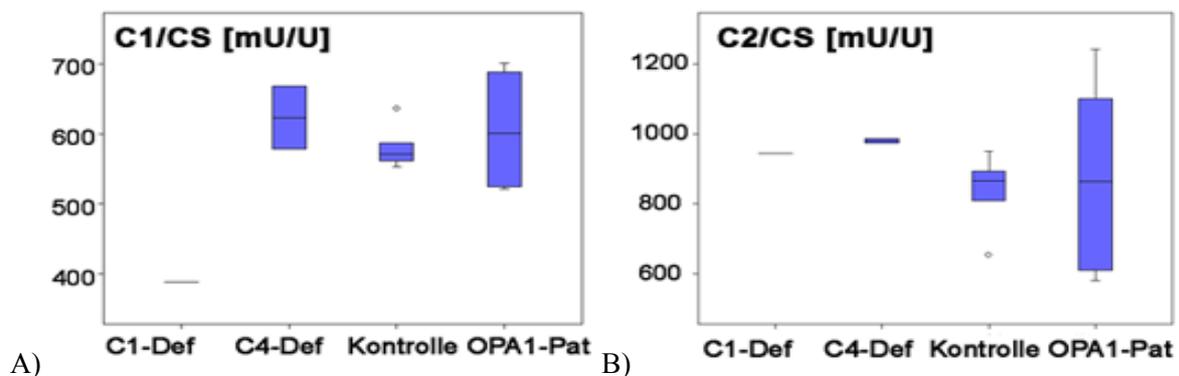
Abb. 56: Boxplot der Kontroll- und Patienten LCL Zellen zeigte signifikante Unterschiede der Mitochondrienfeinstruktur. Die Mitochondrien der Patientenzellen weisen im Vergleich zu Kontrollen größere Flächen und kürzere Cristealamellen auf. A) Mitochondrienflächen; n=240 Gesamtmessungen pro Gruppe und B) Cristaelänge; n=300 Gesamtmessungen pro Gruppe. Kontrolle: LCL Normalkontrollen; OPA1-Patienten: LCL Zellen aus adOA Patienten; *: Extremwert.

Die Analyse von adOA Patientenzellen zeigte eindeutig, dass OPA1 Mutationen zu deformierten mitochondrialen Feinstrukturen führen. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate aus den Transfektionsversuchen, dass *OPA1* Mutationen zu einer deregulierten Mitochondrienstruktur führt.

4.5.2 LCL Zellen aus adOA Patienten zeigen keine markanten Veränderungen in den Aktivitäten der Respirationskomplexe

Mitochondrien wurden aus LCL Kontroll- und Patientenzellen angereichert und die Respirationskomplexe vermessen. Unter den Kontrollen befanden sich nicht nur die fünf Normalkontrollen, sondern auch eine Komplex I defiziente Zelllinie und zwei Komplex IV defiziente Zelllinien. Die Daten wurden mittels Boxplots grafisch ausgewertet. Anhand der Boxplots war zu erkennen, dass die Werte für die Patientenzellen inhomogen waren und sich daher breite Boxplotflächen ergaben (Abb.57A-E). Außerdem trat je ein Extremwert bei den Messungen für Komplex IV und -V auf. Zwar kam auch je ein Extremwert bei den Messungen für Komplex I, -III und -IV in den Normalkontrollen vor, jedoch waren die Werte ansonsten weitestgehend homogen. Da es aufgrund unspezifischer NADH Oxidation anderer NADH Dehydrogenasen zu Fehlmessungen für den Komplex I (NADH Dehydrogenase) kommen kann, wurde die Rotenon Sensitivität gemessen (Abb.57F): $CI-RS [\%] = \frac{\{(NADH_{oxid})_{total} - (NADH_{oxid})_{Rotenon}\}}{(NADH_{oxid})_{total}}$. Das bedeutet, dass die Gesamtmenge an NADH Oxidation gemessen wurde, von der die Oxidationsrate in Anwesenheit von Rotenon substrahiert wurde. Anschließend wurde der erhaltene Betrag durch die Gesamtoxidationsrate dividiert (Kap.3.2.7). Je sensitiver also die Hemmung von Komplex I durch Rotenon, desto kleiner der Wert für $(NADH_{oxid})_{Rotenon}$. Damit nähert sich der Quotient dem Wert 1 bzw. 100% und desto spezifischer ist damit die Messung. Mit Ausnahme der Komplex I

defizienten Zelllinie zeigten alle Zelllinien einen hohen C1-RS Wert (Mediane >85%). Damit zeigte die Messung eine hohe Komplex I Spezifität für alle Linien. Die Komplex I defizienten Zellen hatten aufgrund ihrer geringeren Komplex I Aktivität einen kleineren CI-RS Wert (Median ca. 68%). Ähnliche Sensitivitätsanalysen mussten auch für den Komplex V durchgeführt werden, dessen Messwerte durch unspezifische ATPasen (z.B. Na/K-ATPasen) ebenfalls verfälscht werden könnten. Die Oligomycin sensitive Hemmung der ATPase bestimmt die Sensitivität und Zuverlässigkeit dieser Messung (Abb.57G). War nach Oligomycinzugabe noch eine hohe Komplex V Aktivität vorhanden, wurden die Aktivitätsmesswerte durch andere ungehemmte ATPasen verfälscht (Kap.3.2.7). Um die Spezifität der erhaltenen Komplex V Aktivitätswerte zu beurteilen, wurde die Oligomycin Sensitivität über die ATP Hydrolyserate bestimmt: $CV-OS [\%] = \frac{\{(ATP_{hydro})_{total} - (ATP_{hydro})_{oligomycin}\}}{(ATP_{hydro})_{total}}$. Leider lagen die Werte für alle Zellen unter 35%, wobei die Patientenzellen am sensitivsten waren und den höchsten Wert erreichten (Median ca. 30%). Um aussagekräftig zu sein, sollte dieser mind. über 50% liegen. Aus diesem Grund konnten die Werte der Komplex V Aktivitäten nur als Hinweis für einen möglichen Trend dienen. Zum quantitativen Angleich der gemessenen Aktivitäten wurde das mitochondriale Markerenzym Citratsynthase verwendetes (Kap.3.2.7). Bei der Betrachtung der Aktivitäten wurde deutlich, dass sich die Mediane der adOA Patientenzellen und Normalkontrollen ähnlich verhielten und am stärksten bei der Komplex III Aktivität voneinander abwichen. Die Komplex I defizienten LCL Zellen zeigten wie erwartet eine deutliche Abnahme zu den Normalkontrollen bei der Komplex I Aktivität. Bei den Komplex IV defizienten Zellen konnte wie erwartet eine Abnahme der Komplex IV Aktivität verzeichnet werden. Die defizienten Zellen ähnelten sich in ihrem Verhalten, ausgenommen in der Komplexaktivität, in der sie ihre Defizienz besaßen. Dort waren sie je drastisch reduziert. Die in den defizienten Zellen festgestellte erhöhte Komplex II und -III Aktivität, könnte auf eine Kompensation der defizienten Zellen zurückzuführen sein.



