

ZUSAMMENFASSUNG

Mitochondrien sind essentielle, cytoplasmatische Organelle, die den Hauptanteil der Energie generieren, den eine eukaryontische Zelle benötigt. Die Struktur und Funktion der Mitochondrien wird durch mitochondrial- und kernkodierte Proteine aufrechterhalten. Die gesamte Mitochondrienpopulation einer Zelle befindet sich in einem konstanten Flux, der durch permanente Fusions- und Teilungsvorgänge dieser Organellen in Gang gehalten wird. Defekte in dieser Dynamik können Defizite in der Respiration, Morphologie und Beweglichkeit der Mitochondrien verursachen, die im Extremfall sogar zur Apoptose führen. Mutationen in OPA1, einem kernkodierten mitochondrialen Protein, welches in mitochondriale Fusionsprozesse involviert ist, können der Grund zur Ausprägung einer autosomal dominant erblichen Optikusatrophie sein. Die Expression des OPA1 Gens resultiert in 8 verschiedenen Spleissvarianten in humanen Zellen, die durch alternatives Spleissing der Exons 4, 4b und 5b entstehen (Delettre et al., 2001).

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Charakterisierung der OPA1 GTPase aus der Maus. Vier mRNA Spleissvarianten (1, 5, 7 und 8) wurden in Mausgewebe nachgewiesen, die durch alternatives Spleissing der Exons 4b und 5b entstehen. Im Gegensatz zu der oben genannten Veröffentlichung, wurde alternatives Spleissing von Exon 4 nicht bestätigt. Obwohl der generelle Level an OPA1 Gentranskription in vielen Geweben konstant zu sein scheint, unterscheidet sich das individuelle Expressionsniveau der 4 verschiedenen Spleissvarianten im Maushirn von den Niveaus in anderen Geweben. Dieser Befund deutet auf die Existenz eines post-transkriptionellen Regulationsmechanismus hin. Eine besonders starke Expression der Spleissform 1 im Maushirn wurde festgestellt. Um die Expression von OPA1 Proteinisoformen studieren zu können, wurden monoklonale Antikörper hergestellt, die 6 verschiedene Proteinisoformen im Western blot identifizierten. Massenspektroskopische Analysen und N-terminale Mikrosequenzierung zeigten, dass es sich bei den beiden grössten OPA1 Formen um die OPA1 Isoformen 1 und 7 handelt, die durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) während des mitochondrialen Proteinimports gespalten werden. Post-MPP Prozessierungsvorgänge, die durch bisher unbekannte Proteasen in den Regionen ausgeführt werden, die von den Exons 5, 5b und 6 kodiert werden, lassen drei verschiedene kurze Formen von OPA1 entstehen. Diese kurzen Formen können leicht von mitochondrialen Membranen extrahiert werden, da sie ihre Transmembrandomäne nach der Post-MPP-Prozessierung verloren haben. Nur die langen OPA1 Polypeptide sind stabil in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Obwohl die Expressionsniveaus der OPA1 Proteinisoformen gewebespezifisch variieren, enthalten alle

Gewebe das gleiche Set an Isoformen. Isoform1 war auch auf Proteinebene im Nervengewebe der Maus am stärksten exprimiert. Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass die grösste der drei kurzen Formen einen Dimer von 184-kDa Grösse bildet, während alle anderen OPA1 Isoformen Teil eines 285-kDa Komplexes waren. Zwei Coiled-coil-Domänen des OPA1 Proteins zeigten eine hohe Affinität für Homo-Assoziation, gingen aber keine Hetero-Interaktionen ein. Sie tragen sehr wahrscheinlich zu der Komplexbildung der OPA1 Moleküle bei. In verschiedenen Assays, wie Yeast Two-Hybrid, Ko-immunpräzipitation und Affinitätschromatografie, wurden keine potentiellen Interaktionspartner für OPA1 gefunden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass OPA1-Komplexe selbständig eine Effektorfunktion während der Mitochondrienfusion ausüben können.