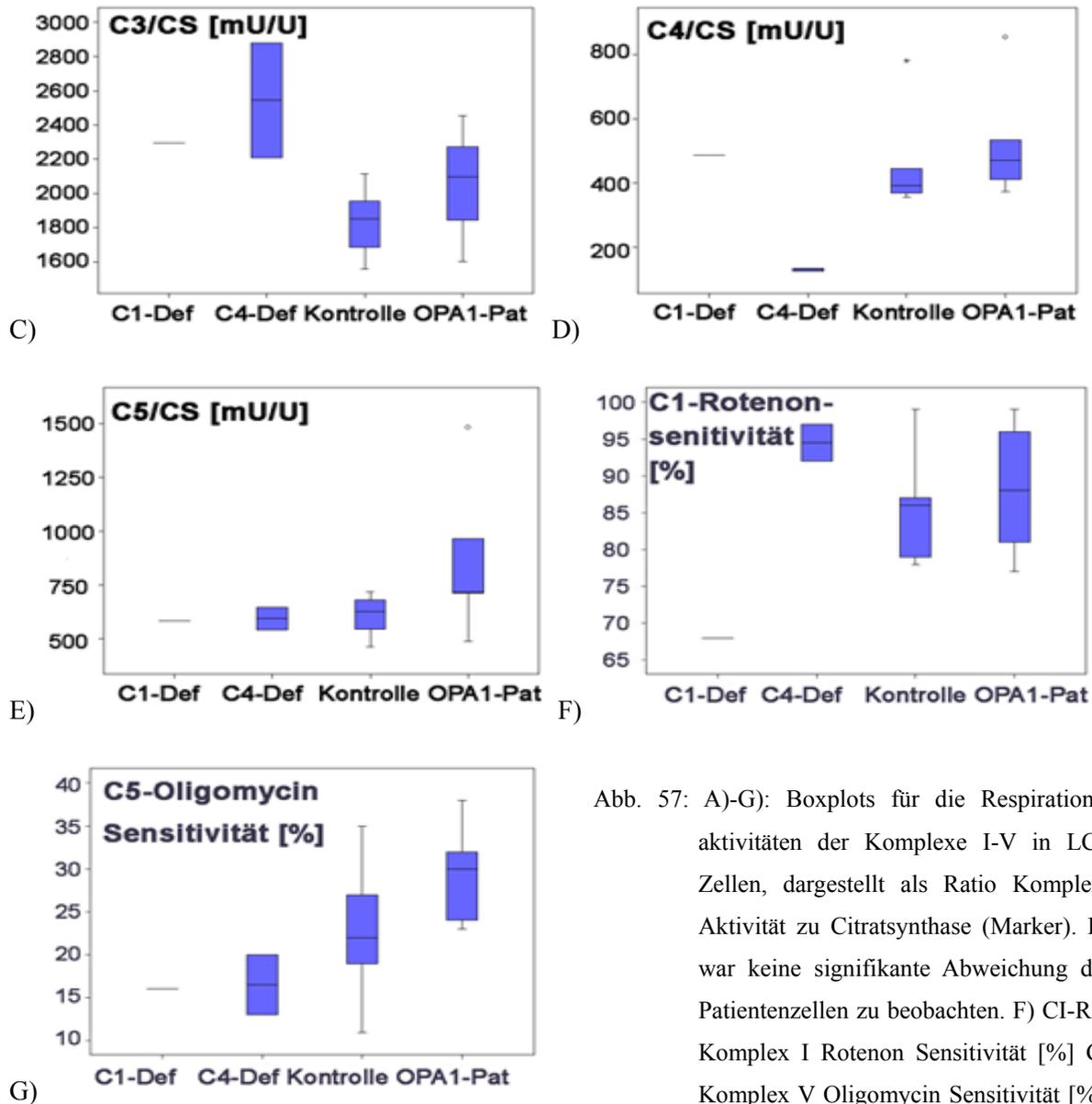


Abb. 57: A)-G): Boxplots für die Respirationsaktivitäten der Komplexe I-V in LCL Zellen, dargestellt als Ratio Komplex-Aktivität zu Citratsynthese (Marker). Es war keine signifikante Abweichung der Patientenzellen zu beobachten. F) CI-RS: Komplex I Rotenon Sensitivität [%] G) Komplex V Oligomycin Sensitivität [%]; C1: Komplex I; C2: Komplex II; C3: Komplex III; C4: Komplex IV; C5: Komplex V; CS: Citratsynthese; Def: defiziente Zellen; Pat: Patientenzellen.

Aus diesen Daten wurde ersichtlich, dass die Komplexaktivitäten in adOA Patientenzellen individuell stark streuten. So war vereinzelt in einem Patienten der Komplex I defizient. Aber als Gruppe betrachtet wurde deutlich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Respirationsenzymaktivitäten in Patientenzellen und den Normalkontrollen gab. Dieses Ergebnis zeigte damit Parallelen zu den unauffälligen Respirationsmessungen in OPA1 heterozygoten MEF Zellen (Kapitel 4.3).

5 Diskussion

5.1 Mutationen in der OPA1 GTPase Domäne beeinflussen die GTP-Hydrolyseaktivität

Ungefähr die Hälfte der Patienten mit adOA weisen gehäuft Punktmutationen in der GTPase Domäne des *OPA1* Gen auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss einer Vielzahl an Substitutionspunktmutationen in OPA1 und ihre Auswirkung für die Hydrolyse-Aktivität der GTPase biochemisch und zellbiologisch analysiert (Tab.13). Diese Analyse ist von besonderer Bedeutung, da eine Korrelation zwischen Mutationslokus und Symptomstärke der adOA Patienten bislang nicht möglich war (Votruba *et al.*, 1998; Pesch *et al.*, 2001). OPA1 Mutationen wurden mittlerweile auch mit Symptomen assoziiert, die nicht das Sehvermögen betreffen. So wurde für Patienten mit der OPA1 Mutation R455H oder G439V eine Schädigung des Hörnervs mit einhergehendem Hörverlust geschildert (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Liguori *et al.*, 2008). Aber auch Beeinträchtigung der Augenmotorik und makrozytische Anämie wurden in einem Patienten mit einer Y582C-OPA1 Mutation beschrieben (Ferraris *et al.*, 2008). Der Verlust von OPA1 in Mitochondrien wurde mittlerweile auch in Zusammenhang mit Zellalterung gebracht (Navratil *et al.*, 2008) und in β -Zellen mit einer möglichen Ausbildung von Diabetis (Twig *et al.*, 2008).

In einer Patientin mit besonders starken Symptomen (Pesch *et al.*, 2001) waren zwei Mutationen beschrieben worden. Diese Patientin wies je eine OPA1 Punktmutation pro Allel auf: Glu270Lys (270GTP) und Arg290Trp (290GTP). Die Ergebnisse der GTPase Aktivitätsbestimmung von 270GTP zeigte nur eine geringfügige Reduktion um 5% zu wtGTP (Abb.13). OPA1^{E270K} befindet sich am Ende der ersten coiled-coil Domäne, in der α -Helix direkt vor dem G1-Motiv, und substituiert das hydrophile, negativ geladene Glutamat mit dem größeren, hydrophileren, positiv geladenen Lysin. Dies entsprach einer konservativen Substitution zu einer stark hydrophilen und positiv geladenen Aminosäure. So trägt das kristallisierte GTPase des DynA (Dynamamin Ortholog des *Dyctostelium discoideum*; Niemann *et al.*, 2001) in dieser Position ein Lysin und im humanem Dyn1 Protein steht eine ebenfalls basische, stark hydrophile Aminosäure, das Arginin. Die konservierte Eigenschaft der Aminosäure an dieser Position würde die nur geringfügige Abweichung der GTPase Aktivität zum wtGTP erklären.

Bei der zweiten Mutation 290GTP (OPA1^{R290W}) war die Hydrolyseaktivität durch 30% Reduktion stärker eingeschränkt. Die Mutation des nicht konservierten Arginins befand sich direkt vor dem G1 Motiv, das u.a. die Bindung des Phosphates ermöglicht. Hierbei bindet die hoch konservierte Aminosäure des DynA K38 (G1 Motiv) nicht direkt das Phosphat, sondern bildet Wasser-

stoffbrückenbindungen zu D138 und L139 (G3 Motiv: koordiniert Mg^{2+} und γ -Phosphat mittels Wasserstoffbrückenbindungen) aus. D138 wiederum koordiniert das Mg^{2+} *via* eines Wassermoleküls und das G141 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum γ -Phosphat des Nukleotides aus. Aber auch S36 (G1 Motiv) interagiert mit T207 (G4 Motiv) über eine Wasserstoffbrückenbindung. Die Substitution des stark hydrophilen, positiv geladenen Arginins zum hydrophoben Tryptophan hat sehr wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Ausbildung dieser Interaktionen innerhalb der GTP-Bindungs-Motive gehabt und damit die GTPase Aktivität beeinträchtigt.

Das Zusammenwirken beider Mutationen (OPA1^{E270K}, OPA1^{R290W}) in einem Patienten würde zu einer verstärkten Einschränkung der GTPase Aktivität insbesondere im oligomerisierten und damit stimulierten Zustand führen. Stimuliert würde so ein 50 bis 100-facher Aktivitätsverlust entstehen und damit einhergehend ein starker OPA1-Funktionsverlust. Der Funktionsverlust in den Energie generierenden Mitochondrien würde die stark ausgeprägte Symptomatik des Patienten erklären.

Eine extreme Abnahme der Aktivität um ca. 60% wurde bei der GTPase Mutation 300GTP (G300E) beobachtet, die sich in einer hoch konservierten Position im G1 Motiv befand. Bereits für die Mutation K301A wurde eine kaum vorhandene GTPase Hydrolyse Aktivität beschrieben (Griparic *et al.*, 2004). Wie erwartet behinderte der Austausch des hydrophoben Glycins mit dem hydrophilen Glutamat in dieser Schlüsselposition die GTPase Aktivität, wahrscheinlich durch eine inadäquate Bindung des Nukleotides.

Die OPA1 Mutation T323A (323GTP) liegt innerhalb des hoch konservierten G2 Motiv, das in die katalytische Aktivität involviert ist. Da erneut eine Mutation in einer Schlüsselposition vorlag, wurde eine stärkere Beeinträchtigung der Hydrolyse Aktivität erwartet, die sich in einer Abnahme von 40% erkennen lies. Bei der entsprechenden Mutation in Dyn1^{T65A} wurde eine Blockierung der GTP-Hydrolyse und der damit zusammenhängenden eingeschränkten Endozytose beschrieben (Marks *et al.*, 2001). Eine vergleichbar starke Beeinträchtigung wie bei OPA1^{G300E} könnte durch die geringe Größe von Alanin gemildert worden sein. Der Austausch einer kleinen hydrophoben Aminosäure mit einer winzigen, hydrophoberen Aminosäure ist nicht so schwerwiegend wie z.B. mit einem größeren Arginin.

Von Damke und Kollegen (Damke *et al.*, 2001) wurden die konservierten Threonin Aminosäuren (T65F, T1089F, T135F) in Dynamamin mutiert und in HeLa Zellen untersucht. Obwohl für alle Mutationen erwartet, zeigte nur die Mutation T65F in den Versuchen einen negativen Effekt auf die Endozytose. Ein ebenso überraschendes Ergebnis lieferte die Analyse von 396GTP (OPA1^{L396R}; G3 Motiv). Die Aktivität dieser Mutation war im Durchschnitt sogar geringfügig erhöht (107%

±14%). Der Ersatz der hydrophoben Aminosäure mit dem hydrophilen Arginin könnte unterstützend auf die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen G3 und G1 Motiven wirken und so nur eine geringfügige basale Beeinträchtigung der Aktivität nach sich ziehen. Außerdem besaßen die ermittelten Werte für OPA1^{L396R} eine Standardabweichung von 14%, so dass Einzelwerte existieren, die der Aktivität von 270GTP entsprechen. Außerdem muss die Tatsache berücksichtigt werden, was für alle hier aufgeführten Mutationen gilt, dass nur basale Aktivitäten gemessen wurden. Ein stimulierter Zustand konnte aufgrund des Fehlens eines GTPase aktivierenden Proteins (GAP), das möglicherweise zur Aktivierung der OPA1 GTPase existiert, nicht gemessen werden. Für die Dynaminfamilie hat die GTPase Effektor Domäne (GED) die Funktion eines GAPs übernommen. Die GED-Domäne stimuliert die Oligomerisierung des Dynamins (Praefcke & McMahon, 2004), wodurch sich die GTPase Aktivität um das 50 bis 100-fache erhöht (Marks *et al.*, 2001). Da bei den biochemischen Analysen die GTPase Domäne als Fragment verwendet wurde, stand keine potentielle GED zur Verfügung, die eine Katalyse hätte beschleunigen können. Die coiled-coil Domänen (CC1 oder/und CC2) von OPA1 werden als Interaktionsregionen vorhergesagt, die eine Oligomerisierung von OPA1 ermöglichen sollen (Frezza *et al.*, 2007) die wiederum die GTPase aktivieren. Da die Expression des Gesamtlängen OPA1 Proteins in Bakterien zu Einschlüssen führte, konnten keine ausreichenden Mengen an löslichem OPA1 hergestellt werden. Daher wurden die Expressionsbedingungen für die optimale Gewinnung der GTPase Domänen eingestellt. Die technischen Einschränkungen limitieren daher die Analyse auf den Vergleich der basalen Aktivitäten der GTPase Domänen. *In vivo* könnte die Mutation L396R sterisch unfähig sein, in den stimulierten Zustand überzugehen. So wäre ein Aktivitätsverlust durchaus möglich, der zu der in Patienten gesehenen adOA Symptomatik führte (Delettre *et al.*, 2000).

Eine weitere in adOA Patienten gefundene Mutation OPA^{T503K} (Thiselton *et al.*, 2002), die eine Substitution des kleineren, hydrophoben Threonins durch das hydrophile, größere Lysin beinhaltet, zeigte eine GTPase-Aktivität von 73%. Die Mutation entspricht der Position N238 in DynA, in dem das kleine, relativ hydrophile Asparagin den exozyklischen Sauerstoff der Nukleotidbase bindet. Der Wechsel zu einer hydrophilen Aminosäure könnte eine weitaus drastischere Absenkung der Aktivität verhindert haben, wobei der größeren Rest zu sterischen Behinderungen und Störung der β -Faltblattstruktur in dem Bereich führen könnte. Diese Erläuterungen würde die resultierende Absenkung der GTPase Aktivität um 30% erklären.

Die Substitutionsmutationen in den hochkonservierten Schlüsselpositionen der GTP-Bindungsmotive zeigten die stärksten Verluste in der Hydrolyseaktivität der OPA1 GTPase-Domäne. Die Aktivitätsverluste waren aber unabhängig davon, welches Motiv von einer Mutation (G1-G4)

betroffen war. Im Vergleich dazu zeigten sich nur geringe Beeinträchtigungen bei Substitutionsmutationen in den konstitutiven Nukleotidpositionen innerhalb der GTPase-Domäne. Neben der Berücksichtigung des Fehlens einer möglichen GED, sollte auch berücksichtigt werden, dass eine Verbindung von heterozygoten Mutationen in einem Individuum (OPA1^{E270K} + OPA1^{R290W}) stärkere Symptome als einzeln auftretende Mutationen bewirken (Pesch *et al.*, 2001). Die milden Krankheitssymptome in Patienten, die je nur eine Mutation in einem Allel tragen, korrelieren mit den relativ geringen Beeinträchtigungen der GTPase Aktivität (Pesch *et al.*, 2001).

Es sollte beachtet werden, dass die oben zu Grunde gelegten molekularen Wechselwirkungen auf dem Model der kristallisierten DynA GTPase basieren (Niemann *et al.*, 2001) und diese nicht zwangsläufig mit den experimentellen Beobachtungen übereinstimmen müssen. Es liegt bisher keine Kristallstruktur für die OPA1 GTPase Domäne oder das OPA1 Gesamtprotein vor.

Um festzustellen, ob verschiedene OPA1-GTPase Mutationen im OPA1 Gesamtprotein unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Mitochondrien haben, wurden diese in Zellkultur analysiert. Endogen OPA1 exprimierende HeLa Zellen ebenso wie OPA1 defiziente MEF (MEF_{ko}; OPA1^{-/-}) Zellen wurden mit den OPA1 Mutanten transfiziert und mikroskopisch analysiert.

5.2 Abnorme Mitochondrienmorphologie durch Überexpression von OPA1 Mutanten in HeLa und MEF Zellen

Für diese Arbeit wurde der offene Leserahmen von humanem OPA1 Isoform 1 (KIAA0567; MIM 165500) gewählt, da diese Isoform in Retina und Hirn als am stärksten exprimierte Form vorliegt. Bei einer Sequenzidentität von 88% auf Nukleotidebene und 97% auf Aminosäureebene zwischen Mensch und Maus, wurden alle Mutationsvarianten und Versuche mit dem humanen OPA1 Isoform 1 durchgeführt (Delettre *et al.*, 2003).

Wie aus bereits veröffentlichten Daten bekannt war, führt die Expression eines beliebigen mitochondrial lokalisierten Proteins nicht prinzipiell zu einer morphologischen Veränderung der Organelle. Die Expression eines exogen zugeführten Proteins in die Mitochondrien, muss dort eine Funktion erfüllen, um in relativ kurzer Zeit (1-2 Tage) eine messbare Veränderung auf diese auszuüben (Cipolat *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). OPA1 lokalisiert in den Mitochondrien. Dort liegt es löslich im IMS vor und ist C-terminal eng an die IMM assoziiert, so dass der N-Terminus sich ins IMS richtet (Olichon *et al.*, 2002; Griparic *et al.*, 2004; Cipolat *et al.*, 2006).

Bei den verwendeten HeLa und MEF Zellen konnten im Normalzustand filamentöse, weit im Zytosol verzweigte Mitochondrien beobachtet werden (Abb.14, Abb.15). Die Kontrolltransfektion mit Leervektor hatte keine Auswirkungen auf die Morphologie.

5.2.1 OPA1 Mutanten führen zu verkürzten Mitochondrien in HeLa Zellen

Humanes wildtyp OPA1 und Mutationsvarianten wurden in HeLa Zellen, die endogen OPA1 exprimieren, transfiziert. Die Überexpression von wtOPA1 führte hauptsächlich zu kleinen vesikulären Mitochondrien mit einer durchschnittlichen Länge von 0,4µm, die oft in Clustern aggregierten (Abb.17). Entsprechende Beobachtungen wurden in Zellkultur auch in COS7 und HeLa Zellen beschrieben (Misaka *et al.*, 2002; Griparic *et al.*, 2004; Misaka *et al.*, 2006; Olichon *et al.*, 2007). Jedoch wurden in 3T3 Zelllinien die Ausbildung längerer, höher vernetzter Mitochondrienstrukturen festgestellt, was auf das Fehlen filamentöser und hochgradig vernetzter Mitochondrien in den 3T3 wildtyp Zellen zurückzuführen war (Cipolat *et al.*, 2004). D.h. der Effekt der mitochondrialen Fragmentierung ist abhängig von der Ausgangsstruktur der Mitochondrien in den transfizierten Zellen. Die beim wtOPA Konstrukt beobachtete Fragmentierung ist in diesem speziellen Fall nicht das Resultat fehlender Fusionsereignisse (Cipolat *et al.*, 2006), sondern ist begründet in der fehlgeleiteten Balance zwischen den Fusions (Verschmelzungs)- und Fissions (Teilungs)- Ereignissen, die sich in der Zelle durch kurzzeitige rapide Produktion von OPA1 ergab (Olichon *et al.*, 2006). Die Überexpression der Mutationsvarianten von OPA1, die bevorzugt nukleus-nah in Clustern aggregierten, führten ebenfalls zu fragmentierten Mitochondrien. Die Mutationskonstrukte, die im Zusammenhang mit der Optik Atrophie beschrieben wurden (Tab.8), beeinflussen die Mitochondrien durch ihre veränderte GTPase Aktivität. Daher zeigten sich, anders als in wtOPA, auch globuläre Mitochondrien, die vereinzelt bis zu 1µm Länge erreichen konnten. In HeLa Zellen, die OPA1^{E270K} exprimierten, lag die Anzahl globulärer Strukturen bei ca. 17% mit einem rund 7% Anteil Stäbchen, so dass sich auch die mittlere Mitochondrienlänge auf 0,49µm erhöhte (Abb.17, Abb.18). Der hohe Anteil kleiner vesikulärer Mitochondrien (ca. 76%), erinnert an die wildtyp Morphologie. Diese Ähnlichkeit wurde durch die nur geringfügig eingeschränkte GTPase-Aktivität (95%; Abb.13) untermauert. Wobei hier die erwartete stimulierte, in einen Fusionskomplex eingebundene Form wahrscheinlich die Verschiebung von der vesikulären hin zur globulären Form bedingte. Der klein bleibende Anteil intermediärer Mitochondrien könnte ein Zwischenzustand während der Umformierung zu kürzeren oder längeren Strukturen darstellen (Abb.16). Solche Effekte mit fragmentierten, globulären Mitochondrien wurden in COS7 Zellen, in denen OPA1^{E270K} und OPA1^{D273A} überexprimiert wurden, publiziert (Misaka *et al.*, 2007).

Vergleichbare Auswirkungen wie in OPA1^{E270K} wurden in OPA1^{L396R} mit ca. 77% vesikulären,

11% globulären und einem höheren Wert für Stäbchen von 12% gesehen. Bei 396OPA verlagerte sich der Strukturanteil leicht von den globulären zu Gunsten der länglichen Mitochondrien. Neben den o.g. Ähnlichkeiten finden sich weitere zwischen OPA1^{R290W}, OPA1^{T323A} und OPA1^{T503K}, in denen 64%, 63% bzw. 67% vesikuläre, 25%, 27% bzw. 23% globuläre und 11%, 10% bzw. 10% stäbchenförmige Mitochondrien auftraten. Das würde auch mit den gemessenen GTP Hydrolyseaktivitäten übereinstimmen: 70% für 290GTP, 64% für 323GTP und 73% für 503GTP. OPA1^{R290W} wurde zusammen mit OPA1^{E270K} in einem stark betroffenen Patienten gefunden. Betreffen die Mutationen nur eine Genkopie, dann treten nur leichte Krankheitssymptome auf (Pesch *et al.*, 2001). Im Laufe des Jahres 2007 wurde die Mutante OPA1^{R290Q} in Patientenfibroblasten beschrieben (Olichon *et al.*, 2007). Dort wurden 60% vesikuläre, 37% intermediäre und 3% filamentöse Mitochondrien gefunden. Da es sich hierbei nicht um exogen OPA1 überexprimierende Zellen handelt, sondern um Fibroblasten, die die Mutation endogen, in physiologisch normalen Mengen neben dem Wildtyp exprimieren, ist der geringe Rest an filamentösen (tubulären) Mitochondrien nicht erstaunlich. In den von uns transfizierten Zellen wurden keine filamentösen Mitochondrien gesehen, und die hier als globulär und stäbchenförmig definierten Mitochondrien stellen die schwer abzugrenzenden intermediären Zwischenformen zwischen vesikulären und tubulären Mitochondrien dar (Abb.16). Das Fehlen filamentöser Mitochondrien könnte an dem unregulierbaren Expressionsniveaus in den einzelnen Zellen liegen. Wurden die unterschiedlichen Unterteilungen der Morphologien in dieser Arbeit und der Veröffentlichung (Olichon *et al.*, 2007) angeglichen, wurden also die filamentösen mit den intermediären (3%+37%=40% nach Olichon *et al.*) addiert, ergab sich ungefähr die Summe, die bei der Addition der in dieser Arbeit beschriebenen globulär und stäbchenförmigen (11%+25%=36%) Mitochondrien in den exogen exprimierten HeLa Zellen gezählt wurden. Damit deckten sich die Phänotypen für diese Mutation.

In derselben Publikation von Olichon *et al.* wurde die Mutation G300E in HeLa Zellen überexprimiert. Es wurden keine filamentösen, 2% intermediäre und 98% punktförmige Mitochondrien beschrieben. Die in dem GTPase Aktivitätsassay dieser Arbeit auffällig stark beeinträchtigte Mutation 300GTP (OPA1^{G300E}) mit nur noch 41% GTPase-Aktivität (Abb.13), zeigte auch im Morphologievergleich zu den übrigen OPA1 Mutanten hervorstechende Werte (Abb. 17). In OPA1^{G300E} exprimierenden HeLa Zellen traten in nahezu gleichem Verhältnis globuläre (45%) und vesikulär fragmentierte (49%) und in geringer Zahl (5%) längliche Mitochondrien auf. Wurde die Zwischenform der globulären zu den vesikulären addiert, ergaben sich (45%+50%) 95% abgerundete, fragmentierte Mitochondrien. Ein Wert der den punktförmigen 98% von Olichon *et al.* entsprach. Diese Beispiele verdeutlichten wie schwierig der Vergleich

verschiedener Zellsysteme und Arbeiten auch durch fehlende einheitliche Einteilungen aufgrund der hohen natürlichen Diversität der Mitochondrienmorphologie ist. So wurden die intermediären Formen, zwischen vesikulär und tubulär, oft unterschiedlich eingeteilt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit festgehalten werden, dass tendenziell mit der Abnahme der GTPase Aktivität die Anzahl globulärer und vesikulärer Mitochondrien anstieg. Je mehr die Hydrolyseaktivität der GTPase Domäne der wildtyp Aktivität entsprach, häuften sich vesikuläre Mitochondrien in transfizierten HeLa Zellen. D.h., die GTPase Aktivität hat direkten Einfluss auf die OPA1 Funktion in der Regulierung der Mitochondrienmorphologie. Unter Berücksichtigung, dass die Mitochondrienmorphologie in direktem Zusammenhang mit ihrer Funktion steht (Mannella, 2006), könnten bereits kleine Veränderungen in Neuropathien enden (Li *et al.*, 2004; Zuchner *et al.*, 2004; Duvezin-Caubet *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Twig *et al.*, 2008). In wie weit und für welche spezielle Funktion (Weitung der Cristae Junction, Selektion von fehlerhaften Mitochondrien durch Fusion, Auswirkungen auf die Effizienz der Respirationskette, Zellalterung) die GTPase Domäne in OPA1 notwendig ist, wird bisher nur vermutet. Bisher ist bekannt, dass OPA1 ein bifunktionales Protein ist. Es ist notwendig für die Mfn1-abhängige mitochondriale Fusion, und OPA1 Oligomere können davon unabhängig die mitochondriale Apoptose durch Freisetzung des Cytochrom C regulieren (Frezza *et al.*, 2006).

Die Überexpression von OPA1 mit fehlender CC2-Domäne (OPA1^{905STOP}) fiel durch den stärksten Anteil an stäbchenförmigen Mitochondrien auf (Abb.17). Da sich die OPA1^{905STOP} Mutation außerhalb der GTPase Domäne befand, lagen keine Daten für die Hydrolyseaktivität vor. Damit konnten Schlüsse nur aus der Zellreaktion gezogen werden, d.h. aus den Daten der mikroskopischen Morphologiebestimmung. Es zeigte sich, dass dieses Konstrukt mit 60% einen niedrigen Wert für vesikulär fragmentierte, den höchsten mit 24% für stäbchenförmige und mit 16% einen niedrigen Wert für globuläre Mitochondrien besaß (Abb.17). Ganz anders als in der Publikation von Olichon *et al.*, in der ebenfalls ein CC2-fehlendes Konstrukt in HeLa Zellen überexprimiert wurde, konnte dort aber keine Veränderung in der Morphologie festgestellt werden (97% filamentös, 3% intermediär, 0% punktförmig). Auch in Patientenfibroblasten, die eine OPA1 Mutation besaßen, die zu einem CC2-Mangel im OPA1 Protein führte, zeigten sich wildtyp-ähnliche Mitochondrien. Jedoch konnte in den Patientenzellen keine Synthese des CC2-verkürzten OPA1 nachgewiesen werden. Stattdessen konnte man eine Abnahme des wildtyp OPA1 Proteins um ca. die Hälfte erkennen. Dem gegenüber stand zusätzlich die Beobachtungen in OPA1^{R455H} Patientenfibroblasten (Amati-Bonneau *et al.*, 2005), deren Mitochondrien als fragmentiert beschrieben wurden und damit unsere Beobachtungen bestätigten. Weiterhin lag eine Publikation aus dem Jahr 2004 vor, in der 3T3 Zellen mit OPA1^{905STOP} transfiziert wurden,

und eine deutliche Fragmentierung zu globulären Mitochondrien dokumentiert wurde (Cipolat *et al.*, 2004). Außerdem wurde eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit in Endozytoseassays für Dynamin CC2-Mutanten festgestellt. Dyn^{K694} war nicht zur Selbstinteraktion zwischen den GED Domänen fähig, zeigte aber keine negativen Auswirkungen auf die intrinsische Beschleunigung der GTP Hydrolyse und konnte sich effektiv an der Endozytose beteiligen (Sever *et al.*, 2000).

Bisher ist unklar, welche spezielle Funktion die CC2-Domäne in OPA1 hat. Die CC2-Domäne könnte mit einer zweiten CC2-Domäne oligomerisieren und als potentielle GAP Domäne dienen. Dieses gilt allerdings auch für die CC1 Domäne, die selbstassoziiieren kann (Akepati *et al.*, eingereicht). Im Fall von 905OPA, könnte die CC1 Domäne eine Assemblierung in die Proteinkomplexe unterstützen. Die volle Leistungsfähigkeit wäre durch mögliche Behinderungen in der Interaktion beeinträchtigt. Vielleicht wäre auf diese Weise eine *trans*- oder *cis*- homo-Interaktion, wie sie bei Mfn1 in *trans* nötig ist (Ishihara *et al.*, 2004), in den transfizierten Zellen blockiert.

Neben der Hydrolyseaktivität liegt, anhand der gefundenen nur 50% starken Expression des wildtyp OPA1 in Patientenfibroblasten mit OPA1 CC2-Domänen Defizienz, vermutlich ein weiterer Schwerpunkt des OPA1 Wirkmechanismus in der Expressionsstärke. Die Expressionsstärke wurde bereits sehr oft als ausschlaggebend in Enzephalomyopathien beschrieben (Ito *et al.*, 1999; Nakada *et al.*, 2001). Das bedeutet, die Konzentrationsgrenze in der Zelle, ab der das gesunde Protein die Funktion des krankhaften Proteins nicht mehr komplementieren kann, sondern beginnt mit demselben um Funktionsprozesse zu konkurrieren. Im Fall von OPA1 geht man davon aus, dass es Homooligomere, während der Fusionsprozesse möglicherweise auch heterooligomere, Komplexe bildet (Frezza *et al.*, 2006; Griparic *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007). Krankheitsverursachenden OPA1 Formen würden so in Komplexstrukturen integriert, und die verringerte Aktivität der GTPase Domänen könnte die Funktion des Proteinkomplexes stören. Dieser Mechanismus kann in Patienten bei der Kosynthese des Wildtyp- und Mutationsproteins innerhalb einer Zelle auftreten („gain-of-function“). Währenddessen kommt es bei OPA1 Mutanten mit fehlender CC2-Domänen im Patienten wohl zu einer Degradation des fehlerhaften Proteins im Rahmen des internen Zellschutzes („haploinsufficiency“). So ließe sich die 50%-ige Menge an wildtyp OPA1 erklären, der sowohl in Patienten (Olichon *et al.*, 2007) als auch in OPA1^(+/-) Mäusen gefunden wurde (Davies *et al.*, 2007). Das Mausmodell basiert auf einer OPA1 Genmutation, die zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese (vor der GTPase Domäne) führte.

Bei der Abmessung der Mitochondrienlängen wurde festgestellt, dass die Mitochondrien insbesondere bei den OPA1 Mutationsvarianten eine hohe Standardabweichung besaßen. 300OPA und 905OPA unterschieden sich als einzige Konstrukte signifikant von wtOPA. Die Varianz beruhte generell auf der großen Inhomogenität der Mitochondrienmorphologie.

Diese hohe Inhomogenität des Mitochondriennetzwerkes spiegelt die beobachtete Symptomvariabilität der adOA wieder, die sich in der unvollständigen Penetranz der Erkrankung ausdrückt (Votubra *et al.*, 1998; Cohn *et al.*, 2007). Auch für Patienten mit mitochondrialen Zytopathien zeigt sich oft eine heterogene und unspezifische Symptomatik, so dass auch klinische Befunde unspezifisch sind (Janssen, 2007). Mittlerweile wurden weitere Krankheitsbilder in Zusammenhang mit Veränderungen des OPA1 Proteins beschrieben. Beispielsweise wurde Taubheit (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Liguori *et al.*, 2008), PEO (Progressive externe Ophtalmologie) (Ferraris *et al.*, 2008), mtDNA Deletionen und daraus resultierendem Verlust der Respirationskapazität, Ataxia (Amati-Bonneau *et al.*, in press; Hudson *et al.*, in press), aber auch Diabetes (Twig *et al.*, 2008) in Zusammenhang mit OPA1 gesehen. Es ist zu vermuten, dass die optische Atrophie primär durch Mutationen im *OPA1* Gen hervorgerufen wird. Sekundär scheinen aber weitere Einflussgrößen individuell im Patient wie z.B. weitere beeinträchtigte mitochondrien-relevante Proteine (MEGS Proteine, Proteine der Fusions- und Fissionsmaschinerie) zur Ausprägung des Schweregrades der Symptome beizutragen.

Die übermässig starke ausgeprägte Standardabweichung in HeLa Zellen lag höchstwahrscheinlich begründet in der biologischen Ausgangssituation der Zellen. Diese Zellen besitzen einen endogen OPA1-Pool aus acht Isoformen, der den Effekt der Überexpression einer Mutante beeinflussen könnte. Eine überhöhte Varianz könnte durch die Expression der OPA1 Mutanten in einem OPA1 freien Zellsystem vermieden werden

5.2.2 Fähigkeit der OPA1 Mutanten zur Wiederherstellung der wildtyp Mitochondrienmorphologie in OPA1^(-/-) MEF Zellen (MEF_ko)

In der Hefe wurde gezeigt, dass die Mitochondrienfusion in OMM- und IMM-Fusion unterteilt werden kann. Es handele sich um zwei Prozesse, die getrennt voneinander ablaufen können und unterschiedliche Proteine und zellbiologische Voraussetzungen benötigen (Malka *et al.*, 2005). Für die OMM-Fusion ist der GTP-Spiegel und das mitochondriale Membranpotential ebenso notwendig wie das Protein Mfn1. Aus der erfolgreichen Fusion von MEF_wt Mitochondrien miteinander und der fehlenden Fusion der Mitochondrien in MEF OPA1^(-/-) (MEF_ko) Zellen (Abb.44) kann man schließen, dass ohne OPA1 keine Fusion der Mitochondrien möglich war. Damit konnte gezeigt werden, dass OPA1 essentiell für die Mitochondrienfusion ist.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass wildtyp (MEF_wt) mit OPA1 defizienten MEF Zellen (MEF_ko) fusionieren konnten, trotz Fusions-Inkompetenz der MEF_ko Zellen (Abb.46). Die Mengen an OPA1 aus den MEF_wt Zellen reichen also für die Fusion beider Mitochondrien-

zellen aus. Wahrscheinlich kam es nach der Fusion der Außenmembranen zu einem Austausch des OPA1 wildtyp Proteins über den Intermembranraum (IMS) der nun verbundenen Mitochondrien, so dass die IMM-Fusion stattfinden konnte. Eine Mitochondrienfusion in OPA1 defizienten MEF Zellen (MEF_ko), die das Mutationskonstrukt 300OPA exprimierten, blieb aus (Abb.47B). Gleichzeitig war das wildtyp OPA1 Protein (wtOPA) in der Lage die Mitochondrien von fusions-inkompetenten MEF_ko Zellen zu fusionieren (Abb.47C). Daraus konnte geschlossen werden, dass eine stark verringerte GTPase Aktivität im OPA1 Protein (41% für 300GTP; Abb.13) dessen Fusionsfunktion behindert.

Eine eingeschränkte Fusion würde die Häufung verkürzter (vesikulärer, globulärer) Mitochondrien (Kap.4.2) erklären. Dies könnte einerseits die rudimentären, unorganisierten Cristae in den MEF_ko EM Aufnahmen (Abb.33) und andererseits auch die am häufigsten auftretende Mitochondrienmorphologie (Vesikuli) in den transfizierten Zellen erklären, die OPA1 GTPase Mutanten exprimierten (Abb.34).

Veröffentlichungen, die aus ihren Untersuchungen an Mitochondrien folgerten, dass es einen Zusammenhang zwischen Mitochondrienmorphologie und Funktion gibt, häuften sich in den vergangenen Jahren (Li *et al.*, 2004; Zuchner *et al.*, 2004; Duvezin-Caubet *et al.*, 2006; Manella, 2006; Huang *et al.*, 2007; Navratil *et al.*, 2008). Die Mitochondrienfusion und der damit verbundene Austausch von Mitochondrieninhalten sind unter anderem nötig, um mtDNA, Stoffwechselprodukte, und andere essentielle Mitochondrienproteine sowie das Membranpotential in den Zellen zu stabilisieren und fehlerhafte Mitochondrien zu komplementieren (Nakada *et al.*, 2001; Skulachev VP, 2001; Chen *et al.*, 2005; Chan DC, 2006; Twig *et al.*, 2008). Die Akkumulation von defekten mtDNA Molekülen kann zu Respirationsproblemen führen. Diese können sich in erhöhter ROS Produktion und sinkender ATP Synthese ausdrücken, was in der Zelle Stress verursacht. Der Stress wiederum kann bei Zellen mit hohem Energiebedarf (z.B. Nervenzellen) im Zelltod enden. Das Phänomen der Akkumulierung globulärer Mitochondrien wurde bereits bei Untersuchungen des Zellalterungsprozesses beschrieben. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese großen Mitochondrien fusions-inkompetent sind und ein verringertes OPA1 Expressions Niveau besitzen (Navratil *et al.*, 2008).

Die ähnlichen Effekte bestimmter OPA1 Mutanten auf die Morphologieverteilung der Mitochondrien (270OPA mit wtOPA; 290OPA mit 323OPA mit 396OPA mit 503OPA; Abb.34), die bereits bei der Transfektion in HeLa Zellen beobachtet wurde (Abb.17), war auch in MEF_ko Zellen erkennbar.

Die Wirkungen von wtOPA und 300OPA hebt sich in beiden Zellsystemen (HeLa & MEF Zellen) am auffälligsten von den übrigen Konstrukten ab. Während die Variante OPA1^{G300E} bei Über-

expression in einem OPA1 endogen exprimierendem System (HeLa Zellen) vergleichbar starke Anteile vesikulärer und globulärer Mitochondrien zeigte, trat bei der ausschließlichen Expression von OPA1^{G300E} in MEF_ko Zellen eine Verschiebung hin zu einem dominierenden Anteil vesikulärer (86%) und nur kleinen Anteilen der intermediären Formen (14% globulär und 0% stäbchenförmig) auf. Die mitochondriale Morphologieverteilung von wtOPA ähnelte der Verteilung, wie sie für 270OPA beobachtet wurde. Nur diese beiden Konstrukte (wtOPA, 270OPA) führten zu tubulären Mitochondrien (18% für wtOPA, 8% für 270OPA). Für diese Varianten wurden im Durchschnitt die längsten Mitochondrien gemessen, 2,77µm für wtOPA und 1,42µm für 270OPA.

Bei der Mutante OPA1^{L396R} blieb überraschenderweise trotz hoher Aktivität der GTPase Domäne (396GTP) die Wiederherstellung von tubulären Mitochondrienformen aus. In nachträglich erzeugten stabilen 396OPA:MEF_ko Zellen zeigte sich eine Instabilität des OPA1^{L396R} Proteins. Vermutlich entsteht ein fehlgefaltetes OPA1^{L396R} Protein, das zu fehlerhafter OPA1 Oligomerisierung führen könnte und von der Zelle erkannt und abgebaut wird. Dies ist bei der kurzzeitigen, transienten Expression des Proteins in hohen Mengen vom Protein-Kontroll-System der Zelle nicht möglich.

In transient transfizierten MEF_ko Zellen zeigte 905OPA kaum Stäbchen (2%), dafür 41% globuläre und 57% vesikuläre Mitochondrien. Das Konstrukt besitzt zwar eine intakte GTPase Domäne, aber ihm fehlt die CC2-Domäne. Dieses Konstrukt war nicht in der Lage tubuläre Strukturen in MEF_ko Zellen zu unterstützen. Damit ist die CC2 Domäne essentiell für die Fusionsfunktion von OPA1. In OPA1^{905STOP} transfizierten HeLa Zellen war der Anteil stäbchenförmiger Mitochondrien mit 24% größer als in MEF_ko Zellen (2%). Endogene OPA1 Formen in HeLa Zellen könnten demnach die Fusionseffizienz der OPA1^{905STOP} Mutante unterstützen.

Bei den MEF_ko handelt es sich um ein Zellsystem ohne endogenen OPA1 Expressionshintergrund, was einerseits den messbaren signifikanten Unterschied der Mitochondrienlängen aller Mutationsvarianten zum Wildtyp, andererseits die zwar durch die Variabilität der Mitochondrienmorphologie vorhandene, aber im Vergleich zu HeLa Zellen geringere Standardabweichung erklären würde.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass erstens in beiden Zellsystemen (mit und ohne endogener OPA1 Expression) tendenziell ähnliche GTPase-Aktivitäten einen vergleichbaren Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie haben. Das bedeutet, dass die GTPase Aktivität mit dem Ausmaß der morphologischen Veränderungen korreliert. Zweitens spricht der Einfluss der endogenen Formen für eine OPA1-Interaktion mit sich selbst und unterstützt die Vermutung der

Komplexbildung. Die dritte wichtige Schlussfolgerung ist, dass zur Regulierung der Morphologie beide Domänen (GTPase und CC2-Domäne) essentiell sind.

Für zukünftige Analysen sollten die acht OPA1 Isoformen im Mittelpunkt stehen. Schließlich vermochte wtOPA zwar die normale tubuläre Netzwerkstruktur wiederherzustellen, aber nicht zu 100%. Stattdessen sind Tubuli zu 18% erkennbar, bei einem Hauptanteil vesikulärer Mitochondrien (50%) und 23% intermediärer Stäbchen (Abb.34). Das Fehlen der übrigen sieben Isoformen könnte die 100%-ige Tubularisierung im Zellsystem verhindert haben. So könnte möglicherweise eine Koexpression von verschiedenen Isoformen die Mitochondrienmorphologie vollständig wiederherstellen. Außerdem sollten sekundäre Effekte in der Zelle, insbesondere ausgelöst durch Interaktionen der OPA1 Proteine miteinander und zu möglichen Interaktionspartnern weiter analysiert werden. In diesem Zusammenhang muss nicht nur der Einfluss der GTPase Domäne, sondern auch die CC2 Domäne näher untersucht werden.

5.3 MEF_ko Zellen sind Respirationsdefizient

Die polarografische Analyse der Respiration in MEF_ko Zellen zeigte im Vergleich zu den MEF_wt Zellen stark reduzierte Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe (Kap.4.3, Abb.48). Eine Verringerung der Respirationskapazität wurde in MEF Zellen beschrieben, deren OPA1 Expression experimentell mittels iRNA herunterreguliert wurde (Chen *et al.*, 2005). Aus den polarografischen Messungen dieser Arbeit konnte geschlossen werden, dass der Komplex I und/oder Komplex IV unfähig ist Elektronen innerhalb der Atmungskette zu übertragen. Da bei der polarografischen Messung die OXPHOS Komplexe innerhalb der Atmungskette und damit abhängig voneinander vermessen werden, kann nicht genau bestimmt werden, welcher Komplex defizient ist und die niedrigen Sauerstoff-Verbrauchswerte verursacht. Zur Lokalisierung und Verifizierung der polarografischen Messungen wurden in Kooperation mit Dr. A. Janssen die Komplexaktivitäten separat vermessen.

Komplex II wurde als Markerenzym gewählt, weil konstante Aktivitäten in allen Mitochondrienproben aus MEF Zellen ermittelt werden konnten. Während sich bei den e12 MEF Zellen unauffällige Unterschiede in den Komplexaktivitäten zwischen wildtyp und heterogenen Zellen ergaben (Abb.50), waren diese Unterschiede in den MEF Zellen vom Tag e8,5 eindeutig. Hierbei zeigte sich eine sehr starke Verringerung des Komplexes I und eine ebenfalls deutlich verringerte Komplex IV Aktivität (Abb.52). Dies könnte in den geringeren Mengen an Komplex I und IV, die im Western Blot detektiert wurden, begründet liegen. Die verringerte Respirationskapazität würde wiederum die beobachtete Wachstumshemmung (Abb.53) erklären.

Aus der geringen Auswirkung in heterozygoten Zellen und starker Ausprägung in MEF_{ko} Zellen, zusammen mit den Beobachtungen der Mitochondrienmorphologien lässt sich schließen, dass mit einer geringeren Modifizierung der Mitochondrienmorphologie durch OPA1 nur eine schwache Verringerung der Respirationsaktivität einhergeht (MEF_{het e12}). Dies steht im Einklang mit unserer Vermutung, dass die veränderte mitochondriale Feinstruktur die Komplexaktivität beeinträchtigt. Bei starkem Verlust oder Beeinträchtigung von OPA1 durch Mutationen folgt eine starke Veränderung der Mitochondrienmorphologie und Cristastruktur, wodurch die dort ablaufenden Respirationsprozesse gestört werden und zu einer reduzierten Respirationsaktivität führen (MEF_{ko}). Negative Beeinflussungen des Energieerzeugungssystems, wie sie auch in Patientenfibroblasten (Amati-Bonneau *et al.*, 2005) und Muskelgewebe von Patienten (Lodi *et al.*, 2004) beobachtet wurden, können eine indirekte Folge der OPA1 Fehlfunktion sein.

5.4 Beeinflussung der Cristastrukturen, aber nicht der Respirationsaktivität in Lymphoblastoiden Patientenzellen

5.4.1 Deformierte Cristaemorphologie in adOA Patienten LCL

Die Feinstruktur der Mitochondrien wurde in LCL Zellen aus adOA Patienten und Kontrollen analysiert und verglichen (Abb.56). Die Streuung der Daten für die Mitochondrienfläche und Cristaelänge bei den Patientenzellen kann vermutlich auf den heterogenen Hintergrund (OPA1 wildtyp + Mutations Allel) zurückgeführt werden. Die signifikant größere Mitochondrienfläche in den Patientenzellen ergibt sich durch die aufgequollenen Mitochondrien. Auch die signifikant verringerte Cristaelänge in den Patientenmitochondrien entsprach den beobachteten kürzeren, oft unorganisierten und z.T. nur noch rudimentär vorhandenen Cristae. Beschreibungen von ungeordneten Cristaelamellen und gequollenen Mitochondrien wurden bereits in Zellen, deren OPA1 Expression experimentell herunterreguliert wurde, beschrieben (Olichon *et al.*, 2003; Griparic *et al.*, 2004; Arnoult *et al.*, 2005). Die Beobachtungen dieser Arbeit an Patientenmitochondrien zusammen mit den Ergebnissen aus den Transfektionsexperimenten von OPA1 Varianten in Zellkultur wiesen nach, dass die Regulierung der Mitochondrienmorphologie eine direkte OPA1 Funktion darstellt.

5.4.2 Normale Respirationskapazität in Lymphoblastoiden Patientenzellen

In OPA1^{R455H} Fibroblasten (Amati-Bonneau *et al.*, 2005) und im Muskelgewebe von Patienten mit einer Deletionsmutation (Leserahmenverschiebung; c.2708-2711delTTAG), (Lodi *et al.*, 2004) wurde eine Verringerung in der ATP Synthese gemessen. In den Messungen für OPA1-

LCL Zellen konnte dagegen kein markanter Unterschied zu den Kontrollen gefunden werden (Kap.4.5.2, Abb.57). Bei den Messungen der einzelnen Komplexe I-V variierten die Werte innerhalb der Patientengruppe aber stark (große Boxplotfläche). Die Variationen und Diskrepanz zu den früheren Veröffentlichungen können mehrere Gründe haben:

1) Klinische Abnormalitäten treten sehr oft auf in Patienten mit mitochondrialen Krankheiten, die zu heterogenen und oft unspezifischen Symptomatiken führen. Daher wird in der Regel erst von einer mitochondrialen Erkrankung gesprochen, wenn zwei entsprechende chronische und ansonsten unerklärliche Symptome bevorzugt in unterschiedlichen Geweben auftreten (Rustin *et al.*, 1994; DiMauro *et al.*, 1999).

2) Es kommen Fehlmessungen vor, die zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führen können. So kann es gewebespezifische Unterschiede in den Aktivitäten geben. Beispielsweise kann eine messbare Respirationsdefizienz in Muskelgewebe, Fibroblasten oder Lymphozyten auftreten, sie muss jedoch nicht in allen Geweben gleichzeitig in einem Patienten auftreten (Trijbels *et al.*, 1993). Damit können basierend auf den zur Verfügung stehenden Zelltypen widersprüchliche Ergebnissen erzielt werden.

3) Die bestehende Restaktivität eines beeinträchtigten Enzyms aus der Respirationskette kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. So wurde in Fibroblasten aus Komplex I defizienten Patienten, bei denen eine nuklear lokalisierte Mutation für eine Untereinheit des Enzyms ermittelt wurde, die Enzymaktivität gemessen. Erstaunlicherweise konnte eine unerklärliche Restaktivität von Komplex I zwischen 18% und 89% festgestellt werden (Jansson, 2007).

4) Es kann ein Defekt in der ANT (Adenin Nukleotid Translokase) zu Grunde liegen, was die geringen ATP-Messwerte im aktiven Muskel (Lodi *et al.*, 2004) erklären kann.

5) Ein Defekt in einem Protein des MEGS (PDH_C, Citratzyklus) könnte vorliegen, der mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht detektiert werden konnte.

6) Die Gegenwart des wildtyp OPA1 Proteins könnte den Funktionsverlust des mutierten Allels in den Patientenzelllinien abpuffern. Eine Defizienz würde sich möglicherweise erst bei einem erhöhten Energiebedarf der Zelle signifikant abzeichnen.

Zusammenfassend sind die Aktivitäten der Respirationsenzyme in OPA1 heterozygoten LCL Zellen aus Patienten nicht signifikant verringert, zeigen aber, dass im einzelnen Individuum durchaus Aktivitätsabnahmen vorkommen. Aus den signifikanten Unterschieden der Mitochondrien in der Morphologieanalyse in Patienten (Kap.4.5.1) und den beschriebenen Zellsystemen (Kap.4.2) lässt sich schließen, dass OPA1 wohl direkt die Morphologie der Mitochondrien reguliert, jedoch nur indirekt die Respirationsfunktion der Mitochondrien beeinflusst.

Dem zu Folge führen OPA1 Fehlfunktionen direkt zu Cristae-Veränderungen, in denen die OXPHOS Enzyme und Transportproteine (z.B. ANT) sitzen. In den deformierten Cristaelamellen könnten sich dann nicht mehr die Untereinheiten größerer Transmembran-Proteine (z.B. Komplex I mit 970 kDa) oder integraler Mitochondrienproteine zusammensetzen. Dadurch wäre das Energie-Generierungssystem der Zelle mehrfach betroffen, da auch die Translokation von Proteinen und Substraten (z.B. Pyruvat, ANT) durch die IMM in die Matrix nur noch eingeschränkt möglich wäre. Eine solche Einschränkung wurde erst kürzlich erstmals als Krankheitsursache beschrieben (Mayr *et al.*, 2007). Die sekundären Folgen der Veränderung der Mitochondrienmorphologie können daher zu krankhaften Effekten im Zusammenhang mit metabolischen Prozessen (z.B. Citratzyklus, OXPHOS) führen. Welche Proteinkomplexe konkret betroffen sind, wäre als nächstes zu untersuchen, um auch Lösungsansätze für Krankheiten zu finden, die erst seit kurzem in Zusammenhang mit OPA1 gebracht werden konnten.

6 Ausblick

Als zukünftige Fragestellungen sollten folgende Punkte weiter erforscht werden:

- Der Einfluss von OPA1 GTPase-Mutanten auf die Apoptose (in Kooperation mit Dr. R. Youle, NIH, USA; Publikation in Vorbereitung).
- Kristallisation des OPA1 Proteins, um Wechselwirkungen zwischen Oberflächen innerhalb der OPA1 GTPase Domäne zu entschlüsseln. Außerdem könnte die 3-D Struktur von OPA1 auch über mögliche Interaktionen zwischen den OPA1 Domänen (CC- und GTPase-Domäne) Aufschluss geben.
- Der Einfluss der Mitochondrienmorphologie auf die Assemblierung von integralen und peripheren Membrankomplexen in der inneren Mitochondrienmembran (z.B. OXPHOS Komplexe, ANT).

Literaturverzeichnis

1. Alexander C, Votruba M, Pesch UEA, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000; 26: 211-215.
2. Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A. OPA1 R445H Mutation in Optic Atrophy Associated with Sensorineural Deafness. *Ann Neurol*. 2005; 58: 958-963.
3. Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, et al. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy “plus” phenotypes. *Brain*. In press.
4. Aijaz S, Erskine L, Jeffery G, Bhattacharya SS und Votruba M. Developmental expression profile of the optic atrophy gene product: OPA1 is not localized exclusively in the mammalian retinal ganglion cell layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45:1667-73.
5. Arnould D, Grodet A, Lee YJ, et al. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 2005; 280:35742-35750.
6. Bakeeva LE, Chentsov Y und Skulachev VP. Mitochondrial framework (reticulum mitochondrial) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1978; 501: 349-369.
7. Bayley JP, Devilee P, Taschner PEM. The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma, paraganglioma and mitochondrial complex II deficiency . *BMC Medical Genetics* 2005; 6: 39-45.
8. Bereiter-Hahn J und Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc.Res.Tech*. 1994; 27: 198-219.
9. Bossy-Wetzell E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R und Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2003; 15: 706-716.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
11. Buckle M, Guerrieri F, Paziienza A, Papa S. Studies on polypeptide composition, hydrolytic activity and proton conduction of mitochondrial F₀F₁ H⁺ ATPase in regenerating rat liver. *Eur J Biochem* 1986; 155: 439-45.
12. Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Bovine complex I is a complex of forty-five different subunits. *J Biol Chem* 2006; 281: 32724-7.
13. Cerveny KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE und Sesaki H. Regulation of mitochondrial fusion and division. *TREND Cell Biol*. 2007a; 17: 563-69.
14. Cerveny KL, Studer SL; Jensen RE, Sesaki H. Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev. Cell* 2007b; 12: 363-75.
15. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging and development. *Cell* 2006; 125: 1241–52.
16. Chang CR und Blackstone C. Cyclic-AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem*. 2007; 282: 21583-87.
17. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160:189-200.
18. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; 280: 26185-26192.

19. Cipolat S, Martins DB, Dal Zilio B. und Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2004; 101: 15927-15932.
20. Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, et al. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome C release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodelling. *Cell* 2006; 126: 163-175.
21. Cohn A, Toomes C, Potter C, et al. Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 656-662.
22. Cooperstein SJ, Lazrow A. A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *JBC* 1951; 189: 665-70.
23. Croteau DL, Stierum RH und Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat. Res.* 1999; 434: 137-48.
24. Dadgar S, Hagens O, Dadgar SR, et al. Structural model of the OPA1 GTPase domain may explain the molecular consequences of a novel mutation in a family with autosomal dominant optic atrophy. *Exp Eye Res* 2006; 83: 702-6.
25. Damke H, Binns D, Ueda H, et al. Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *MBC* 2001; 12: 2578-2588.
26. Davies V, Hollins A, Piechota MJ, et al. OPA1 deficiency in mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *HMG* 2007; 16: 1307-18.
27. Delettre C, Lenaers G, Griffin JM, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000; 26: 207-10.
28. Delettre C, Griffin JM, Kaplan J, et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2001; 109:584-91.
29. Delettre C, Lenaers G Belenguer P, Hamel CP. Gene structure and chromosomal localization of mouse OPA1: its exclusive from the Bst locus. *BMC Genet.* 2003; 4: 1-7.
30. De Lonley P, Valnot I, Barrientos A. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 2001; 29: 57-60.
31. De Meirleir L, Seneca S, Damis E. Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene. *Am J Med Genet* 2003; 121A: 126-31.
32. DiMauro S, Bonilla E, De Vivo DC. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy ? *J Child Neurol.* 1999; 14: 323-35.
33. Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, et al. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *JBC* 2006; 281: 37972-979.
34. Duvezin-Caubet S, Koopen M, Wagner J, et al. OPA1 Processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell.* 2007; 18: 3582-90.
35. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 2001; 1:515-25.
36. Frezza C, Cipolat S, De Brito OM, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006; 126: 177-89.
37. Ferraris S, Clark S, Garelli E, et al. Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in POLG2 and OPA1. *Arch Neurol.* 2008; 65: 125-31.

38. Frezza C, Cipolat S, Martins B, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006; 126:177-189.
39. Fukushima NH, Brisch E, Keegan BR, Bleazard W und Shaw JM. The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol.Biol.Cell* 2001; 12: 2756-66.
40. Green DR und Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626-29.
41. Griffin EE, Graumann J und Chan DC. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 2005; 170: 237-248.
42. Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ und van der Bliet AM. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem.* 2004; 279: 18792-18798.
43. Griparic L, Kanazawa T, van der Bliet A. Regulation of the mitochondrial dynamin like protein OPA1 by proteolytic cleavage. *JCB* 2007; 178: 757-764.
44. Hollenbeck PJ. The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci.* 1996; 1: d91-102.
45. Hoyt CS. Autosomal dominant optic atrophy. A spectrum of disability. *Ophthalmology* 1980; 87:245-51.
46. Huang P, Yu T, Yoon Y. Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death. *Eur J Cell Biol* 2007; 86: 289-302.
47. Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, et al. Mutations of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain.* In press.
48. Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE und Nunnari J. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 2005; 170: 1021-27.
49. Ishihara N, Eura Y, Miohara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 2004; 117: 6535-46.
50. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, et al. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO* 2006; 25: 2966-77.
51. Ito S, Ohta S, Nishimaki K, et al. Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissue from elderly patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2099-2103.
52. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.
53. Jansson AJM, Trijbels FJM, Sengers RCA, et al., Spectrophotometric assay for complex 1 of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem.* 2007; 53: 729-34.
54. Jansson AJM. *Biochemical Diagnostics for Mitochondrial (Encephalo)myopathies.* Ponsen & Ooijen bv, Wageningen 2007; ISBN 978-90-9021985-1.
55. Johnston PB, Gaster RN, Smith VC und Tripathi RC. A clinicopathologic study of autosomal dominant optic atrophy. *Am J Ophthalmol.* 1979; 88:868-75.

56. Kamei, S., M. Chen-Kuo-Chang, C. Cazeville, et al. Expression of the Opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its down regulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:4288-94.
57. Karbowski M, Neutzner A; Youle RJ. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol.* 2007; 178: 71-84.
58. Kim JY, Hwang JM, Ko HS, Seong MW, Park BJ und Park SS. Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 2005; 64: 966-72.
59. Kjer P, Jensen OA und Klinken L. Histopathology of eye, optic nerve and brain in a case of dominant optic atrophy. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1983; 61: 300-12.
60. Kjer B, Eiberg H, Kjer P und Rosenberg T. Dominant optic atrophy mapped to chromosome 3q region. II. Clinical and epidemiological aspects. *Acta Ophthalmol. Scand* 1996; 74: 3-7.
61. Koshiba,T., Detmer,S.A., Kaiser,J.T., Chen,H., McCaffery,J.M., and Chan,D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-62.
62. Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 547.
63. Kroemer G und Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 2000; 6: 513-519.
64. Kurland CG und Andersson SG. Origin and evolution of the mitochondrial proteom. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 786-820.
65. Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA und van der Bliek AM. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol.Cell* 1999; 4: 815-826.
66. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
67. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL und Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5001-11.
68. Lee S, Jeong SY, Lim WC, et al. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem.* 2007; 282: 22977-83.
69. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, et al. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004; 119: 873-887.
70. Ligon LA und Steward O. Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J.Comp Neurol.* 2000; 427: 351-361.
71. Liguori M, La Russa A, Manna I, et al. A phenotypic variation of dominant optic atrophy and deafness (ADOAD) due to a novel OPA1 mutation. *J Neurol.* 2008; 255: 127-9.
72. Lodi R, Tonon C, Valentino ML, et al. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol.* 2004; 56: 719-23.
73. Lyle WM. Genetic Risks. University of Waterloo Press, Waterloo, Ontario, 1990.
74. Lynn S, On the origin of mitosing cells. *J Theor Bio.* 1967, 14: 255-74.
75. Malka F, Guillery O, Ciufentes-Diaz C, et al. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membrane. *EMBO reports* 2005; 6: 853-59.

76. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *BBA* 2006; 1763: 542-548.
77. Marks B, Stowell M, Vallis Y, et al. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 2001; 410: 231-35.
78. Mayr JA, Merkel O, Kohlwein SD, et al. Mitochondria phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 478-84.
79. Meeusen S, McCaffery JM und Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 2004; 305: 1747-52.
80. Messerschmitt M, Jakobs S, Vogel F, Fritz S, Dimmer KS, Neupert W und Westermann B. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J.Cell Biol.* 2003; 160: 553-564.
81. Misaka T, Miyashita T und Kubo Y. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in Brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 2002; 277: 15834-15842.
82. Misaka T, Murate M, Fujimoto K, et al. The dynamin-related mouse mitochondrial GTPase OPA1 alters the structure of the mitochondrial inner membrane when exogenously introduced into COS-7 cells. *Neu Res* 2006; 55:123-33.
83. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 144-148.
84. MITOMAP. Mitochondrial genome database. <http://www.mitomap.org/>
85. Mozdy AD, McCaffery JM und Shaw JM. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J.Cell Biol.* 2000; 151: 367-380.
86. Nakada K, Inoue K, Ono T, et al. Inter-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 2001; 7: 934-940.
87. Nangaku M, Sato-Yoshitake R, Okada Y, et al. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 1994; 79: 1209-1220.
88. Navratil M, Terman A, Arriaga EA. Giant mitochondria do not fuse and exchange their contents with normal mitochondria. *Exp Cell Res* 2008; 314: 164-72.
89. Neupert W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 863-917.
90. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; 112: 4781-90.
91. Niemann H, Knetsch M, Scherer A, et al. Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO* 2001; 20: 5813-5821.
92. Olichon A, Emorine L, Descoins E, et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters* 2002; 523: 171-176.
93. Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, et al. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* 2006; 211: 423-430.
94. Olichon A, Guillou E, Delettre C, et al. Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochem Biophys Acta.* 2006a; 1763: 500-09.

95. Olichon A., Elachouri G., Baricault L., Delettre C., Belenguer P., Lenaers, G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death. Differ.* 2007; 14: 682-92.
96. Payne M, Yang Z, Katz BJ, et al. Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in OPA1. *Am J Ophthalmol.* 2004; 138: 749-55.
97. Pereira AJ, Dalby B, Stewart RJ, Doxsey SJ und Goldstein LS. Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 1997; 136: 1081-1090.
98. Pesch UEA, Leo-Kottler B, Mayer S, et al.. OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Hum Mol Genet* 2001, 10:1359-1368.
99. Pesch, U.E., J.E. Fries, S. Bette, H. Kalbacher, B. Wissinger, C. Alexander, and K. Kohler. OPA1, the disease gene for autosomal dominant optic atrophy, is specifically expressed in ganglion cells and intrinsic neurons of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004. 45:4217-25.
100. Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin-superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 133-147.
101. Rustin P, Chretien D, Bourgeron L, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 35-51.
102. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
103. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-4.
104. Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.
105. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001; 114: 867-874.
106. Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y und Endo H. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys. Res Commun.* 2003; 300: 482-493.
107. Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP und Jensen RE. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2342-56.
108. Sesaki H und Jensen RE. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem.* 2004; 279: 28298-303.
109. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 23-9.
110. Song Z, Chen H, Fiket M, et al. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol.* 2007; 178: 749-755.
111. Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol* 1969; 13: 3-11.
112. Sweitzer SM und Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 1998; 93: 1021-29.
113. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem.* 2007; 282: 11521-29.

114. Thiselton DL, Alexander C, Morris A, Brookset al. A frameshift mutation in exon 28 of the OPA1 gene explains the high prevalence of dominant optic atrophy in the Danish population: evidence for a founder effect. *Hum Genet* 2001; 109:498-502.
115. Toomes C, Marchbank NJ, Mackey DA, et al. Spectrum, frequency and penetrance of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1369-78.
116. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4.
117. Trijbels JMF, Sengers RCA, Ruitenbeek W, et al. Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial (encephalo-)myopathies. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 178-84.
118. Twig G, Salomon AG, Wickstrom JD, et al. Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291:C176–C184.
119. Twig G, Elorza A, Molina AJA, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008; 27: 433-46.
120. Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *J Med Genet* 1998; 35: 793-800.
121. Warnock DE, Hinshaw JE und Schmid SL. Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 22310-314.
122. Wasiak S, Zunino R, McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol.* 2007; 177: 439-50.
123. Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinski TJ, Cassidy-Stone A und Nunnari J. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 2003; 160: 303-11.
124. Youle RJ und Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005; 6: 657-663.
125. Zheng X, Shoffner JM, Voljavec AS, Walleace DC. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *BBA* 1990; 1019: 1-10.
126. Züchner S., Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 2004; 36: 449-51.

Danksagung

Ich möchte Dr. Christiane Alexander für die Möglichkeit der Bearbeitung und Ihre Unterstützung meines Promotions-Projektes am MDC danken. Bei Prof. Dr. Bader möchte ich mich für sein offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft bedanken. Dankbar bin ich auch meinen Kooperationspartnern, die sich von meiner Arbeit überzeugen ließen und eine fruchtbare Zusammenarbeit ermöglichten.

Herzlichen Dank an meine Kollegen, die Abseits meines Projektes stets gute Zuhörer waren und es verstanden haben, mich aufzumuntern. Diese Gespräche in Zeiten der Krankheit, Ergebnislosigkeit und besonders in Zeiten, in denen Fremd-Veröffentlichungen mit Teilaspekten meines Projektes erschienen, haben mich aufgebaut und den verlängerten Aufenthalt am Institut erträglich gemacht.

Ganz lieben Dank auch an meine Familie. Ohne Ihre Unterstützung und Ihren Glauben an meine Fähigkeiten, wären einige dunkle Tage sehr viel schwärzer und viele Zweifel sehr viel stärker gewesen.

Mit eurer Hilfe konnte ich in mir die Motivation und Zuversicht aufbauen, die nötig war, um mein Projekt flexibel den aktuellen Umständen anzupassen und erfolgsversprechend zu erweitern.

Euch allen möchte ich sagen:

Danke !

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen:

Fiket M, Chan D, *Bulczak A*, Seeliger MW, Strenzke N, Tanimoto N, Beck SC, Akepati VR, Erdmann B, Schuelke M, Chan DC, Alexander C. Early embryonic death and severe disturbance of mitochondrial integrity in OPA1^{-/-} mice. *eingereicht in Journal of Cell Science*.

Bulczak A, Kirstin Morris, Youle R, Jansson A, Schuelke M, Erdmann B, Christiane A. Importance of the GTPase domain for OPA1 function. *in Vorbereitung* .

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Anita Bulczak, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Biochemische und zellbiologische Analyse mutanter Varianten der OPA1-GTPase“ selbstverfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift