

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie,
Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Vorstand: Prof. Dr.rer.nat. Dr.med. Walter Neupert

Biogenese des Dynamin-ähnlichen Proteins OPA1 in Mitochondrien

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Nikolaus Wagener

aus

München

Jahr

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr.rer.nat. Dr.med. Walter Neupert
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Martin Kerschensteiner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr.med. Angela Abicht
Prof. Dr. med. Jochen Herms

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.nat. Andreas Reichert

Dekan: Prof. Dr.med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2008

1	Einleitung.....	1
1.1	Mitochondrien.....	1
1.1.1	Aufbau und Funktionen.....	1
1.1.2	Evolution.....	2
1.1.3	Genetik.....	2
1.1.4	Import- und Prozessierungswege.....	4
1.1.4.1	Proteasen.....	6
1.1.5	Mitochondrien als dynamisches tubuläres Netzwerk.....	7
1.1.5.1	Fusion.....	9
1.1.5.1.1	Biogenese von Mgm1.....	11
1.1.5.1.2	Rolle der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1 für die Fusion von Mitochondrien.....	12
1.1.5.2	Teilung.....	12
1.1.6	Hefe als Modellorganismus.....	14
1.2	Mitochondriale Krankheiten.....	15
1.2.1	Einteilung und Vererbung.....	15
1.2.1.1	Mitochondriopathien durch mtDNA-Mutationen.....	15
1.2.1.2	Mitochondriopathien durch chromosomalen Mutationen.....	16
1.2.2	Pathogenese und klinisches Bild der Mitochondriopathien.....	17
1.2.3	OPA1.....	19
1.2.3.1	Pathogenese und klinisches Bild der autosomal dominanten Optikusatrophie.....	19
1.2.3.2	Genetik der autosomal dominanten Optikusatrophie.....	20
1.2.3.3	Das Protein OPA1.....	22
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.1.1	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	27
2.1.2	Ethanol-fällung.....	27
2.1.3	Herstellung von cDNA aus RNA.....	27
2.1.4	DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.1.5	Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen....	28
2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.1.7	Restriktionsverdau.....	29
2.1.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase.....	30
2.1.9	Ligation von DNA.....	30
2.1.10	Herstellung von DNA-Fragmenten ohne Überhang.....	30
2.1.11	Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	31

2.1.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.1.13	Präparation transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	31
2.1.14	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	32
2.1.15	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA.....	32
2.1.15.1	Herstellung kompetenter Hefezellen mit Lithiumacetat	32
2.1.15.2	Transformation kompetenter Hefezellen	32
2.1.16	DNA-Sequenzierung	33
2.1.17	Verwendete Vektoren.....	33
2.1.17.1	pYES2 (Invitrogen).....	33
2.1.17.2	pRS313, pRS314 and pRS316 (Sikorski and Hieter, 1989).....	33
2.1.17.3	pES425#1 (Dr. Doron Rapaport).....	34
2.1.18	Klonierungsstrategien	34
2.1.18.1	pES425-PARL.....	34
2.1.18.2	pYES2-OPA1 Serie.....	35
2.1.18.3	pRS314 ^{ADH1} -Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc.....	37
2.1.19	Karten der hergestellten Konstrukte	37
2.1.19.1	pES425-PARL.....	37
2.1.19.2	pYES2-OPA1 Serie.....	38
2.1.19.3	pRS314 ^{ADH1} -Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc.....	39
2.1.20	Weitere verwendete Konstrukte	39
2.1.20.1	pRS316 ^{ADH1} -Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc.....	39
2.1.20.2	pYES2-Pcp1	39
2.1.20.3	pVT100U-mtGFP	39
2.2	Methoden der Hefegenetik	40
2.2.1	Verwendete und hergestellte Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	40
2.2.2	Methoden der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.2.3	Sporulation diploider Hefestämme	41
2.2.4	Tetradendissektion	42
2.2.5	Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen.....	42
2.2.6	Entfernen von Plasmid-DNA aus Hefestämmen mit 5-FOA	42
2.3	Zellbiologische Methoden.....	43
2.3.1	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.3.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung mitochondrialer Morphologie	43
2.3.2	Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> durch alkalische Lyse.....	43
2.3.3	Methoden der Kultivierung von Säugetierzellen.....	43
2.3.4	Isolation von Mitochondrien aus HeLa-Zellen	44
2.4	Proteinbiochemische Methoden	44

2.4.1	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	44
2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.4.3	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	45
2.5	Immunologische Methoden	45
2.5.1	Erzeugung polyklonaler Antikörper	45
2.5.2	Kopplung synthetischer Peptide an SulfoLink® Coupling Gel (Pierce) 46	
2.5.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	46
2.5.4	Immundekoration von Western-Blots	47
2.6	Puffer und Medien.....	47
2.7	Chemikalien und Geräte.....	49
2.7.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	49
2.7.2	Geräte	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Komplementation der Rhomboidprotease Pcp1 durch PARL.....	52
3.1.1	PARL-Transkriptionsvariante 1 hat größere Ähnlichkeit mit Pcp1 als PARL-Transkriptionsvariante 2.....	52
3.1.2	PARL enthält ein mitochondriales Sortierungssignal.....	54
3.1.3	Gewinnung von $\Delta pcp1$ Stämmen mit funktionellem PARL.....	55
3.1.4	Die Expression von PARL kann den Wachstumsphänotyp der <i>PCP1</i> - Deletion komplementieren.....	57
3.1.5	Mgm1 wird durch PARL proteolytisch prozessiert.....	59
3.1.6	Ccp1 wird durch PARL proteolytisch prozessiert	59
3.1.7	Die Expression von PARL komplementiert den mitochondrialen Phänotyp der <i>PCP1</i> -Deletion.....	60
3.2	Prozessierung von OPA1	62
3.2.1	Proteolytische Prozessierung verschiedener OPA1- Transkriptionsvarianten in Hefe	63
3.2.2	Pcp1 und PARL haben keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 in der Hefe	64
3.2.3	PARL hat in Säugetierzellen keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1.....	65
3.2.4	Die Prozessierung von OPA1 ist in der Hefe abhängig von der mitochondrialen <i>m</i> -AAA-Protease	66
3.2.5	Die menschliche mitochondriale <i>m</i> -AAA-Protease kann OPA1 in der Hefe prozessieren	67
3.2.6	Überexpression von PARL hat keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 in $\Delta yta10\Delta yta12$	69
4	Diskussion.....	70
4.1	Die heterologe Expression von OPA1 in Hefe.....	70
4.2	OPA1 wird in mehreren Schritten N-terminal prozessiert.....	71

4.3	PARL ist eine mitochondriale Rhomboidprotease mit konservierter Substratspezifität.....	72
4.4	Die Funktion der mitochondrialen Rhomboidprotease ist nicht vollständig von Hefe bis zu Säugetieren konserviert.....	73
4.5	Die <i>m</i> -AAA-Protease prozessiert OPA1	75
4.6	Homooligomere <i>m</i> -AAA-Protease ermöglicht die Prozessierung von OPA1	76
4.7	Die regulierte Prozessierung von OPA1 bestimmt wesentlich dessen Funktion	79
4.8	Ausblick.....	80
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literaturverzeichnis	82
7	Abkürzungen	98
8	Danksagung	99
	Lebenslauf.....	100

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

1.1.1 Aufbau und Funktionen

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen, die durch zwei hoch spezialisierte Membranen vom Zytosol abgegrenzt werden: die Außenmembran und die Innenmembran. Diese beiden Membranen definieren die zwei wässrigen Subkompartimente der Mitochondrien. Zwischen der Außenmembran und der Innenmembran liegt mit einer Breite von wenigen Nanometern der relativ enge Intermembranraum. Der von der Innenmembran umschlossene Raum wird als Matrix bezeichnet. Die Innenmembran kann Einstülpungen, sogenannte Cristae, zur Matrixseite bilden, die zu einer Oberflächenvergrößerung führen (Gilkerson et al., 2003; Mannella et al., 2001). Die Morphologie der Cristae hängt stark vom Organismus, dem Gewebetyp und den Wachstumsbedingungen ab und kann tubulär, blasenartig oder lamellar sein (Abbildung 1-1) (Frey and Mannella, 2000; Mannella et al., 2001; Perkins and Frey, 2000; Perkins et al., 1998; Prince, 2002).



Abbildung 1-1. Die Morphologie der Cristae hängt vom Gewebetyp und Organismus ab. Links, blasenartige Cristae in primären Spermatozyten; Mitte, lamellare Cristae in Leydigzellen des Menschen; rechts, tubuläre Cristae in Leydigzellen der Marmosetten (Unterfamilie der Krallenaffen) (Prince, 2002).

In Mitochondrien finden zahlreiche bedeutende Stoffwechselprozesse statt. Dazu gehört die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Die Matrix enthält viele hunderte Proteine und Enzyme, die unter anderem an der Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren zu Acetyl-CoA beteiligt sind. Die im Zitronensäurezyklus entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ werden schließlich über die Elektronentransportkette oxidiert, wobei ein Protonengradient zwischen Matrix und Innenmembran erzeugt wird. Die F₀F₁-ATPase nützt schließlich diesen elektrochemischen Gradienten zur Synthese von ATP (Alberts et al., 2002; Saraste, 1999).

Eine weitere wichtige Funktion der Mitochondrien ist die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern. Als Kofaktoren verschiedener mitochondrialer, zytosolischer und nuklearer Proteine sind sie essenziell für zahlreiche enzymatisch katalysierte Elektronentransferreaktionen (Craig et al., 1999; Lill and Muhlenhoff, 2005). Daneben finden in Mitochondrien auch die Hämbiosynthese, die Synthese von einigen Lipiden, die Stickstoffentgiftung und einige Schritte des Aminosäuremetabolismus statt (Johnson et al., 2005; Lill and Muhlenhoff, 2005; Scheffler, 2001).

In Vielzellern spielen Mitochondrien zudem eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose), der für die Entwicklung und Gewebemöostase des Organismus essenziell ist (Danial and Korsmeyer, 2004). Hierbei werden aus dem Intermembranraum der Mitochondrien mehrere Faktoren freigesetzt. Einer dieser proapoptotischen Faktoren ist das Cytochrom c (Liu et al., 1996; Yang et al., 1997). Dies führt zur Aktivierung von Caspasen, Cysteinproteasen, die für die Signaltransduktion und Ausführung des apoptotischen Programms notwendig sind (Danial and Korsmeyer, 2004).

1.1.2 Evolution

Nach der Endosymbiontentheorie gingen Mitochondrien aus einer Symbiose von eukaryotische Vorläuferzellen mit einem prokaryotischen α -Proteobakterium hervor (Andersson et al., 1998; Gray et al., 1999; Kurland and Andersson, 2000). Das α -Proteobakterium war ein aerober Organismus, der über eine Atmungskette verfügte. Durch die Symbiose konnte die eukaryotische Vorläuferzelle den zunehmenden Sauerstoffgehalt der Atmosphäre nutzen und dessen toxischen Effekten entgehen. Die Endosymbiontentheorie wird durch zahlreiche phylogenetische Studien unterstützt (Kurland and Andersson, 2000).

1.1.3 Genetik

Ein Charakteristikum der Mitochondrien ist das Vorhandensein eines eigenen mitochondrialen Genoms (mitochondriale DNA; mtDNA), eine Tatsache, die durch die Endosymbiontentheorie erklärt wird (Andersson et al., 1998; Gray et al., 1999; Kurland and Andersson, 2000). Mitochondriale Genome sind oft ringförmig und variieren je nach Organismus sehr in ihrer Größe. So findet man in Pflanzen Genome von bis zu 490 kbp (*Oryza sativa*), während Plasmodien mit nur 6 kbp auskommen (Alberts et al., 2002; Burger et al., 2003). Das mitochondriale Genom ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert und in Protein-DNA-Komplexen verpackt, die in Analogie zu Bakterien als mitochondriale Nukleoide bezeichnet werden (Burger et al., 2003; Chen and Butow, 2005).

Die erste vollständige Sequenzierung des menschlichen mitochondrialen Genomes erfolgte bereits 1981 (Anderson et al., 1981). Es ist ringförmig, besteht aus 16.569 Nukleotiden und weist eine sehr hohe Gendichte auf beiden Strängen auf.

Nahezu jedes Nukleotid der menschlichen mtDNA ist an der Kodierung der 13 Proteine, 22 tRNAs und zwei ribosomaler RNAs beteiligt. Jedes der 13 kodierten Proteine stellt eine Untereinheit eines Komplexes der oxidativen Phosphorylierung dar (Chen and Butow, 2005). In menschlichen Zelllinien finden sich 500 bis 800 Nukleioide pro Zelle, die jeweils zwei bis zehn mitochondriale Genome enthalten (Chen and Butow, 2005).

Die Bäckerhefe, *S. cerevisiae*, hat ein wesentlich größeres mitochondriales Genom von etwa 85.000 Nukleotiden. Trotz dieser Größe kodiert es nur für 8 Proteine, 24 tRNAs und zwei ribosomale RNAs. Im Gegensatz zur mtDNA des Menschen ist die mtDNA der Bäckerhefe linear und enthält Introns (Foury et al., 1998; Williamson, 2002). Die Anzahl an Nukleoiden pro Zelle ist abhängig von den Wachstumsbedingungen (Borst and Grivell, 1978; Chen and Butow, 2005; Williamson, 2002). Unter anaeroben Bedingungen finden sich im Mittel 7,6 Nukleioide pro Zelle, die jeweils etwa 20 mitochondriale Genome enthalten, unter aeroben Bedingungen besitzt eine Zelle zwischen 40 bis 60 Nukleioide mit je ein bis zwei mtDNAs (Chen and Butow, 2005).

Mitochondrien werden beim Menschen nahezu ausschließlich über die Eizelle der Mutter vererbt (Schapira, 2006). Dies ist der Fall, da bei der Verschmelzung der Eizelle mit dem Spermium nur zu einem sehr geringen Grad väterliche Mitochondrien in das Zytosol eindringen können. Weiterhin wird diskutiert, dass diese durch Suppression oder durch Verdünnung eliminiert werden (Schapira, 2006). Tatsächlich wurden Hinweise auf einen gezielten Abbau väterlicher Mitochondrien in der Eizelle gefunden (Sutovsky et al., 1999; Sutovsky et al., 2004). Eine Fehlfunktion der Elimination wurde im Zusammenhang mit einem vermehrten Abgang von Embryonen beschrieben (St John et al., 2000).

Es wird geschätzt, dass am Aufbau und der Funktion der Mitochondrien des Menschen etwa 1000 verschiedene Proteine beteiligt sind (Foury and Kucej, 2002; Reichert and Neupert, 2004). Davon werden die meisten in der DNA des Nukleus kodiert. Zumindest ein Teil dieser Gene war ursprünglich im Genom des Mitochondriums kodiert und wurde während der Evolution in den Nukleus transferiert (Kurland and Andersson, 2000; Reichert and Neupert, 2004). Es werden daher nach Transkription und Translation durch zytosolische Ribosomen verschiedenste Proteine in die Mitochondrien importiert. Dieser Weg ist für gewöhnlich unidirektional. Lediglich in der Apoptose kommt es zur Freisetzung mitochondrialer Proteine in das Zytosol (Danial and Korsmeyer, 2004). In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, die Wege der mitochondrialen Biogenese genau zu charakterisieren.

1.1.4 Import- und Prozessierungswege

Aufgrund des Aufbaus der Mitochondrien wird ein komplexes System zum Import der im Zytoplasma gebildeten Proteine benötigt. Dadurch wird eine zuverlässige Sortierung in die einzelnen Subkompartimente ermöglicht. Das am besten studierte mitochondriale Importsystem ist das der Hefe, das eine weitgehende Homologie zu den Systemen höherer Eukaryoten aufweist. Die Sortierung von Proteinen erfolgt unter anderem mit Hilfe von Sortierungssignalen. Hierbei können zwei Arten von Sortierungssignalen unterschieden werden. Erstens solche, die am N-Terminus des Vorstufenproteins lokalisiert sind, überdurchschnittlich viele positiv geladene Aminosäurereste aufweisen und meist abgespalten werden. Zweitens solche, die innerhalb eines Proteins lokalisiert sind und in der Regel nicht prozessiert werden. Mit Hilfe dieser Sortierungssignale binden die Proteine an Rezeptoren der mitochondrialen Importsysteme.

Die Außenmembran ist für Moleküle bis zu einer Größe von 2-6 kDa frei passierbar (Benz, 1994). Die freie Passage solcher kleiner Moleküle durch Porin bedingt die nahezu identischen physikalischen und chemischen Bedingungen im Intermembranraum und Zytosol (Herrmann and Hell, 2005).

Proteine sind aufgrund ihrer Größe auf ein anderes Transportsystem der Außenmembran angewiesen. Der TOM-Komplex (Translocase of the outer Membrane) ermöglicht sowohl die Passage entfalteter Proteine, als auch die Insertion von Proteinen in die Außenmembran. Er setzt sich aus zahlreichen Komponenten zusammen: Tom20 und Tom70 sind die zwei primären Rezeptorproteine. Beide sind mit Tom40 assoziiert, der mit dem Rezeptorprotein Tom22 und den kleineren Komponenten Tom5, Tom6 und Tom7 den TOM-Core-Komplex bilden. Tom20 erkennt hierbei vor allem Proteine mit einem N-terminalen Sortierungssignal, Tom70 dient vorwiegend als Rezeptor für Proteine mit internen Sortierungssignalen. Proteine mit mitochondrialem Sortierungssignal werden von Tom20 und Tom70 an Tom22 übergeben, das den Import durch die von Tom40 gebildete Pore (*General Import Pore*, GIP) mit Hilfe der kleinen Tom-Proteine vermittelt (Endo et al., 2003; Herrmann and Neupert, 2000; Hoogenraad et al., 2002; Pfanner et al., 2004; Rehling et al., 2004; van der Laan et al., 2006; Wiedemann et al., 2004). Die Insertion von β -barrel-Proteinen in die Außenmembran erfordert neben dem TOM-Komplex zusätzlich den TOB-Komplex (topogenesis of mitochondrial outer-membrane beta-barrel proteins), der auch SAM-Komplex genannt wird (sorting and assembly of mitochondria) (Paschen et al., 2005; Pfanner et al., 2004).

Der Verbleib löslicher Proteine im Intermembranraum wird durch verschiedene Mechanismen ermöglicht. So können Proteine, wie zum Beispiel die Hämlyase, nach Erreichen des Intermembranraums an bestimmte mit der Innenmembran oder Außenmembran assoziierte Komponenten binden (Herrmann and Hell, 2005). Der im

Intermembranraum vorliegende Rezeptor Mia40 und die Sulphydryloxidase Erv1 begünstigen durch Ausbildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken die stabile Faltung bestimmter Substrate, die konservierte Cysteinmotive besitzen (Chacinska et al., 2004; Herrmann and Hell, 2005; Mesecke et al., 2005; Terziyska et al., 2005). Hierzu zählen zum Beispiel Cox17, Cox19 und die kleinen Tim-Proteine (Tim 8, 9, 10, 12, 13). Gefaltete Proteine können den Intermembranraum nicht mehr durch den TOM-Komplex verlassen (Herrmann and Hell, 2005). Die Komplexierung von Kofaktoren, wie zum Beispiel Häm, kann eine Faltung und den Verbleib im Intermembranraum begünstigen. Eine weitere Möglichkeit, die Faltung im Intermembranraum zu fördern, ist eine vorläufige Verankerung des Proteins in der Innenmembran und eine an die Faltung anschließende Abspaltung.

Die Innenmembran verfügt ebenfalls über spezialisierte Transportsysteme für Proteine. Die Translokasen der Innenmembran 22 und 23 (Translocase of the innner Membrane; TIM22- und TIM23-Komplex) sind für Proteine zuständig, die von der Intermembranraumseite in die Innenmembran integriert (TIM22 und TIM23) oder in die Matrix importiert werden (TIM23) (Endo et al., 2003; Herrmann and Neupert, 2000; Rehling et al., 2004). Proteine können auch von der Matrixseite in die Innenmembran integriert werden. Dieses System wird „konservativer Sortierungsweg“ genannt und ist von dem Protein Oxa1 abhängig (Herrmann and Neupert, 2000).

Der TIM22-Komplex inseriert Proteine in die Innenmembran (Endo et al., 2003; Rehling et al., 2004). Als treibende Kraft wirkt hierbei das Membranpotential (Jensen and Dunn, 2002; Koehler, 2004; Rehling et al., 2004). Die Substratproteine verfügen über ein internes Sortierungssignal und müssen aufgrund ihrer Hydrophobizität im Intermembranraum durch verschiedene Chaperone vorübergehend stabilisiert werden (van der Laan et al., 2006; Webb et al., 2006; Wiedemann et al., 2006). Zu diesen Chaperonen zählen der Tim9-Tim10-Komplex und der Tim8-Tim13-Komplex (Adam et al., 1999; Bauer et al., 2000; Koehler et al., 1998; Paschen et al., 2000). Der TIM22-Komplex setzt sich zusammen aus Tim22, das den Kanal bildet, sowie den daran bindenden Proteinen Tim18, Tim54 und den kleinen Tim Proteinen (van der Laan et al., 2006).

Der TIM23-Komplex kann Proteine mit N-terminalen Sortierungssignalen vollständig in die Matrix transportieren oder in die Innenmembran inserieren (Berthold et al., 1995; Dekker et al., 1997; Horst et al., 1995). Die Hauptkomponenten sind die Proteine Tim23 und Tim17. Daneben wurden kürzlich die Proteine Tim21 und Tim50 identifiziert, die ebenfalls Teil des Komplexes sind und im Intermembranraum als Rezeptoren für Proteinen mit N-terminalem Sortierungssignal vorgeschlagen wurden (Chacinska et al., 2005; Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003a; Mokranjac et al., 2005; Oka and Mihara, 2005; Yamamoto et al., 2002). Erst kürzlich wurde auch eine direkte Interaktion von Tim21 mit Tom22 gezeigt (Chacinska et al., 2005;

Mokranjac et al., 2005). Das N-terminale Sortierungssignal kann schließlich aufgrund seiner positiv geladenen Aminosäurereste den TIM23-Komplex unter Ausnutzung des Membranpotential ($\Delta\psi$) passieren. Folgt dem positiv geladenen N-Terminus ein hydrophober Bereich, so kann nach dem Stop-Transfer-Modell dieser Bereich seitlich in die Innenmembran inserieren (Glick et al., 1992). Folgt ein solcher hydrophober Bereich nicht, so wird das Protein mit Hilfe des Importmotors unter Hydrolyse von ATP vollständig in die Matrix importiert (Neupert and Brunner, 2002). Der Importmotor besteht aus dem mitochondrialen Chaperon mtHsp70, sowie den Proteinen Tim16 (Pam16), Pam17, Tim14 (Pam18), Tim44 und Mge1 (D'Silva et al., 2003; D'Silva et al., 2005; Frazier et al., 2004; Kozany et al., 2004; Mokranjac et al., 2003b; Truscott et al., 2003; van der Laan et al., 2005; van der Laan et al., 2006).

1.1.4.1 Proteasen

Erreicht eine N-terminale Sortierungssequenz nach Passage des TIM23-Komplexes die Matrix, so wird sie von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten (Endo et al., 2003; Jensen and Dunn, 2002; Neupert and Brunner, 2002; Rehling et al., 2004; Yang et al., 1988).

Neben MPP sind noch zahlreiche weitere mitochondriale Proteasen beschrieben. Diese sind häufig konserviert und haben einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation vieler mitochondrialer Aktivitäten (Escobar-Henriques and Langer, 2006).

Zu den konservierten Proteasen mit Einfluss auf die Proteinreifung zählen auch zwei mitochondriale AAA-Proteasen: die *m*-AAA-Protease und die *i*-AAA-Protease. Sie gehören zur Familie der „ATPasen assoziiert mit verschiedenen Aktivitäten“ (AAA), die Untereinheiten enthalten jeweils eine ATPase und Metallopeptidase-Domäne. Es wird angenommen, dass sechs Untereinheiten einen hexameren Komplex bilden. Beide mitochondriale AAA-Proteasen sind in der Innenmembran verankert und präsentieren ihre proteolytischen Domänen jeweils auf eine Seite der Innenmembran. Entsprechend werden sie als AAA-Protease der Matrix (*m*-AAA-Protease) und als AAA-Protease des Intermembranraums (*i*-AAA-Protease) bezeichnet (Arlt et al., 1996; Arnold and Langer, 2002; Escobar-Henriques and Langer, 2006; Leonhard et al., 1996; Rugarli and Langer, 2006).

Yta10 und Yta12 sind die Untereinheiten der *m*-AAA-Protease. Trotz der hohen Homologie zwischen Yta10 und Yta12 sind beiden Untereinheiten für die Funktionalität der *m*-AAA-Protease von *S. cerevisiae* unbedingt erforderlich. Im Gegensatz dazu besteht der homooligomere Komplex der *i*-AAA-Protease nur aus der Untereinheit Yme1 (Arlt et al., 1996; Leonhard et al., 1996). Obwohl anfänglich die Funktion der *m*-AAA-Protease hauptsächlich im Abbau falsch gefalteter Proteine gesehen wurde (Arlt et al., 1998), finden sich zunehmend Proteine, deren Reifung von einer Prozessierung durch die *m*-AAA-Protease abhängt. Hierzu zählen die

Cytochrom *c*-Peroxidase (Ccp1) und MrpL32, eine Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms (Esser et al., 2002; Nolden et al., 2005). Vor allem die Identifikation des letzteren Substrats erklärt den Verlust der respiratorischen Kompetenz nach Deletion von *YTA10* und *YTA12* in *S. cerevisiae* (Rugarli and Langer, 2006). Die beiden zur Familie der Prohibitine gehörenden Hefepoteine Phb1 und Phb2 haben einen regulierenden Effekt auf die Aktivität der *m*-AAA-Protease (Steglich et al., 1999). Die Orthologe von Yta10 und Yta12 sind im Menschen AFG3L2 und Paraplegin, in der Maus Afg3l2 und Paraplegin (Maus) (Atorino et al., 2003; Casari et al., 1998; Kremmidiotis et al., 2001). In der Maus wird zudem eine weitere Untereinheit mit hoher Homologie zu Afg3l2 und Paraplegin (Maus) exprimiert, Afg3l1 (Kremmidiotis et al., 2001). Im Menschen ist die entsprechende Sequenz AFG3L1 lediglich als Pseudogen vertreten und wird nicht translatiert (Kremmidiotis et al., 2001). Die Expression von AFG3L2 und Paraplegin in *S. cerevisiae* kann die Deletion von *YTA10* und *YTA12* funktionell komplementieren (Atorino et al., 2003). Mutationen in Paraplegin sind im Menschen kausativ mit dem Krankheitsbild der hereditären spastischen Paraplegie (HSP) assoziiert (Casari et al., 1998). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von Afg3l2 oder Afg3l1 alleine die Bildung von funktionell aktiven homooligomeren *m*-AAA-Komplexen ermöglicht (Koppen et al., 2006).

1.1.5 Mitochondrien als dynamisches tubuläres Netzwerk

Mitochondrien haben die Fähigkeit zur Teilung und zur Fusion (Abbildung 1-2) (Bereiter-Hahn and Voth, 1994; Bleazard et al., 1999; Nunnari et al., 1997; Okamoto and Shaw, 2005; Sesaki and Jensen, 1999). Das Gleichgewicht dieser Prozesse ist entscheidend für das morphologische Erscheinungsbild der Mitochondrien in der Zelle. Überwiegt die Fusion, so resultiert eine überwiegend tubuläre und netzwerkartige Struktur der Mitochondrien. Umgekehrt führt eine überwiegende Teilung zu einer Fragmentierung von Mitochondrien.

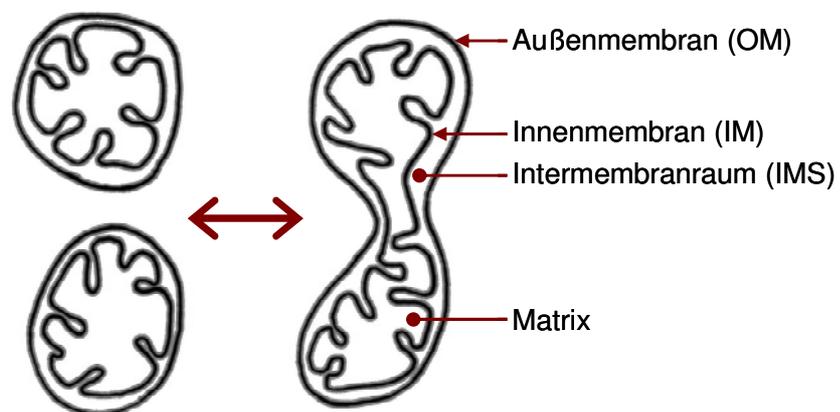


Abbildung 1-2. Schematische Übersicht über den Fusions- beziehungsweise Teilungsprozess.

Mitochondrien sind daher nicht als starre Gebilde zu betrachten werden, denn in der Regel finden innerhalb weniger Minuten mehrere Fusions- und Teilungsprozesse statt (Abbildung 1-3).

Die molekularen Mechanismen der Teilung und Fusion sind noch weitgehend unverstanden. An der Teilung sind zwei Membranen beteiligt (Außenmembran und Innenmembran), an der Fusion vier (zwei Außenmembranen und zwei Innenmembranen). Des Weiteren sind zahlreiche Proteine an der Regulation und Ausführung der Teilungs- und Fusionsprozesse beteiligt. Proteine, die für die Morphologie der Mitochondrien notwendig sind, lassen sich grob in drei Gruppen einteilen, von denen die erste für die Teilung, die zweite für die Fusion und die dritte für den intrazellulären Transport beziehungsweise für die Tubulation der Mitochondrien zuständig ist (Dimmer and Scorrano, 2006). Die meisten beteiligten Proteine wurden Anhand des Modellorganismus *S. cerevisiae* identifiziert (Catlett and Weisman, 2000; Dimmer et al., 2002; Nunnari et al., 2002), allerdings sind die genauen Funktionsweisen dieser Proteine noch weitgehend ungeklärt. Die aus *S. cerevisiae* bekannten Mechanismen der Fusion und Teilung sind zumindest teilweise bis zum Menschen konserviert, da sich für die meisten in Hefe identifizierten Proteine entsprechende Orthologe in Säugetieren finden (Dimmer and Scorrano, 2006; Okamoto and Shaw, 2005). Allerdings gilt dies nicht für den intrazellulären Transport der Mitochondrien. Dieser ist in *S. cerevisiae* vom Aktin-Zytoskelett und in Säugetieren von den Mikrotubuli abhängig (Dimmer and Scorrano, 2006; Morris and Hollenbeck, 1995).

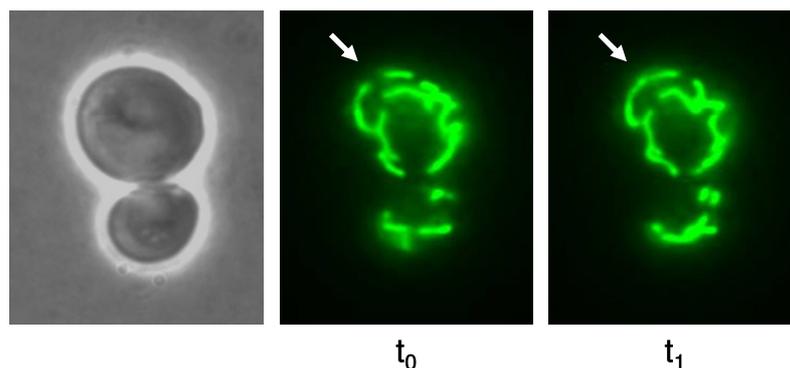


Abbildung 1-3. Fusionsprozess tubulär strukturierter Mitochondrien in *S. cerevisiae*. Mitochondrien wurden durch Expression von GFP visualisiert, das mit Hilfe eines mitochondrialen Sortierungssignals in die Matrix dirigiert wurde. Links, Phasenkontrastbild; mitte und rechts, fluoreszenzmikroskopische Bilder. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden im Abstand weniger Sekunden aufgenommen (t_0 , t_1). Die weißen Pfeile zeigen auf einen Fusionsprozess.

1.1.5.1 Fusion

In *S. cerevisiae* wurden drei Proteine identifiziert, die Teil der Fusionsmaschinerie sind: Fzo1 und Ugo1 als Proteine der Außenmembran, sowie Mgm1, das mit der Innenmembran assoziiert beziehungsweise in diese integriert ist (Tabelle 1-1) (Dimmer and Scorrano, 2006; Okamoto and Shaw, 2005). Sowohl Fzo1 als auch Mgm1 sind zwischen Hefe und Menschen konserviert (Tabelle 1-1). Die menschlichen Orthologe von Fzo1 sind die Mitofusine MFN1 und MFN2 (Dimmer and Scorrano, 2006; Okamoto and Shaw, 2005). Das menschliche Ortholog von Mgm1 ist OPA1 (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Ein dem Ugo1 orthologes Protein konnte in Säugetieren bisher nicht identifiziert werden (Dimmer and Scorrano, 2006; Okamoto and Shaw, 2005).

Tabelle 1-1. Die bekannten Proteine der Fusionsmaschinerie in *S. cerevisiae* und Mensch.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Lokalisation
Fzo1	MFN1 MFN2	Außenmembran
Ugo1		Außenmembran
Mgm1	OPA1	Innenmembran und Intermembranraum

In mehreren Studien konnte eine Interaktion der Proteine Fzo1, Ugo1 und Mgm1 nachgewiesen werden (Sesaki and Jensen, 2004; Sesaki et al., 2003b; Wong et al., 2003). Aufgrund dieser Daten wird derzeit von einem gemeinsamen mitochondrialen Fusionskomplex bestehend aus Fzo1, Ugo1 und Mgm1 ausgegangen. Ugo1 dient hierbei vermutlich als Bindeglied zwischen Fzo1 und Mgm1 (Abbildung 1-4) (Okamoto and Shaw, 2005).

Mit Hilfe eines *in vitro*-Fusionsassays wurden die biochemischen Voraussetzungen der Mitochondrienfusion genauer untersucht (Meeusen et al., 2004). Die Fusion der Außenmembran erfordert die Hydrolyse von GTP und einen Protonengradienten der Innenmembran (ΔpH) (Meeusen et al., 2004). Die Fusion der Innenmembran erfordert ebenfalls die Hydrolyse von GTP, sowie ein Membranpotential ($\Delta\psi$) (Meeusen et al., 2004).

Zu Beginn des Fusionsprozesses müssen die beiden Außenmembranen aneinander andocken. Eine Interaktion des in der mitochondrialen Außenmembran lokalisierten Fzo1 *in trans* ist hierfür erforderlich (Dimmer and Scorrano, 2006; Koshiba et al., 2004; Meeusen et al., 2004).

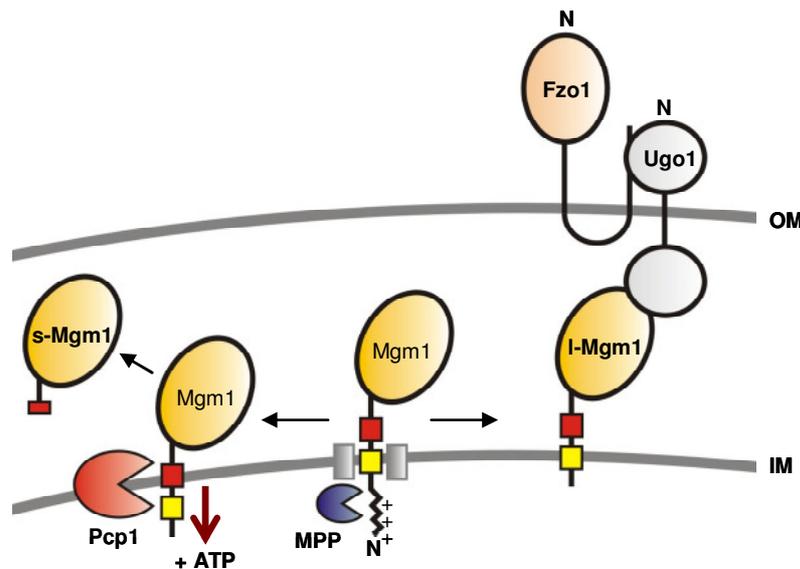


Abbildung 1-4. Lokalisation und Topologie der in *S. cerevisiae* an der mitochondrialen Fusion beteiligten Proteine Fzo1, Ugo1 und Mgm1. Das Mgm1-Vorläuferprotein wird aufgrund der positiven Ladungen des N-terminalen Sortierungssignals über den TIM23-Komplex (graue Rechtecke) teilweise in die Matrix importiert. I-Mgm1 entsteht nach Entfernung des N-terminalen Sortierungssignals durch MPP und lateraler Insertion des ersten hydrophoben Bereichs (gelbes Rechteck) in die Innenmembran. s-Mgm1 wird in Abhängigkeit von ATP durch proteolytische Spaltung im zweiten hydrophoben Bereich (rotes Rechteck) durch Pcp1 gebildet. Mgm1 kann über Ugo1 mit Fzo1 interagieren. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; N, N-Terminus des Proteins.

Das Protein Fzo1 besitzt neben einer GTPase- und vier Coiled-Coil-Domänen auch zwei Transmembransegmente, mit denen es die Membran doppelt durchspannt (Fritz et al., 2001; Hermann et al., 1998; Okamoto and Shaw, 2005; Rapaport et al., 1998). Die GTPase- und Coiled-Coil-Domänen werden hierbei auf der zytosolischen Seite präsentiert und sind für die *in trans*-Interaktion erforderlich (Griffin and Chan, 2006). Mitofusin 1 und 2 (MFN1, MFN2) weisen die gleichen strukturellen Eigenschaften wie Fzo1 auf (Legros et al., 2002; Rojo et al., 2002; Santel and Fuller, 2001). Trotz der Ähnlichkeit von MFN1 und MFN2 sind beide Proteine für die normale Embryonalentwicklung der Maus notwendig, was anhand entsprechender Deletionsmutanten gezeigt wurde (Chen et al., 2003). Zudem gibt es Hinweise auf eine unterschiedlich starke GTPase-Aktivität der Mitofusine (Ishihara et al., 2004; Koshiba et al., 2004). Interessanterweise spielt MFN1, nicht aber MFN2 eine Rolle in der OPA1-abhängigen Fusion von Mitochondrien (Cipolat et al., 2004). Kürzlich wurde mit MARCH-V ein möglicher Interaktionspartner von MFN2 gefunden (Nakamura et al., 2006). Mutationen in MFN2 sind im Menschen mit der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie Typ 2A assoziiert (Chen and Chan, 2006).

Ugo1 ist ebenfalls für die Fusion notwendig (Okamoto and Shaw, 2005; Sesaki and Jensen, 2001). Es hat sowohl am C- als auch am N-Terminus Ähnlichkeit mit mitochondrialen Carrier-Proteinen und verfügt im mittleren Bereich über ein bis sechs

Transmembransegmente (Okamoto and Shaw, 2005; Sesaki and Jensen, 2001; Sesaki and Jensen, 2004). Die zytosolische N-terminalen Domäne interagiert mit Fzo1, der C-terminale Part des Proteins ist im Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert und bindet Mgm1 (Sesaki and Jensen, 2004).

Mgm1 ist das Ortholog des menschlichen OPA1 in *S. cerevisiae*. In *S. pombe* wird es als Msp1 bezeichnet (Delettre et al., 2000; Pelloquin et al., 1998). Lange wurde diesem Protein primär eine Rolle in der Erhaltung der mitochondrialen DNA (mtDNA) zugeschrieben, obwohl eine veränderte mitochondriale Morphologie des Deletionsstamms bereits frühzeitig bekannt war (Guan et al., 1993; Jones and Fangman, 1992; Shepard and Yaffe, 1999; Wong et al., 2000). Kürzlich wurde mittels eines *in vitro*-Fusionsassays Belege gefunden, nach denen Mgm1 im speziellen für die Fusion der Innenmembranen benötigt wird (Meeusen et al., 2006). Hierbei kommt es zu einer Interaktion von Mgm1 mit dem Mgm1 der gegenüberstehenden Innenmembran (Meeusen et al., 2006). Des Weiteren scheint Mgm1 wesentlich für die Aufrechterhaltung der Struktur der Cristae zu sein (Meeusen et al., 2006). Mgm1 hat strukturell Ähnlichkeit mit Dynaminen, einer Proteinfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Endozytose von Vesikeln spielt (Praefcke and McMahon, 2004; Wong et al., 2000). Am N-Terminus von Mgm1 befindet sich ein mitochondriales Sortierungssignal. Danach folgen zwei hydrophobe Bereiche, eine GTPase-Domäne, eine Dynamin-Mitteldomäne, eine Pleckstrin-Homologie-Domäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (Praefcke and McMahon, 2004). Die Aktivität der GTPase-Domäne ist Voraussetzung für die Funktionalität des Proteins (Sesaki et al., 2003b; Shepard and Yaffe, 1999; Wong et al., 2003). Mgm1 liegt in Mitochondrien in zwei unterschiedlichen reifen Proteinisoformen vor (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Diese werden aufgrund ihrer Größenunterschiede als kurze Isoform, s-Mgm1, und als lange Isoform, l-Mgm1, bezeichnet und gehen aus dem gleichen Vorläuferprotein hervor (alternative Topogenese von Mgm1) (Herlan et al., 2003). Beide Proteinisoformen sind für den Erhalt der regulären mitochondrialen Morphologie und der mitochondrialen DNA erforderlich (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003).

1.1.5.1.1 Biogenese von Mgm1

Die Biogenese von l-Mgm1 erfordert die Abspaltung des N-terminalen Sortierungssignals von dem Vorläuferprotein durch MPP (siehe auch 1.1.4) (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Nach einem partiellen Import des N-Terminus inseriert l-Mgm1 mit dem N-terminal gelegenen hydrophoben Bereich in die Innenmembran der Mitochondrien (Abbildung 1-4) (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Alternativ kann aus dem Vorläuferprotein neben l-Mgm1 auch s-Mgm1 hervorgehen. Dieser Prozess wird als „Alternative Topogenese von Mgm1“

bezeichnet und wird durch den Importmotor und ATP reguliert (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003). Als weiterer möglicher Regulator der alternativen Topogenese wird das kürzlich beschriebene Intermembranraumprotein Ups1 diskutiert. Ups1 kann durch das menschliche Ortholog PRELI voll komplementiert werden (Sesaki et al., 2006). Die Biogenese der kurzen Proteinisoform erfordert des Weiteren einen Prozessierungsschritt im zweiten hydrophoben Bereich von Mgm1. Die hierfür verantwortliche Protease ist Pcp1. Nach der Proteolyse liegt s-Mgm1 löslich und mit der Innenmembran assoziiert im Intermembranraum vor (Abbildung 1-4) (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b).

1.1.5.1.2 Rolle der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1 für die Fusion von Mitochondrien

Pcp1 ist eine in der mitochondrialen Innenmembran inserierte Rhomboidprotease. Rhomboidproteasen sind Serinproteasen, die in nahezu allen sequenzierten Genomen von Archaeen, Bakterien und Eukaryoten vorkommen und ihre Substrate vermutlich innerhalb der Membran schneiden (Bornhövd, 2006; Herlan et al., 2003; Koonin et al., 2003; McQuibban et al., 2003; van der Blik and Koehler, 2003; Yaffe, 2003). Neben Mgm1 ist die Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1) das einzige weitere bekannte Substrat von Pcp1. Ccp1 wird in zwei Schritten proteolytisch prozessiert: im ersten von der mitochondrialen AAA-Protease der Matrix (*m*-AAA-Protease) Yta10/Yta12 und im zweiten von Pcp1 (siehe auch 1.1.4) (Esser et al., 2002; Michaelis et al., 2005).

Die Deletion von *PCP1* ($\Delta pcp1$) führt ebenso wie die Deletion von *MGM1* ($\Delta mgm1$) zu irreversiblen Verlust von mtDNA und zu einer fragmentierten mitochondrialen Morphologie (Dimmer et al., 2002; Herlan et al., 2003; Sesaki et al., 2003a). Da eine Deletion von *CCP1* keine vergleichbaren Auswirkungen hat und die Expression von s-Mgm1 in $\Delta pcp1$ den Verlust von Pcp1 partiell komplementiert, ist der Phänotyp Deletion von *PCP1* wahrscheinlich auf die fehlende Synthese von s-Mgm1 zurückzuführen (Herlan et al., 2003).

1.1.5.2 Teilung

An der mitochondrialen Teilung in *S. cerevisiae* sind ebenfalls mehrere Proteine beteiligt. Hierzu zählen Dnm1, Mdv1/Gag3/Net2 und Caf4 im Zytosol, sowie Fis1 in der mitochondrialen Außenmembran, und möglicherweise Mdm33 in der Innenmembran (Tabelle 1-1) (Dimmer and Scorrano, 2006; Okamoto and Shaw, 2005).

Tabelle 1-2. Die bekannten Proteine der Teilungsmaschinerie in *S. cerevisiae* und Mensch.

<i>S. cerevisiae</i>	Menschliches Ortholog	Lokalisation
Dnm1	DRP1/DLP1	Zytoplasma
Mdv1/Gag3/Net2 Caf4		Zytoplasma
Fis1	hFis	Außenmembran

Dnm1 hat wie Mgm1 Sequenzähnlichkeit mit Dynaminen. Das entsprechende Ortholog in höheren Lebewesen heißt DRP1 oder DLP1 (Bleazard et al., 1999; Labrousse et al., 1999; Otsuga et al., 1998; Smirnova et al., 2001). Eine Deletion von *DNM1* führt zu einer ausgeprägten tubulären Morphologie der Mitochondrien, die aufgrund der zahlreichen Verzweigungen an ein Fischernetz erinnert. Dnm1 liegt prinzipiell löslich im Zytosol vor, kann aber auf der Oberfläche von Mitochondrien zu Oligomeren assemblieren (Fukushima et al., 2001; Otsuga et al., 1998). Eine Interaktion mit Mdv1 und Caf4 wurde gezeigt (Cervený and Jensen, 2003; Griffin et al., 2005; Tieu and Nunnari, 2000; Uetz et al., 2000).

Fis1 ist in der Außenmembran der Mitochondrien mit einem Transmembransegment verankert und exponiert den größten Teil zum Zytosol (Mozdy et al., 2000). Im Gegensatz zu Dnm1, das eine diskrete punktuelle Verteilung aufweist, ist Fis1 gleichmäßig auf Mitochondrien verteilt (Mozdy et al., 2000). Das orthologe Protein im Menschen heißt hFis (James et al., 2003; Stojanovski et al., 2004; Yoon et al., 2003). Es kann aber den morphologischen Phänotyp des Hefe-Deletionsstamms $\Delta fis1$ nicht komplementieren (Stojanovski et al., 2004). Fis1 interagiert auf der zytosolischen Seite mit Mdv1 (Karren et al., 2005; Suzuki et al., 2003).

Mdv1/Gag3/Net2, ist ebenfalls notwendig für die Teilung (Cervený and Jensen, 2003; Fekkes et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000). Das Protein wird entsprechend seiner Interaktion mit Fis1 an der Außenmembran auf der zytosolischen Seite lokalisiert (Cervený and Jensen, 2003; Fekkes et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000), akkumuliert dort aber ähnlich wie Dnm1 (Cervený and Jensen, 2003; Tieu and Nunnari, 2000). Das Protein Caf4 hat Ähnlichkeit mit Mdv1 und interagiert ebenfalls mit Fis1 (Griffin et al., 2005). Es wird daher spekuliert, dass Mdv1 und Caf4 eine synergistische Rolle in der Teilung spielen (Okamoto and Shaw, 2005). In höheren Eukaryoten wurden bisher keine Orthologe von Mdv1 oder Caf4 identifiziert (Okamoto and Shaw, 2005).

Mdm33 ist ein integrales Protein der Innenmembran. Der entsprechende Deletionsphänotyp zeigt langgestreckte, hohle sphärische mitochondriale Strukturen und hat Ähnlichkeit mit den Deletionsphänotypen anderer an der Teilung beteiligter Proteine. Daher wurde Mdm33 ebenfalls als Komponente der Teilungsmaschinerie der Innenmembran vorgeschlagen (Messerschmitt et al., 2003). Ein Ortholog von Mdm33 in höheren Eukaryoten wurde bisher ebenfalls nicht beschrieben (Dimmer and Scorrano, 2006).

Aufgrund verschiedener Interaktionsstudien ist davon auszugehen, dass zumindest die Proteine Fis1, Dnm1, Mdv1/Gag3/Net2 und Caf3 einen größeren Teilungskomplex bilden. Für das menschliche Ortholog von Dnm1, Drp1, und dessen Funktion wurden mehrere regulatorische Mechanismen beschrieben. Zum einen soll Drp1 posttranslational mit Sumo1 sumoyliert werden und dadurch die Teilung von Mitochondrien stimulieren (Harder et al., 2004). Zum anderen wurde eine Ubiquitylierung von Drp1 durch MARCH-V beschrieben (Nakamura et al., 2006). Auch wurde für Drp1 eine Interaktion mit Dynein-Dynactin und eine Assoziation mit F-Actin beschrieben (De Vos et al., 2005; Varadi et al., 2004).

1.1.6 Hefe als Modellorganismus

S. cerevisiae hat sich als ein hervorragender Modellorganismus für das Studium grundlegender zellulärer Mechanismen etabliert. Da viele dieser Mechanismen konserviert sind, lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse zum Teil auf den Menschen übertragen. Tatsächlich finden sich für 46% der menschlichen Proteine Homologe im Hefeproteom (Lander et al., 2001). Es wird angenommen, dass 30%-40% der mit Krankheiten assoziierten Gene ebenfalls vergleichbare Sequenzen in der Hefe besitzen (Foury and Kucej, 2002).

Die Hefe eignet sich aus mehreren praktischen Gründen als ideales Studienobjekt. Sie ist ein unbeweglicher Einzeller und besitzt eine kurze Verdopplungszeit. Daher ist sie zum einen einfach unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu kultivieren. Zum anderen hat sie die Fähigkeit zur sexuellen oder asexuellen Vermehrung und kann entsprechend einen diploiden oder einen haploiden Chromosomensatz besitzen. Dies kann bei genetischen Manipulationen, zum Beispiel im Rahmen genetischer Studien, von Vorteil sein. Ein weiterer enormer Vorteil ist die hohe Effizienz der homologen Rekombination von Fremd-DNA (Foury and Kucej, 2002), wodurch sich relativ einfach Gene im Chromosomensatz deletieren oder ersetzen lassen.

Hefen besitzen wie fast alle Eukaryoten Mitochondrien. In der aktuellen Version der MitoP2 Datenbank (August 2007) (Andreoli et al., 2004) finden sich für *S. cerevisiae* 546 Proteine mit experimentell nachgewiesener mitochondrialen Lokalisation. Von diesen haben etwa 250 menschliche Homologe. Viele dieser homologen Proteine sind in der Hefe wesentlich besser charakterisiert als im

Menschen. Zwar sind diese Erkenntnisse nicht immer vollständig auf den Menschen übertragbar, können aber durchaus richtungsweisend sein. So konnte anhand von Erkenntnissen über das aus *S. cerevisiae* stammende Ortholog des menschlichen Proteins Frataxin, das mit der Friedreich Ataxie assoziiert ist, erfolgreich ein therapeutischer Ansatz entwickelt werden (Foury and Kucej, 2002; Lerman-Sagie et al., 2001).

1.2 Mitochondriale Krankheiten

In Mitochondrien laufen zahlreiche essentielle Stoffwechselreaktionen ab. Entsprechend können Störungen mitochondrialer Prozesse Auswirkungen auf die Funktion einzelner Organe oder des gesamten Organismus haben und verursachen mitochondriale Krankheiten. Die ersten mitochondrialen Krankheiten (Mitochondriopathien) wurden bereits um 1960 von Kearns, Sayre, Ernster und Luft beschrieben (Wallace, 2005). Aufgrund der fortgeschrittenen Erkenntnisse über die Funktionsweise und Biogenese der Mitochondrien können Mitochondriopathien heute wesentlich differenzierter betrachtet werden. Auch die Pathogenese einiger epidemiologisch besonders bedeutender Krankheiten wird zunehmend mit mitochondrialen Prozessen Verbindung gebracht. Hierzu zählen zum Beispiel die Parkinson-Krankheit (Chan, 2006; Schapira, 2006) und Alzheimer-Krankheit (Schapira, 2006). Auch im Alterungsprozess spielen Mitochondrien vermutlich eine entscheidende Rolle (Chan, 2006).

1.2.1 Einteilung und Vererbung

Die Biogenese der Mitochondrien basiert auf der Transkription und Translation mitochondrialer und chromosomaler Gene. Entsprechend können sowohl Mutationen der nuklearen als auch der mitochondrialen Gene eine Mitochondriopathie verursachen. Die Lokalisation der ursächlichen Gene hat entscheidenden Einfluss auf die Vererbungsmuster der mitochondrialen Krankheiten. Mitochondriopathien werden daher häufig nach der genetischen Lokalisation eingeteilt.

1.2.1.1 Mitochondriopathien durch mtDNA-Mutationen

Diese Mitochondriopathien werden praktisch rein maternal vererbt (siehe auch 1.1.3). Eine weitere charakteristische Eigenschaft ist die mit dem Alter zunehmende Symptomatik. Dies ist durch eine verstärkte Akkumulation mutierter mtDNA in betroffenen Geweben bedingt (Chan, 2006). Auch im Gewebe primär gesunder Menschen kommt es mit zunehmendem Alter zu somatischen Mutationen. Ursächlich hierfür ist womöglich die Atmungskette und das damit verbundene Auftreten von freien Radikalen, die zu Mutationen in der DNA führen können (Chan, 2006; Schapira, 2006). Daneben wird eine ineffiziente Exonukleaseaktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase („proofreading“) diskutiert (Chan, 2006; Finsterer,

2004). Ist die Atmungskette eines Mitochondriums bereits vorgeschädigt, zum Beispiel im Rahmen einer erbten Mitochondriopathie, so kann dies zu einer verstärkten Bildung freier Radikale führen, die wiederum die Entstehung weiterer Mutationen begünstigen. Dies kann auf Dauer einen *circulus vitiosus* mit einer stetig zunehmenden Zahl somatischen Mutationen zur Folge haben (Chan, 2006).

Die Weitergabe der mtDNA auf Tochterzellen folgt im Allgemeinen stochastischen Regeln. Dies kann gewebeabhängig zu einer unterschiedlichen quantitativen Verteilung der Wildtyp- und mutierten mtDNA führen (mitochondriale Segregation). In einem gesunden Individuum liegt zu Beginn seines Lebens normalerweise nur eine mtDNA in zahlreichen Kopien vor (Homoplasmie) (Finsterer, 2004; Schapira, 2006). Diese Homoplasmie wird durch den sogenannten „Bottleneck“-Effekt während der Oogenese begünstigt (Chan, 2006; Finsterer, 2004; Jansen and de Boer, 1998; Schapira, 2006; Shoubridge, 2000). Hierbei wird jeweils nur ein kleiner Teil (10-100) der bis zu 150.000 mtDNA-Kopien, die in einer primären Oozyte vorliegen, während der Oogenese an die reife Eizelle weitergegeben (Schapira, 2006).

Mitochondriopathien, die auf mtDNA-Mutationen basieren, gehen in der Regel mit einer Heteroplasmie einher. Das bedeutet, dass sowohl mutierte als auch nicht-mutierte mitochondriale Genome in der gleichen Zelle vorkommen. Das Mutationsspektrum ist breit und es umfasst Punktmutationen, Deletionen und Insertionen. Eine bekannte Ausnahme ist zum Beispiel die Leber'sche hereditäre optische Neuropathie, die meist mit einer Homoplasmie einhergeht (Chan, 2006; Schapira and Cock, 1999).

Das klinische Bild und die Penetranz der Mitochondriopathien durch mtDNA-Mutationen wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Besondere Bedeutung kommt dem sogenannten Schwellenwert zu. Hiermit ist der prozentuelle Anteil mutierter mtDNA gemeint, ab dem es zur Manifestation der Krankheit kommt (Finsterer, 2004; Schapira, 2006). Dieser ist abhängig vom Gewebetyp und kann von 60% bis 90% reichen (Hayashi et al., 1991; Nakada et al., 2001; Yoneda et al., 1994). Weiterhin haben auch die kernkodierten Gene, das Alter, Geschlecht und Umweltfaktoren Einfluss (McFarland et al., 2002).

1.2.1.2 Mitochondriopathien durch chromosomalen Mutationen

Diese Gruppe bildet die Mehrheit der Mitochondriopathien. Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass mehr als 95% aller Mitochondriopathien auf chromosomalen Mutationen beruhen (Gillis and Kaye, 2002). Die Vererbung dieser Gruppe folgt aufgrund der chromosomalen Lokalisation der entsprechenden Gene den Mendelschen Regeln (Finsterer, 2004). An der Regulation und Funktion mitochondrialer Prozesse sind etwa 1000 mitochondriale Proteine beteiligt, die chromosomal kodiert sind (Finsterer, 2004). Obwohl 72 von 85 Untereinheiten der

Atmungskette im Kern kodiert und in die Mitochondrien importiert werden (siehe auch 1.1.2), wurden nur wenige auf chromosomalen Mutationen basierende Mitochondriopathien beschrieben, die die Atmungskette betreffen (Schapira, 2006). Dies mag an den gravierenden Folgen solcher Mutation liegen, die noch im Mutterleib zum Abort des Fetus führen (Schapira, 2006). Neben der Atmungskette finden zahlreiche weitere bedeutende Stoffwechselprozesse in den Mitochondrien statt. Betroffen können neben der Atmungskette zum Beispiel der Citratzyklus, die β -Oxidation, der Harnstoffzyklus, die Replikation und Erhaltung der mtDNA und die mitochondriale Fusions- oder Teilungsmaschinerie sein (Finsterer, 2004; Schapira, 2006). Mitochondriopathien kernkodierten Ursprungs und Mitochondriopathien mitochondrial kodierten Ursprungs können zum Teil eine identische Symptomatik aufweisen (Schapira, 2006).

1.2.2 Pathogenese und klinisches Bild der Mitochondriopathien

Die klassischen Mitochondriopathien führen zu einer Störung der Atmungskette und werden durch Mutationen in der mtDNA oder in chromosomalen Genen verursacht (Chan, 2006; DiMauro and Davidzon, 2005; DiMauro and Schon, 2003; Wallace, 2005). Häufig verursachen sie Enzephalomyopathien, also Krankheiten des zentralen Nervensystems und der Skelettmuskulatur. Tatsächlich können aber auch viele andere Organe betroffen sein. Das Spektrum an klinischen Manifestationen ist in der Folge sehr breit (Tabelle 1-3). Die Erkrankungen treten in allen Altersgruppen auf, von der frühen Embryogenese bis in das hohe Alter (Finsterer, 2004).

Nervenzellen reagieren besonders anfällig auf Beeinträchtigungen der Funktion von Mitochondrien (Tabelle 1-3). Seit langem ist bekannt, dass gerade im Bereich der Synapsen besonders viele Mitochondrien zu finden sind (Chan, 2006). Dies wird zum einen mit dem hohen Energiebedarf erklärt, der für die synaptische Transmission notwendig ist. Synaptische Vesikel werden in ATP-abhängigen Prozessen fusioniert und die Neurotransmitter wieder aufgenommen. Das Membranpotential wird durch ebenfalls ATP-abhängige Ionenpumpen reguliert. Zum anderen könnten Mitochondrien eine wichtige Funktion bei der Pufferung von Ca^{2+} -Ionen spielen (Chan, 2006). Durch Experimente, in denen die Motilität der Mitochondrien in Nervenzellen eingeschränkt wurde, konnten diese Hypothesen gestützt werden. Insbesondere die Rolle als Energielieferant der Zelle ist wesentlich (Chan, 2006; Guo et al., 2005; Stowers et al., 2002; Verstreken et al., 2005). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Mitochondrien, insbesondere der mitochondrialen Fusion und Teilung, an der erfolgreichen Ausbildung von Synapsen und der Dornfortsätze von Dendriten (Li et al., 2004).

Tabelle 1-3. Häufige Manifestationen der Mitochondriopathien nach Finsterer, 2004.

Organ	Symptome
Peripheres Nervensystem	Myopathien: Muskelschwächen (Ptosis, Ophthalmoparese, Gliedmaße, Kaumuskulatur), Muskelschwund, Faszikulationen, Myokymie, Hypotonie, Steifigkeit, Myotonie, reduzierte oder fehlende Reflexe, Ermüdung, Übungintoleranz, Krämpfe, Schmerzen, Myoglobinurie, Laktazidose; Polyneuropathie: Muskelschwäche und Muskelschwund, reduzierte oder fehlende Reflexe, Faszikulationen, Krämpfe, neuropathische Schmerzen (Dysaesthesie, Paraesthesie), Restless-leg-Syndrom, gastroösophagealer Reflux, verzögerte Magenentleerung, Sicca-Syndrom, fehlendes oder exzessives Schwitzen
Zentrales Nervensystem	Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung oder Regression, früh und spät beginnende Demenz, (zentrale) Müdigkeit, Epilepsie, Myoklonie, Migräne, Schlaganfall-ähnliche Episoden (stroke-like episodes), Dystonie, Dyskinesie, atypische zerebrale Paralyse, Leukenzephalopathie, Extrapyramidalzeichen, Störungen des oberen Motoneurons, Kleinhirnzeichen, Kalzifizierung der Basalganglien, Schwäche, Geistesstörungen, Myelopathie, Koma
Endokrine Systeme	Minderwuchs, Heißhunger, fehlende Gewichtszunahme, Diabetes mellitus und insipidus, Hypoglykämie, Störungen der Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsenfunktion, Amenorrhoe, Hypogonadismus, verzögerte Pubertät, Gynaekomastie, Osteoporose, Hyperlipidaemie, Hypopituitarismus, Hyperaldosteronismus, ACTH-Mangel
Herz	Störungen in der der Erregungsbildung und -leitung, hypertrophe Kardiomyopathie, linksventrikuläre Hypertrabekulierung, Herzinsuffizienz
Ohren	Schwerhörigkeit, sensorineurale Taubheit, Tinnitus, peripherer Vertigo
Augen	Katarakt, Glaukom, Pigmentretinopathie, Optikusatrophie , Uveitis, erworbener Strabismus
Verdauungstrakt	Parodontose, Dysphagie, chronisches Erbrechen, Mangel an Verdauungsenzymen, Hepatopathien, chronische Diarrhoea, Zottenatrophie des Dünndarms, Pankreatitis, Obstipation, Anorexie, Gedeihstörungen, Untergewicht trotz adäquater Kalorienaufnahme, Malabsorption, intestinale Pseudoobstruktionen
Nieren	Renale tubuläre Insuffizienz, Fanconi Syndrom, Nierenzysten
Knochenmark	Sideroblastische Anämie, Leukopenie, Thrombopenie, Panzytopenie

In jüngerer Zeit wurde zunehmend die Bedeutung der mitochondrialen Fusion und Teilung in der Pathogenese der mitochondrialen Krankheiten diskutiert (Chan, 2006). Die hierbei zugrunde liegenden Prozesse und beteiligten Proteine wurden in 1.1.5 bereits beschrieben. Bemerkenswerterweise sind zwei menschliche Proteine, die für die Fusion von Mitochondrien notwendig sind, selbst mit bestimmten Mitochondriopathien assoziiert (OPA1 mit der autosomal dominante Optikusatrophie (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000); MFN2 mit der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie Typ 2A (Zuchner et al., 2004)). Durch die ständige ablaufende dynamische Neuorganisation des mitochondrialen Netzwerks finden sich bei Individuen mit Heteroplasmie sowohl Wildtyp- als auch mutierte mtDNA im selben mitochondrialen Kompartiment wieder. Die daraus resultierende Durchmischung der Nukleotide könnte zu einem gewissen Grad der Segregation mutierter mtDNA entgegenwirken (Chan, 2006). Es wurde auch Evidenz für Rekombination mitochondrialer DNA gefunden (D'Aurelio et al., 2004; Kraytsberg et al., 2004). Allerdings ist deren möglicher Einfluss auf die Pathogenese von Mitochondriopathien nicht geklärt (Chan, 2006). Eine weitere Folge der kontinuierlichen Durchmischung und Neuverteilung der Nukleotide könnte die funktionelle Komplementation von Genprodukten mutierter mtDNA durch Genprodukte von Wildtyp-mtDNA sein. Einzelne Mitochondrien könnten daher trotz Präsenz mutierter mtDNA volle Funktionalität erhalten (Nakada et al., 2001; Ono et al., 2001).

1.2.3 OPA1

Das Protein OPA1 wurde durch seine Assoziation mit einer vererbaren Augenkrankheit bekannt, der autosomal dominanten Optikusatrophie (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Diese Krankheit, auch Optikusatrophie Typ Kjer genannt (Kjer, 1959), tritt mit einer geschätzten Prävalenz von 1:10.000 (Eiberg et al., 1994; Kjer et al., 1996) bis 1:50.000 (Lyle, 1990) auf. Sie ist damit neben der Leber'schen Optikusatrophie (Leber hereditary optic neuropathy, LHON) die häufigste hereditäre Optikusatrophie.

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen in *OPA1* und dem Normaldruckglaukom beschrieben (Aung et al., 2002a; Aung et al., 2002b; Aung et al., 2003; Mabuchi et al., 2007; Powell et al., 2003). Das Normaldruckglaukom kann in seinem Verlauf ebenfalls mit einer Optikusatrophie einhergehen. Diese Ergebnisse werden derzeit aufgrund widersprüchlicher Daten kontrovers diskutiert (Woo et al., 2004; Yao et al., 2006).

1.2.3.1 Pathogenese und klinisches Bild der autosomal dominanten Optikusatrophie

Bereits in den ersten zwei Lebensdekaden kommt es bei den Betroffenen zu einer Sehstörung (Delettre et al., 2002; Newman, 2005; Votruba et al., 1998a). Bei

mehr als 80 % der Patienten bleibt der Visus besser als 20/200 (nach Snellen; Fuß beziehungsweise 6/60 (Metrisch) (Newman, 2005; Votruba et al., 1998a). Die Patienten weisen zudem gelegentlich eine Dyschromatopsie (Farbenfehlsichtigkeit) auf, meist mit Betonung der Blau/Gelb-Sehschwäche (Newman, 2005; Votruba et al., 1998a). Das Gesichtsfeld weist ein zentrales, parazentrales oder zentrozäkales Skotom auf, das besonders im supratemporalen Bereich betont ist (Newman, 2005; Votruba et al., 1998a). In einigen besonders schweren Fällen wurde zudem ein Nystagmus festgestellt (Votruba et al., 1998a). Die Ausprägung und der Phänotyp des Krankheitsbildes können sowohl inter- als auch intrafamiliär sehr stark variieren (Votruba et al., 1998a). Ein Teil der Träger ist auch asymptomatisch (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Die Seheinschränkung wird bei den meisten Patienten bereits in der Kindheit oder Jugend bemerkt, allerdings gibt es auch Fälle, in denen die Symptomatik erst zufällig, zum Beispiel im Rahmen der Erkrankung eines Familienangehörigen diagnostiziert wird (Newman, 2005). Die Symptomatik ist in einigen Fällen langsam progredient, in anderen dagegen nicht (Delettre et al., 2002; Votruba et al., 1998a). In den meisten Fällen der autosomal dominanten Optikusatrophie finden sich keine weiteren neurologischen Defekte (Newman, 2005). Es wurden allerdings Fälle beschrieben, in denen neben der Optikusatrophie zusätzlich ein Hörverlust auftrat (Delettre et al., 2002; Newman, 2005). Tatsächlich konnte ein solches vererbtes Syndrom, teilweise in Kombination mit Ptosis und Ophthalmoplegie, mit einer Mutation in *OPA1* in Zusammenhang gebracht werden (Amati-Bonneau et al., 2003; Ke et al., 2006; Li et al., 2005; Payne et al., 2004).

Histopathologisch manifestiert sich die Erkrankung primär als eine Degeneration der zentralen retinalen Ganglienzellen. Möglicherweise als Konsequenz kommt es zu einer aufsteigenden Atrophie mit Degeneration von Myelinscheiden und Neurofibrillen im *Nervus opticus*, *Tractus opticus* und *Chiasma* (Delettre et al., 2002; Newman, 2005; Votruba et al., 1998a; Votruba et al., 2003). Ein charakteristisches Zeichen der Sehnervenatrophie ist eine symmetrische temporale Abblassung der Sehnervpapille (Delettre et al., 2002). Besonders bei älteren Patienten oder bei Patienten mit schwerem Verlauf kann eine diffuse Atrophie der Sehnervpapille auftreten (Delettre et al., 2002).

1.2.3.2 Genetik der autosomal dominanten Optikusatrophie

In zahlreichen Kopplungsanalysen konnte der für die autosomal dominante Optikusatrophie vieler Familien verantwortliche Genlokus bis 1998 auf eine etwa 400 kb große Region des langen Arms von Chromosoms 3 (*OPA1*; um den Locus D3S1523 auf 3q28-qtr) eingegrenzt werden (Bonneau et al., 1995; Brown et al., 1997; Eiberg et al., 1994; Johnston et al., 1997; Lunkes et al., 1995; Votruba et al., 1997; Votruba et al., 1998b). In zwei unabhängigen Studien wurde schließlich in diesem Bereich das Gen *OPA1* identifiziert werden (Alexander et al., 2000; Delettre

et al., 2000). In einer weiteren Studie wurden Hinweise auf eine Heterogenität der Erkrankung gefunden (Seller et al., 1997). In der Folge wurde von zwei weiteren Loci berichtet: OPA4 (18q12.2–q12.3) (Kerrison et al., 1999) und OPA5 (22q12.1–q13.1) (Barbet et al., 2005).

In verschiedenen Studien konnte in etwa 30% bis 90% der Fälle die Erkrankung mit Veränderungen von *OPA1* in Verbindung gebracht werden (Delettre et al., 2002). Das Gen *OPA1* kodiert in 31 Exons acht Transkriptionsvarianten, die durch alternatives Spleißen entstehen und sich lediglich durch die Präsenz beziehungsweise das Fehlen der Exons 4, 4b und 5b unterscheiden (Abbildung 1-5) (Delettre et al., 2001; Olichon et al., 2002; Satoh et al., 2003). Mittlerweile sind mehr als 83 unterschiedliche Mutationen in *OPA1* bekannt, die mit der autosomal dominanten Optikusatrophie assoziiert sind (Ferre et al., 2005). Hierzu zählen Deletionen und Insertionen von Nukleotiden, sowie Spleiß-, Nonsense- und Missense-Mutationen bis hin zur vollständigen Deletion des Gens (Delettre et al., 2002; Ferre et al., 2005). Aufgrund der großen Zahl bekannter Mutationen und Sequenzvariationen in *OPA1* wurde eine online abrufbare Datenbank erstellt (<http://lbbma.univ-angers.fr/eOPA1/>) (Ferre et al., 2005).

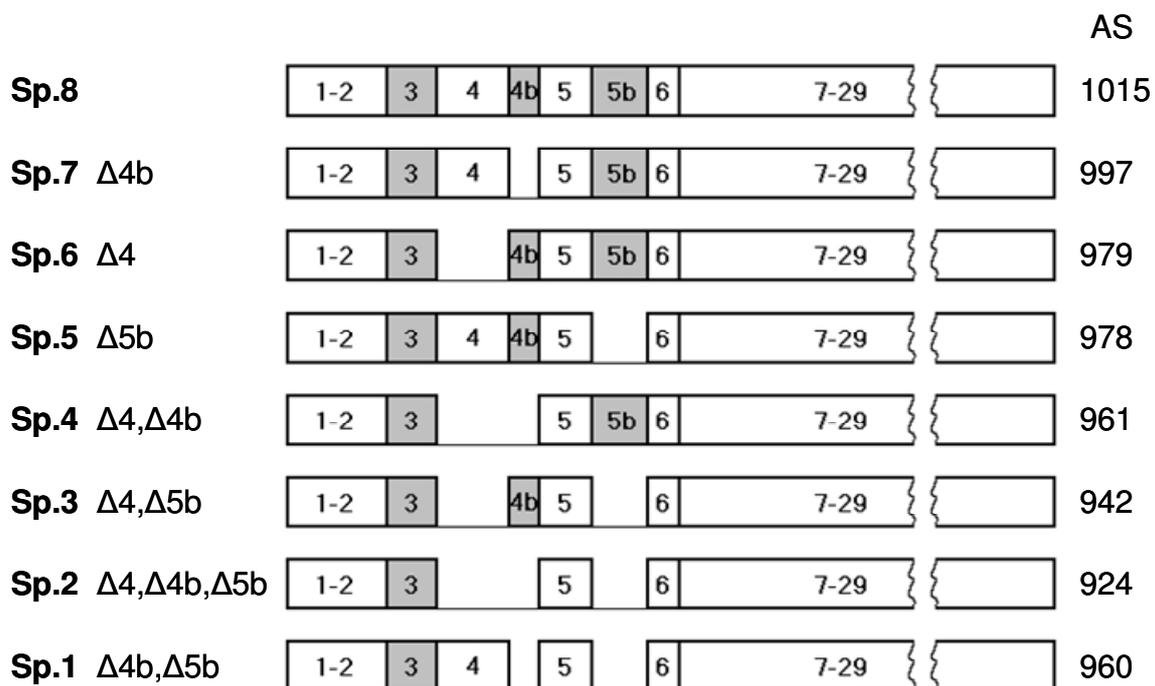


Abbildung 1-5. Transkriptionsvarianten von *OPA1*. *OPA1* wird nach Transkription und alternativen Spleißen der 31 Exons (1-29, 4b und 5b) in bis zu acht unterschiedliche Transkriptionsvarianten (Sp.1 – Sp.8) translatiert, die sich lediglich durch Präsenz beziehungsweise Fehlen der Exons 4, 4b und 5b unterscheiden. Die Länge der resultierenden Proteine ist in Aminosäuren rechts angegeben (AS).

1.2.3.3 Das Protein OPA1

OPA1 ist ein in eukaryotischen Organismen konserviertes Protein. In *S. cerevisiae* wird es Mgm1 genannt, in *S. pombe* Msp1 (siehe auch 1.1.5.1) (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Pelloquin et al., 1998). Die Erkenntnisse über die orthologen Proteine Mgm1 und Msp1 ließen bereits frühzeitig eine mitochondriale Lokalisation von OPA1 vermuten (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Diese Vermutung konnte durch mehrere Studien bestätigt werden, wonach OPA1 im Intermembranraum der Mitochondrien vorliegt (Griparic et al., 2004; Misaka et al., 2002; Olichon et al., 2002; Satoh et al., 2003). Hier lokalisiert es zum einen an der Innenmembran (Griparic et al., 2004; Satoh et al., 2003) nahe den Cristae (Olichon et al., 2002) und zum anderen an der Außenmembran (Satoh et al., 2003).

In zahlreichen Studien wurde die Verteilung von OPA1 in den Nervengewebe des Auges von Mensch, Maus und Ratte untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression nicht auf die retinalen Ganglienzellen beschränkt ist (Aijaz et al., 2004; Ju et al., 2005; Kamei et al., 2005; Pesch et al., 2004; Wang et al., 2006). Tatsächlich findet sich OPA1 in nahezu allen untersuchten Geweben. Es wurde sowohl im restlichen zentralen Nervengewebe als auch in anderen untersuchten Organen wie zum Beispiel Niere, Leber, Herz und Leukozyten gefunden (Bette et al., 2005; Delettre et al., 2001; Misaka et al., 2002). Die Expressionslevel der unterschiedlichen OPA1-Transkriptionsvarianten variiert dabei sehr stark von Gewebe zu Gewebe (Delettre et al., 2001). In HeLa-Zellen werden hauptsächlich die Transkriptionsvarianten 1 und 7 exprimiert (Satoh et al., 2003).

OPA1 kodiert ein Dynamin-ähnliches Protein (Misaka et al., 2002; Praefcke and McMahon, 2004). Dynamin-ähnliche Proteine enthalten eine GTPase-Domäne, eine Dynamin-Mitteldomäne, eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PHD) und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Im Unterschied zu Dynaminen fehlt den Dynamin-ähnlichen Proteinen die prolinreiche Domäne (PRD) (Abbildung 1-6) (Praefcke and McMahon, 2004). *OPA1* verfügt zudem zusätzlich über ein N-terminales mitochondriales Sortierungssignal, gefolgt von einem hydrophoben und einem Coiled-Coil-Bereich (Abbildung 1-6) (Misaka et al., 2002; Praefcke and McMahon, 2004). Der hydrophobe Bereich hängt hierbei wesentlich vom Vorhandensein beziehungsweise dem Fehlen der Exons 4, 4b und 5b ab und hat vermutlich Einfluss auf die Topologie des Proteins: ist der hydrophobe Bereich stark ausgeprägt, könnte dies zur Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Innenmembran führen. Fehlt der hydrophobe Bereich, so könnte dies zu einer kurzen löslichen Form von *OPA1* im Intermembranraum führen (Duvezin-Caubet et al., 2007; Ishihara et al., 2006). Tatsächlich konnten sowohl membranverankerte als auch lösliche Formen von Mgm1 nachgewiesen werden (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Die Fähigkeit zur Hydrolyse von GTP konnte durch bakterielle

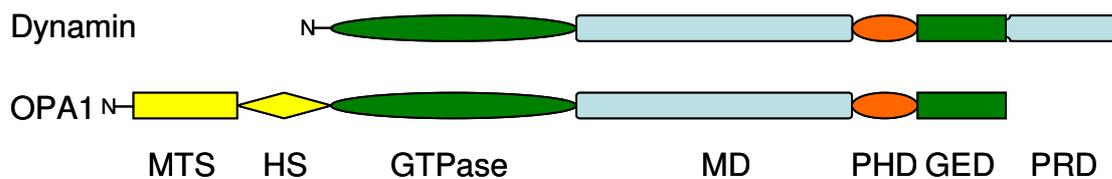


Abbildung 1-6. OPA1 ist ein Dynamin-ähnliches Protein. Die N-terminale Domäne von OPA1 enthält ein mitochondriales Sortierungssignal (MTS), einen hydrophoben Bereich und einen Coiled-Coil-Bereich (HS). Danach folgt der Dynamin-ähnliche Bereich mit GTPase-Domäne, Dynamin-Mitteldomäne (MD), Pleckstrin-Homologie-Domäne (PHD) und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Dynamine enthalten eine prolinreiche Domäne (PRD), die sich in den Dynamin-ähnlichen Proteinen nicht findet (Praefcke and McMahon, 2004).

Expression und Aufreinigung der GTPase-Domäne von OPA1 *in vitro* gezeigt werden (Griparic et al., 2004).

Die genaue Funktion von OPA1 ist bis heute nicht vollständig verstanden. Seine Orthologen in *S. cerevisiae* und *S. pombe* sind seit längerem als wichtige Bestandteile der mitochondrialen Fusionsmaschinerie bekannt (siehe auch 1.1.5.1). Tatsächlich konnte in Komplementationsstudien in *S. pombe* der Wachstumsphänotyp der Deletion von *Msp1* durch die Expression von OPA1-Transkriptionsvarianten komplementiert werden (Lenaers et al., 2002; Olichon et al., 2006). Um den Einfluss von OPA1 auf die mitochondriale Morphologie von Säugetierzellen zu untersuchen, wurden mehrere Studien durchgeführt, deren Ergebnisse zum Teil auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen. Eine Überexpression von OPA1 in Zelllinien der Grünen Meerkatze (COS-7) und Mensch (HeLa) führte in einem Teil der Experimente zur Fragmentierung der Mitochondrien (Griparic et al., 2004; Misaka et al., 2002; Misaka et al., 2006). Allerdings wurde in einem Teil dieser Studien ebenfalls eine Fragmentierung nach Expression von OPA1-Mutanten mit inaktivierter GTPase-Domäne beobachtet (Misaka et al., 2002; Misaka et al., 2006). In einer anderen Studie führte die Überexpression von OPA1 in COS-7-Zellen zu einer Aggregation der Mitochondrien (McQuibban et al., 2006). Diese Aggregation hatte Ähnlichkeit mit den Auswirkungen einer Überexpression von Mitofusinen und wurde im Wesentlichen als Folge einer übermäßiger Fusion gewertet (McQuibban et al., 2006). In einer weiteren Studie konnte die Induktion tubulärer mitochondrialer Morphologie durch Überexpression von OPA1 in einer Mauszelllinie (MEF) gezeigt werden (Cipolat et al., 2004). Dieser Effekt war von einer funktionsfähigen GTPase- und C-terminale Coiled-coil-Domäne von OPA1 abhängig (Cipolat et al., 2004). Es wurde vermutet, dass eine Überexpression von OPA1 tubuläre mitochondriale Morphologie nur in Zelllinien induziert, die nicht von vornherein eine tubuläre Morphologie, wie zum Beispiel HeLa-Zellen, besitzen (Cipolat et al., 2004).

In Experimenten, in denen die Expression von OPA1 in Zelllinien mit verschiedenen Techniken herunterreguliert wurde, konnte mit dem Elektronenmikroskop eine veränderte Morphologie der Cristae (Arnoult et al., 2005; Frezza et al., 2006; Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003), Störung des mitochondrialen Membranpotentials (Chen et al., 2005; Olichon et al., 2003) und Aggregation (Kamei et al., 2005) und zum überwiegenden Teil auch Fragmentierung der Mitochondrien beobachtet werden (Arnoult et al., 2005; Chen et al., 2005; Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Ishihara et al., 2006; Olichon et al., 2003). Zugleich konnte in OPA1-herunterregulierten Zellen mit fragmentierten Mitochondrien durch Expression von membranverankerten OPA1-Isoformen, aber nicht durch kurze Isoformen eine tubuläre Morphologie wiederhergestellt werden (Ishihara et al., 2006). Die bedeutende Funktion von OPA1 in der mitochondrialen Fusion wurde des Weiteren mit einem Fusionsassay (Polyethylenglykol-Fusionsassay) ebenfalls unter Verwendung von Zellen mit herunterregulierten OPA1 gezeigt (Cipolat et al., 2004).

Zunehmend rückt die Rolle von OPA1 in der Apoptose (programmierter Zelltod) in den Mittelpunkt der Diskussion (Gottlieb, 2006). Herunterregulation von OPA1 führte nicht nur zu fragmentierten Mitochondrien und veränderter Morphologie der Cristae, sondern begünstigt auch die Freisetzung von Cytochrom *c* und Apoptose (Arnoult et al., 2005; Olichon et al., 2003). Die hohe Apoptoseanfälligkeit von Zellen mit herunterregulierten OPA1 konnte wiederum durch Überexpression von BCL2, einem anti-apoptotischem Protein, inhibiert werden konnte (Olichon et al., 2003). Eine Überexpression von OPA1 konnte entsprechend Freisetzung von Cytochrom *c* und Apoptose verzögern (Frezza et al., 2006). Erstaunlicherweise scheint dieser anti-apoptotische Effekt von OPA1 unabhängig von der mitochondrialen Fusion zu sein, da trotz des Fehlens der für die Fusion notwendigen Mitofusine (MFN1 und MFN2, siehe auch 1.1.5.1) und komplett fragmentierten Mitochondrien die Expression von OPA1 nach wie vor schützend wirkte (Frezza et al., 2006). Schließlich wurde Evidenz für eine Stabilisierung der Cristae durch OPA1 gefunden (Frezza et al., 2006). Auf diesem Effekt könnte die anti-apoptotische Funktion von OPA1 beruhen, da sich in den Cristae der größte Teil des Cytochrom *c* befindet, das als proapoptotischer Faktor im Verlauf der Apoptose freigesetzt wird. Der stabilisierende Effekt erfordert die Bildung von OPA1-Heterooligomere, bestehend aus kurzen löslichen und membranverankerten Isoformen (Frezza et al., 2006). Im Verlauf der Apoptose werden die oligomeren Strukturen aufgelöst, die Cristae öffnen sich und das Cytochrom *c* wird freigesetzt (Frezza et al., 2006).

Die Ergebnisse der genannten Studien führten zu der Schlussfolgerung, dass OPA1 in zwei Prozessen eine Rolle spielt: zum einen im Rahmen der Apoptose indem es die Morphologie der Cristae und damit die Freisetzung von Cytochrom *c* kontrolliert, zum anderen als Komponente der mitochondrialen Fusionsmaschinerie (Frezza et al., 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Studie werden diese beiden

unterschiedlichen Funktion von OPA1 in Wirbeltieren auf alternatives Spleißen der Exons 4, 4b und 5b zurückgeführt (Olichon et al., 2006). Demnach wird vorgeschlagen, dass Exon 4, der konservierte Teil des Proteins, im Zusammenhang mit dem Erhalt des mitochondrialen Netzwerks und Membranpotentials steht. Exon 4b und 5b sind dagegen spezifisch für Wirbeltiere und definieren womöglich die Funktionen in der Apoptose (Olichon et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit und in anderen Studien konnte in menschlichen Gewebe nach SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen den C-Terminus von OPA1 bis zu fünf Proteinisoformen voneinander abgegrenzt werden (Delettre et al., 2001; Duvezin-Caubet et al., 2006; Olichon et al., 2003; Olichon et al., 2006). Inwieweit diese Proteinisoformen aus den 8 Transkriptionsvarianten von OPA1 hervorgehen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit unklar. Das dem OPA1 orthologe Mgm1 wird in *S. cerevisiae* durch die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 prozessiert (siehe auch 1.1.5.1) (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Da OPA1 und Mgm1 große strukturelle Ähnlichkeit haben, könnte eine dem Pcp1 orthologe Rhomboidprotease im Menschen für die Proteolyse von OPA1 verantwortlich sein.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

OPA1 ist ein mitochondriales Protein, das an zwei bedeutenden zellbiologischen Prozessen beteiligt ist: zum einen an der Apoptose, zum anderen an der mitochondrialen Fusion. Die genaue Funktionsweise und Regulation dieser Prozesse sind bisher nur in Ansätzen verstanden.

Die Ergebnisse bisheriger Studien lassen sowohl für die fünf OPA1-Proteinisoformen als auch für die acht OPA1-Transkriptionsvarianten teilweise unterschiedliche Funktionen vermuten (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006; Olichon et al., 2006). Die posttranslationale Modifikation der OPA1-Transkriptionsvarianten durch spezifische proteolytische Prozessierung scheint wesentlichen Einfluss auf diese Funktionen zu haben (siehe auch 1.2.3.3). Eine wichtige Fragestellung ist demnach die Zuordnung der acht OPA1-Transkriptionsvarianten zu den bis zu fünf Proteinisoformen. Kann jede Proteinisoform einer Transkriptionsvariante zugeordnet werden? Können aus einer Transkriptionsvariante verschiedene Proteinisoformen hervorgehen, ähnlich wie es für das Ortholog der Hefe, Mgm1, beschrieben wurde? Entscheidend für das regulatorische und funktionelle Verständnis von OPA1 ist des Weiteren die Fragestellung, welche Proteasen an der Proteinreifung von OPA1 beteiligt sind. Lassen sich die Erkenntnisse über die Prozessierung von Mgm1 durch die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 in der Hefe auf OPA1 übertragen? Sind andere Proteasen an der Biogenese von OPA1 beteiligt?

Diese Fragen sollten in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu galt es die proteolytische Prozessierung von OPA1 in *S. cerevisiae* zu rekonstituieren und die zugrunde liegenden Proteasen zu identifizieren. In einem parallelen Ansatz sollte die Konserviertheit der an diesem Prozess möglicherweise beteiligten mitochondrialen Rhomboidprotease durch funktionelle Komplementation von Pcp1 durch das menschliche Ortholog geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA. Zusätzlich wurde die Extinktion der Probe bei 280 nm gemessen, um den Grad an Proteinverunreinigungen abschätzen zu können.

2.1.2 Ethanolfällung

Um DNA-Lösungen auf höhere Konzentrationen zu bringen und sie von unerwünschten Salzen zu befreien wurden Ethanolfällungen durchgeführt. Die Lösungen wurden hierfür mit 5 M NaCl auf eine Endkonzentration von 300 mM verdünnt. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumens an kaltem Ethanol (-20 °C) und kaltstellen der Probe bei -20 °C für 30 min wurde die präzipitierte DNA bei 20000g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und mit kaltem 70 % (v/v) Ethanol (-20 °C) gewaschen. Das Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

2.1.3 Herstellung von cDNA aus RNA

Im Gegensatz zu genomischer DNA von *S. cerevisiae* enthalten die Gene menschlicher Zellen häufig Introns. Deshalb wurden die Matrizenstränge für die Polymerasekettenreaktion der Nukleotidsequenzen menschlicher Proteine unter Verwendung einer Reversen Transkriptase (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV); Roche) aus menschlicher mRNA hergestellt. Ein Reaktionsansatz bestand hierbei aus 2 μl eines 10fach konzentrierten Reaktionspuffers (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3), 4 μl einer Lösung aus MgCl_2 (25 mM), 2 μl einer Mischung aller vier Desoxynukleosidtriphosphate (1 mM), 2 μl Oligo-p(dT)₁₅ Primer (0.04 A_{260} Units / 1.6 μg), 1 μl RNase (50 Units), 0,8 μl AMV Reverse Transkriptase (≥ 20 Units) und ≤ 1 μg der zu amplifizierenden isolierten RNA. Der Reaktionsansatz wurde auf ein Volumen von 20 μl durch Zugabe von sterilem Wasser aufgefüllt und zum Anlagern der Primer für 10 min bei 25 °C, anschließend für die reverse Transkription für 60 min bei 45 °C inkubiert. Durch eine folgende Inkubation bei 99 °C für 5 min wird die Transkriptase denaturiert.

2.1.4 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann durch wiederholtes Durchlaufen eines Reaktionszyklus von 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 100 µl enthielt 1-3 U der thermostabilen DNA-Polymerase, 10 µl des entsprechenden vom Hersteller der Polymerase gelieferten zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers, 75 pmol der beiden Oligonukleotide, 200 µM aller vier Desoxynukleosidtriphosphate 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-Polymerasen kamen die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (GL BioTech), die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) und das *Expand*-System (Roche) zum Einsatz. 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“). Das *Expand*-System besteht aus einer Mischung beider Polymerasen und vereinigt hohe Prozessivität und Geschwindigkeit mit geringer Fehlerrate bei der Amplifikation. Ein typischer Reaktionsverlauf wurde in einem Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech) durchgeführt und begann mit einer fünfminütigen Vorinkubation bei 94 °C, um die Matrizenstränge vollständig zu denaturieren. Es folgten 20–35 Reaktionszyklen aus Denaturierung der Matrizenstränge (1 min bei 94 °C), Anlagerung der spezifischen Oligonukleotide (1 min bei 40 - 54 °C) und Synthese der DNA (1 bis 6 min bei 72 °C, je nach Länge des Matrizenstrangs und eingesetzter Polymerase). Nach Ablauf der Reaktionszyklen wurden unvollständig synthetisierte DNA-Stränge durch zehnminütige Inkubation bei 72 °C vervollständigt. Die Entstehung des entsprechenden Produkts wurde anschließend durch Auftragen von ca. 2 µl des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.1.5 Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen

Die Reinigung und Entsalzung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe von Mikrozentrifugationssäulchen (Qiaquick PCR Purification Kit). Dazu wurde das PCR-Produkt zunächst mit 5 Volumina Puffer PB verdünnt. Zum Binden an das Säulenmaterial wurde diese Lösung für 1 min bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durch ein Mikrozentrifugationssäulchen zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Genauso wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und nach Verwerfen der Waschlösung nochmals zentrifugiert, um den Puffer und darin enthaltenen Ethanol vollständig zu entfernen. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl sterilem Wasser eluiert.

2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Kleine Mengen an Plasmid-DNA (Minipräparation) wurden durch alkalische Lyse der entsprechenden *E. coli*-Zellen gewonnen (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurden die Zellen über Nacht in 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden 1 min bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Rest der Kultur wurde bei 4 °C gelagert, um den entsprechenden Stamm für spätere Verwendung zu konservieren. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS). Nach erneuter Inkubation für 5 min bei RT wurden 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat; pH 4,8) zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei fallen die meisten Proteine und chromosomale DNA aus und können bei 16000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit Ethanol gefällt (2.1.2). Die getrocknete DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser mit 50 µg/ml Ribonuklease A aufgenommen. 2 µl der präparierten Plasmid-DNA wurden durch Restriktionsverdau analysiert (vgl. 2.1.7).

Größere Mengen an Plasmid-DNA mit einer höheren Reinheit (Midi-Präparation) wurden mit Hilfe des „Jetstar-Kits“ der Firma Genomed präpariert. 40 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes von *E. coli* bei 37 °C in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden 5 min bei 4000 g in einem JA20-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; pH 8) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) für 5 min bei RT lysiert und schließlich Proteine und chromosomale DNA durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat; pH 5,5) gefällt. Nach zehninütiger Zentrifugation in einem JA20-Rotor bei 11000 g wurde der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl; 0,1 M Natriumacetat; 0,15 % Triton X-100; pH 5,0) äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgebracht. Die Säule wurde zwei Mal mit 10 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl; 0,1 M Natriumacetat; pH 5,5) gewaschen und die Plasmid-DNA schließlich mit 5 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl; pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt, das Präzipitat für 30 min bei 11000 g und 4 °C im JA20-Rotor sedimentiert und einmal mit 5 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl sterilem Wasser gelöst.

2.1.7 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen. Dabei wurden die vom Hersteller (New England Biolabs,

NEB) mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer verwendet. Für 1 µg DNA wurden 1-2 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Ansätze wurden für mindestens zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Nach dem Restriktionsverdau wurden endständige Phosphatgruppen der Klonierungsvektoren mit Shrimp alkalischer Phosphatase (Roche) entfernt, um eine spätere Religation der Vektoren zu vermeiden. Dazu wurden die Ansätze mit einem Zehntel ihres Volumens an zehnfach konzentriertem Puffer (0,5 M Tris/HCl; 50 mM MgCl₂; pH 8,5) und 1 U Shrimp alkalischer Phosphatase pro 50 µl Reaktionsansatz versetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch 15minütiges Erhitzen auf 65 °C irreversibel inaktiviert. Die so behandelten Vektoren wurden über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (vgl. 2.1.12, 2.1.12).

2.1.9 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (NEB). Dazu wurden ca. 50 bis 200 ng des linearisierten und eventuell phosphataseverdauten Vektors und ein ungefähr dreifacher molarer Überschuss 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), 0,5 U T4-DNA-Ligase und die entsprechende Menge Wasser. Die Ligation erfolgte für mindestens 4 Stunden, normalerweise über Nacht, bei 16 °C.

2.1.10 Herstellung von DNA-Fragmenten ohne Überhang

Zur Herstellung kompatibler Schnittstellen wurden DNA-Fragmente mit der T4-DNA-Polymerase behandelt, die Überhänge am 5'-Ende auffüllt und am 3'-Ende entfernt. Bei vorhergegangener Verwendung geeigneter Restriktionsendonukleasen enthalten die mit dem Enzym behandelten DNA-Fragmente keine Überhänge und sind grundsätzlich für eine Ligation (2.1.9) mit anderen DNA-Fragmenten ohne Überhang geeignet. Der Reaktionsansatz enthielt 100-150 ng/µl der linearisierten DNA, den vom Hersteller (New England Biolabs, NEB) mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer 2, BSA (100 µg/ml), 100 µM aller vier Desoxynukleosidtriphosphate, 1 U/(µg DNA) T4-DNA-Polymerase und hatte typischerweise ein Endvolumen von 100 µl. Nach Inkubation bei 15 °C für 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (pH 8,0) auf eine Endkonzentration von 10 mM und Inkubation bei 75 °C für 20 Minuten gestoppt und anschließend die DNA durch Ethanol fällung aufkonzentriert.

2.1.11 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Für die gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarose-Flachgele mit 30 oder 100 ml Gelbettvolumen benutzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,8 - 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7,5; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) aufgekocht und bei 65 °C gelagert. Für die Detektion der DNA-Fragmente wurden beim Gießen der Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 5fach konzentriertem Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration: 1 mM EDTA; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 6 % (w/v) Glycerin; pH 8) und auf das entsprechende Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 15 V/cm durchgeführt. Danach wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden zunächst unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen. Dabei wurde zunächst die Masse des Agarosestücks bestimmt und dieses dann mit dem dreifachen Volumen (also 300 µl pro 100 mg Agarose) an Puffer QG versetzt. Durch Inkubation bei 50 °C für 10 min wurde die Agarose aufgelöst. Die Lösung wurde auf ein Mikrozentrifugationssäulchen geladen und dieses für 1 min bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulchen einmal mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Erneute Zentrifugation nach dem Verwerfen der Waschlösung stellte die vollständige Entfernung der Waschlösung und des darin enthaltenen Ethanols sicher. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl sterilem Wasser eluiert.

2.1.13 Präparation transformationskompetenter Zellen von *E. coli*

Mit einer 50 ml Vorkultur von *E. coli* DH5α oder XL1-blue in LB-Medium wurden 2 l LB-Medium auf eine OD₅₇₈ von ca. 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C weitergezogen, bis eine OD₅₇₈ von ca. 0,5 erreicht war. Danach wurden die Zellen für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei 4000 g und 2 °C in einem JA10-Rotor abzentrifugiert. Alle verwendeten Behälter und Lösungen wurden bei 4 °C vorgekühlt. Die Zellen wurden nacheinander mit 1000 ml, 500 ml und schließlich 100 ml 10 % (v/v) Glycerin (4 °C) gewaschen und nach jedem Waschschrift 15 min bei 4000 g und 2 °C zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Bakterien in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in Portionen von je 60 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

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

Die Transformation kompetenter Zellen von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und darin in einem Elektroporationsgerät mit Spannungspulsen transformiert (2,5 kV; 400 Ω; 25 µF Gene-Pulser, Bio-Rad) (Dower et al., 1988; Miller et al., 1988). Die Suspension wurde sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37 °C geschüttelt, um die Resistenz gegen Ampicillin auszubilden. Danach wurden 100 - 200 µl der Suspension auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.15 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

2.1.15.1 Herstellung kompetenter Hefezellen mit Lithiumacetat

Der entsprechende Stamm von *S. cerevisiae* wurde über Nacht in YPD oder einem anderen geeigneten Medium angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur auf eine OD₅₇₈ von ungefähr 0,1 verdünnt (50 - 100 ml) und bis zu einer OD₅₇₈ von ungefähr 0,5 weitergeschüttelt. Die Zellen wurden in einem sterilen Zentrifugationsröhrchen bei 2500 g für 5 min sedimentiert (Sigma 3K12; Rotor 11133), einmal mit sterilem Wasser gewaschen, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 s bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment schließlich in 400 µl 100 mM Lithiumacetat suspendiert. Die transformationskompetenten Zellen wurden in 50 µl Aliquots portioniert und sofort für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C aufbewahrt (Gietz et al., 1995).

2.1.15.2 Transformation kompetenter Hefezellen

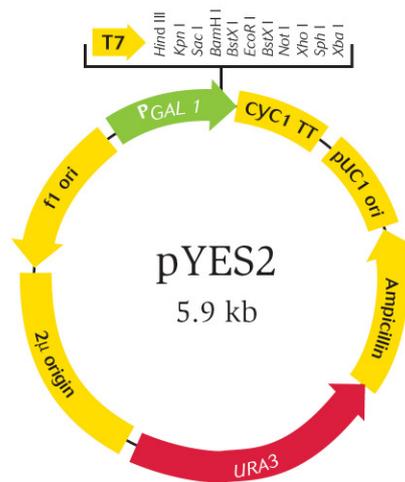
Für jede Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen für 15 s bei 800 g in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Zellen wurden 240 µl PEG 3350 (50 % (w/v)), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 10 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), und 80 µl steriles Wasser zugegeben, in dem 0,1-10 µg der zu transformierenden DNA gelöst waren. Die Ansätze wurden 1 min lang kräftig gemischt und dann 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 min. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen 15 s bei 800 g sedimentiert, in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Platten mit Selektivmedium ausplattiert (Gietz et al., 1995). Die Selektion erfolgte über die entsprechenden Auxotrophiemarker.

2.1.16 DNA-Sequenzierung

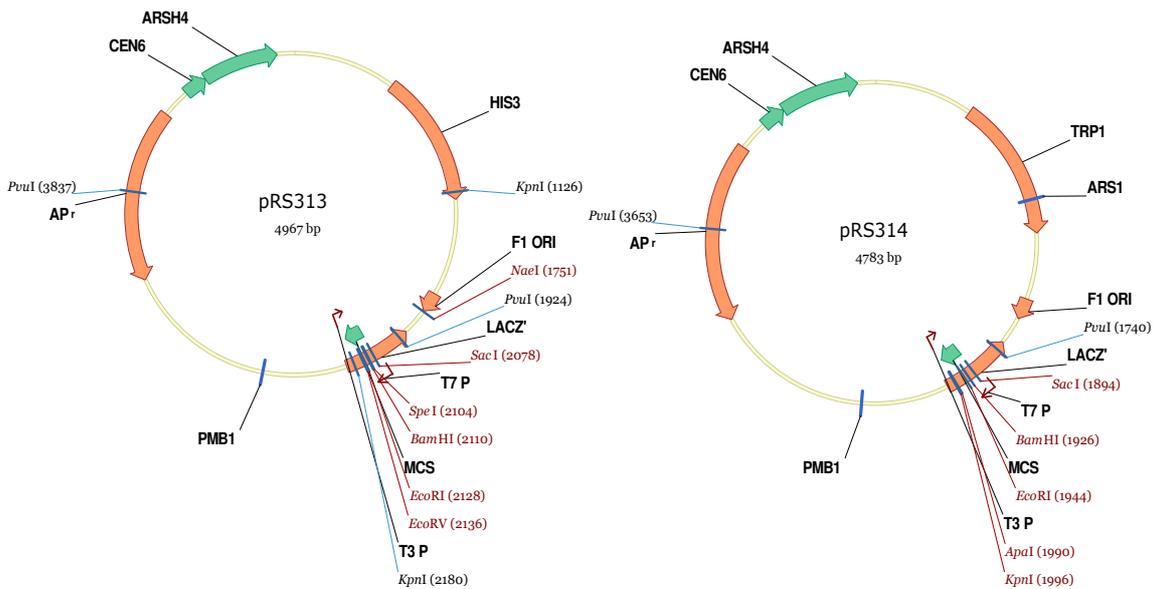
Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Medigenomix (Martinsried, Deutschland) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide.

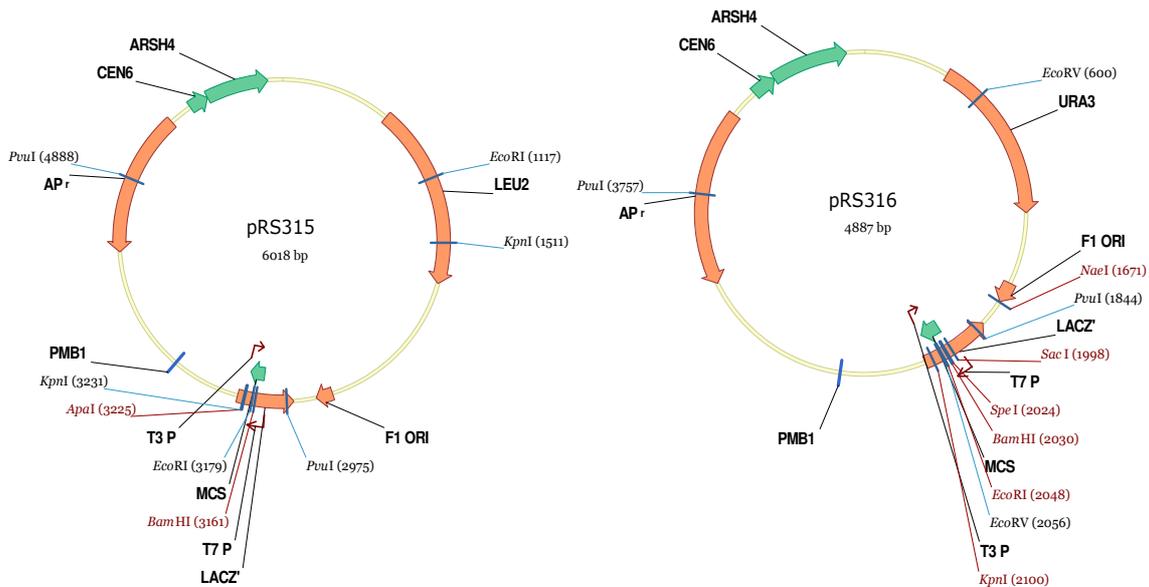
2.1.17 Verwendete Vektoren

2.1.17.1 pYES2 (Invitrogen)



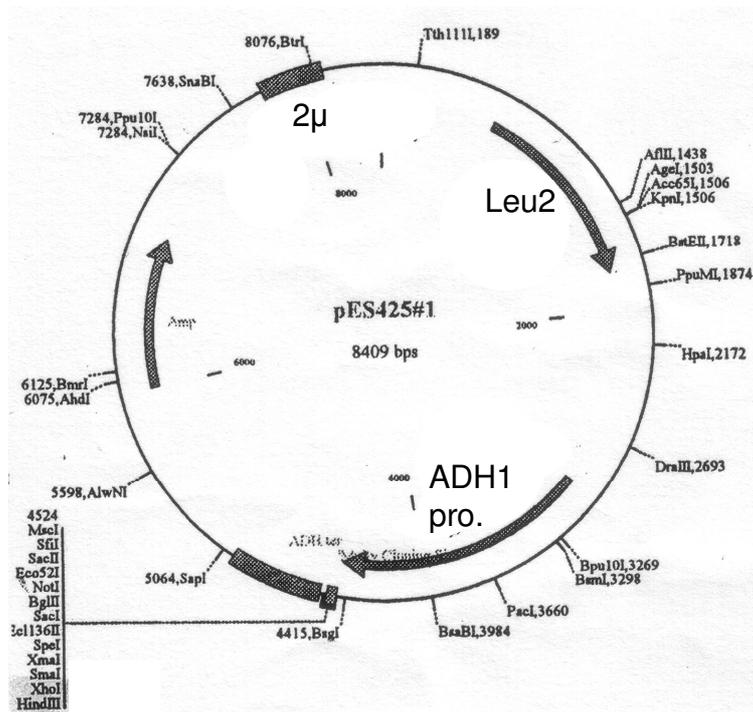
2.1.17.2 pRS313, pRS314 and pRS316 (Sikorski and Hieter, 1989)





Die für die Klonierungen (vgl. 2.1.18) wesentlichen Restriktionsschnittstellen wurden gekennzeichnet.

2.1.17.3 pES425#1 (Dr. Doron Rapaport)



2.1.18 Klonierungsstrategien

2.1.18.1 pES425-PARL

Zur Erstellung eines Konstrukts zur Expression von PARL in wurde cDNA aus menschlicher RNA (Leukozyten) synthetisiert (siehe 2.1.3). Unter Verwendung der Primer Parl_Kpn1_Apa1_fwd und Parl_BamH1_EcoR1_rev wurde die kodierende Sequenz von *PARL* aus der cDNA amplifiziert (2.1.4). Die beiden Primer führen

durch stille Mutation die Schnittstellen *KpnI* und *ApaI* beziehungsweise *EcoRI* in das Amplifikationsprodukt ein, die zur Klonierung in den Vektor pRS314 verwendet wurden (pRS314-PARL). Der Promotor von *Pcp1* wurde mit den Primern *Pcp1pro_Apa1_rev* und *Pcp1pro_Kpn1_fwd* von genomischer Hefe-DNA amplifiziert und unter Verwendung der Schnittstellen *KpnI* und *ApaI* in pRS314-PARL kloniert. Unter Verwendung der Schnittstelle *PvuI* wurde der endogene Promotor von *Pcp1* und *PARL* in den Vektor pRS315 umkloniert (pRS315-PARL-*Pcp1pro*). Da der endogene Promotor von *Pcp1* scheinbar nicht zu einer ausreichenden Expression von *PARL* führt, wurde pRS315-PARL-*Pcp1pro* als Matrize und die Primer *PARL_MfeI_HindIII_fwd* und *PARL_XhoI_Rev* zur erneuten Amplifikation von *PARL* verwendet. Unter Verwendung der Schnittstellen *MfeI* und *XhoI* wurde das Amplifikationsprodukt in den Vektor pYES2 unter Verwendung der Schnittstellen *EcoRI*, das kompatibel zu *MfeI* ist, und *XhoI* kloniert. Schließlich wurde *PARL* von diesem Konstrukt unter Verwendung der Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in den Vektor pES425#1 subkloniert. Das resultierende Konstrukte pES425-PARL wurden durch Sequenzierung und Vergleich mit der Sequenzen von *PARL*-Transkriptionsvariante 1 (RefSeq NM_018622) in der Sequenz-Datenbank von NCBI (National Center of Biotechnology Information) überprüft.

Tabelle 2-1. Primer für die Klonierung und Sequenzierung von pES425-PARL.

Primer	Sequenz 5' → 3'
<i>PARL_MfeI_HindIII_fwd</i>	GCGCCAATTGAAGCTTATGGCGTGGCGAGGCTGG
<i>PARL_XhoI_Rev</i>	CGCTCGAGTTACTTAGAGCCACCTCC
<i>ParI_Kpn1_Apa1_fwd</i>	CCCGGTACCGAGGCTGGGCCAGAGAGGCTGG
<i>ParI_BamHI_EcoRI_rev</i>	CCCGGATCCGAATTCTTACTTAGAGCCACCTCCTTTTTTGG
<i>Pcp1pro_Apa1_rev</i>	CCCGGGCCCAGCCTCGCCACGCCATGTTACACTTGGGCAATTTATTAC
<i>Pcp1pro_Kpn1_fwd</i>	CCCGGTACCTCATCAAGGAAAGCGGTGG
<i>SeqParI_fwd</i>	TCAGAAAGGAGATTAACAAGTGG
<i>SeqParI_rev</i>	CTGGATTGATGTGAAATATCTG

2.1.18.2 pYES2-OPA1 Serie

Zur Erstellung von Konstrukten zur Expression von OPA1 wurde cDNA aus menschlicher RNA (fetales Gehirn, Leukozyten und Fibroblasten) synthetisiert. Unter Verwendung der Primer *Opa1Asc1/Bbe1fwd* und *Opa1Kpn1rev* wurde die

kodierende Sequenz von *OPA1* aus der cDNA amplifiziert. Die beiden Primer führen durch stille Mutation die Schnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I in das Amplifikationsprodukt ein, die zur Klonierung in den Vektor pRS316 verwendet wurden (pRS316-*OPA1*). Unter Verwendung der Schnittstelle *Pvu*I wurde *OPA1* in den Vektor pRS313 umkloniert (pRS313-*OPA1*). Da der endogene Promotor von *Mgm1* nur zu einer sehr schwachen Expression von *OPA1* in der Hefe führte, wurden die kodierenden Sequenzen der Transkriptionsvarianten 4, 7 und 8 schließlich unter Verwendung der *Bam*HI- und *Kpn*I-Schnittstellen in pRS313-*OPA1* in den Vektor pYES2 unter Verwendung der *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen umkloniert. Die inkompatiblen Schnittstellen *Kpn*I und *Eco*R1 wurden hierbei in einem ersten Schritt mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und anschließend mit der T4 DNA Polymerase behandelt (2.1.10). Hierdurch werden die Schnittstellen für eine spätere Ligation kompatibel zueinander. In einem zweiten Schritt wurden die Sequenzen mit *Bam*HI geschnitten und schließlich durch Ligation *OPA1* in pYES2 kloniert.

Tabelle 2-2. Primer für die Klonierung und Sequenzierung der Serie pYES2-*OPA1*.

Primer	Sequenz 5' → 3'
Opa1RepRev	CTTGAATTTCTCTAACTTTCTTG
Opa1Kpn1rev	CCCCGGTACCTTATTTCTCCTGATGAAGAGCTTC
Opa1Asc1/Bbe1fwd	CCCCGGATCCATGTGGCGCCTACGGCGCGCCGCTGTGGCCTGT GAG
Mgm1-up (Herlan et al., 2003)	CCCCGAATTCGAGCTCGCCATGAGTAATTCTACTTCATTAAGG
Opa1Asc1/Bbe1rev	CCCCGGCGCGCCGTAGGCGCCACATGCTTTCAGAGTATTATGGT GAATATGCG
SEQ_Mgm1P_Opa1_fwd_1	CTTTTTGGGTAGTACAGATATC
SEQ_Mgm1P_Opa1_fwd_2	GACAAAGAGAAAATTGACCAAC
SEQ_Mgm1P_Opa1_fwd_3	CCAAAGTAGACCTGGCAGAG
SEQ_Mgm1P_Opa1_fwd_4	TATGGAAGAGGCTCTGCAGG
SEQ_Mgm1P_Opa1_rev_1	CAATACTAATTTTCTCAATTCTTTG
SEQ_Mgm1P_Opa1_rev_2	TTCCCTTTTCCTGTTACAACAG
SEQ_Mgm1P_Opa1_rev_3	ACACACTGTTCTTGGGTCCG
SEQ_Mgm1P_Opa1_rev_4	CTCCTATGTTGTGTGGAATTG

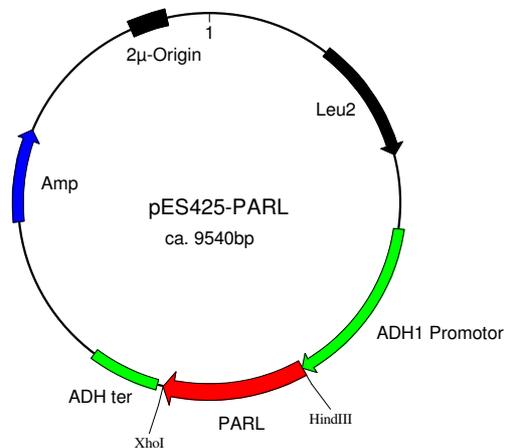
Die Transkriptionsvariante 1 wurde aus dem Konstrukt pcDNA3-Opa1-Sp1 (pers. Mitteilung von Stéphane Duvezin-Caubet) mit den Schnittstellen *XhoI* und *XbaI* umkloniert. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen (RefSeq NM_015560, NM_130833, NM_130836, NM_130837) in der Sequenz-Datenbank von NCBI (National Center of Biotechnology Information) überprüft. pYES2-OPA1 Transkriptionsvariante 8 enthält den bereits beschriebenen Polymorphismus A210V (Yao et al., 2006).

2.1.18.3 pRS314^{ADH1}-Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc

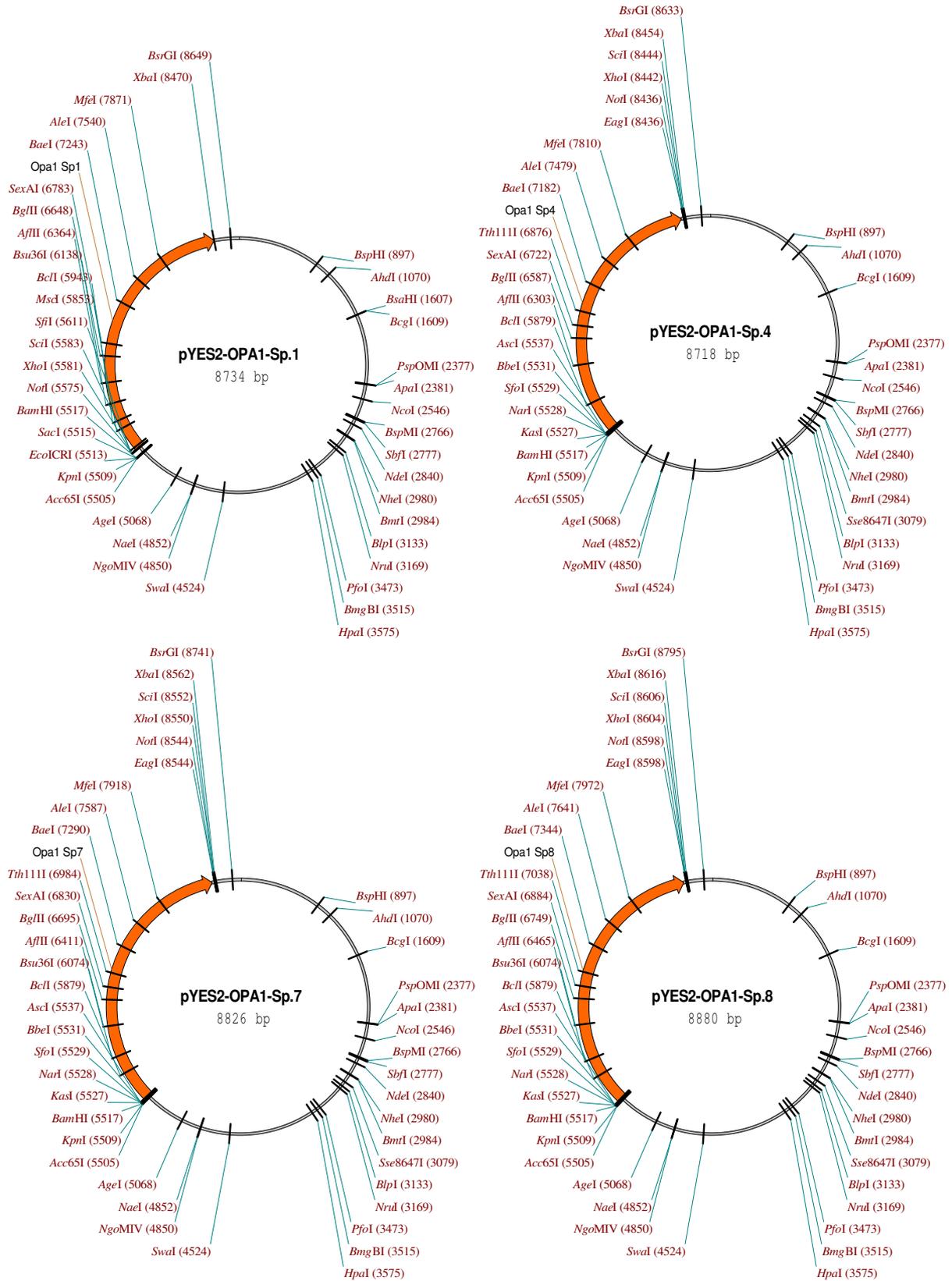
Die kodierende Sequenz des AFG3L2-Hybridproteins, bestehend aus dem mitochondrialen Sortierungssignal von Yta10 (Aminosäuren 1 bis 63), dem menschlichen Protein AFG3L2 (Aminosäuren 36 bis 798) und einem C-terminalen Myc-Tag, wurde zusammen mit dem ADH1-Promotor (Alkoholdehydrogenase) aus dem Konstrukt pRS316^{ADH1}-Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc (*URA3*) (Atorino et al., 2003) mit Hilfe der Schnittstellen *SacI* und *KpnI* in den Vektor pRS314 (*TRP1*) (Sikorski and Hieter, 1989) subkloniert.

2.1.19 Karten der hergestellten Konstrukte

2.1.19.1 pES425-PARL

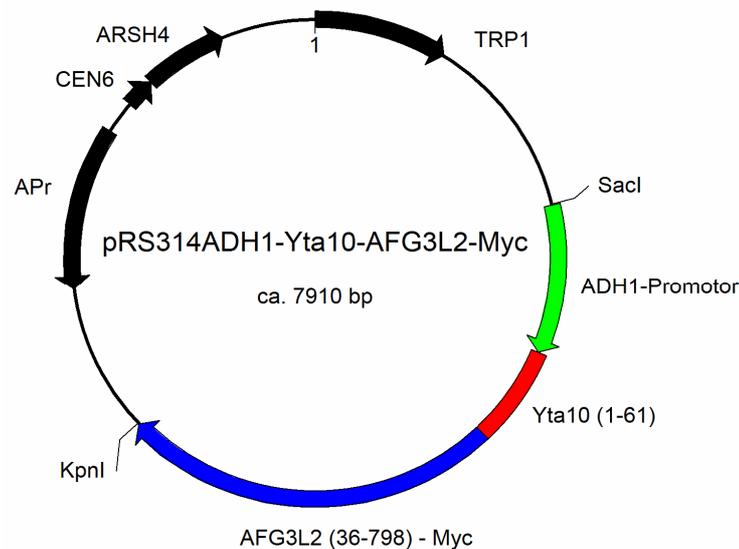


2.1.19.2 pYES2-OPA1 Serie



Einzigartige Restriktionsschnittstellen und OPA1 wurden gekennzeichnet.

2.1.19.3 pRS314^{ADH1}-Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc



2.1.20 Weitere verwendete Konstrukte

2.1.20.1 pRS316^{ADH1}-Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc

Dieses Konstrukt enthält ein AFG3L2-Hybridproteine, das aus dem mitochondrialen Sortierungssignal von Yta10 (Aminosäuren 1 bis 63) und dem menschlichen Protein AFG3L2 (Aminosäuren 36 bis 798) besteht und ein Myc-Tag besitzt. Dem Hybridprotein ist der ADH1-Promotor (Alkoholdehydrogenase) vorgeschaltet (Atorino et al., 2003).

2.1.20.2 pYES2-Pcp1

Zur Expression von Pcp1 unter Kontrolle des GAL1-Promotors wurde das Konstrukt pYES2-Pcp1 verwendet. Dieses Plasmid wurde uns freundlicherweise von Dr. Carsten Bornhövd zur weiteren Verwendung überlassen (Bornhövd, 2006).

2.1.20.3 pVT100U-mtGFP

Dieses Plasmid dient zur Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit GFP. pVT100U-mtGFP verfügt über den konstitutiven ADH1-Promotor (Alkoholdehydrogenase) und hat einen 2 μ Replikationsursprung. mtGFP ist ein Fusionsprotein aus der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der FoF1-ATPase aus *N. crassa* (Aminosäurereste 1-69). Dadurch wird GFP in die mitochondriale Matrix sortiert (Westermann and Neupert, 2000).

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Verwendete und hergestellte Stämme von *S. cerevisiae*

Für das Screening in 3.2.4 wurden Stämme der Firma BioCat (Open Biosystems, USA) verwendet. Als Wildtyp wurde der Stamm BY4742 herangezogen. Zur Bezeichnung der Stämme entsprechend ihrer offenen Leserahmen (Open reading frame / ORF) wurde, soweit verfügbar, durchweg die Nomenklatur der Saccharomyces Genome Database (SGD) verwendet: (name/ORF: YME1/YPR024W, YTA10/YER017C, YTA12/YMR089C, OMA1/YKR087C, IMP1/YMR150C, PIM1/YBL022C, OCT1/YKL134C, MOP112/YDR430C, PRD1/YCL057W, LAP3/YNL239W, APE2/YKL157W, QRI7/YDL104C, DOA4/YDR069C). Die Deletion des offenen Leserahmens YNR020C wurde mit $\Delta atp23$ beschriftet.

Tabelle 2-3. Die verwendeten Hefestämme.

Beschreibung	Name	Hintergrund	Genotyp und Plasmide	Kapitel	Referenz
Wildtyp		W303 α	MAT α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura23-53 can1-100</i>	3.2.5 3.2.6	(Rothstein and Sherman, 1980)
<i>PCP1</i> / Δ <i>pcp1</i>		BY4743	MAT α / α <i>his3</i> Δ 1/ <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0 <i>lys2</i> Δ 0/ <i>LYS2</i> <i>MET15/met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0 <i>pcp1::kanMX4/PCP1</i>	3.1.3	Euroscarf
Δ <i>yta10</i> Δ <i>yta12</i>	YKO100	W303a	MAT α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura23-53 can1-100 yta10::kanMX4 yta12::HIS3</i>	3.2.5 3.2.6	(Atorino et al., 2003)
Δ <i>yta10</i> Δ <i>yta12</i> + humanes Paraplegin + humanes AFG3L2 (<i>URA3</i>)	YKO117	W303a	MAT α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura23-53 can1-100 yta10::kanMX4 yta12::HIS3</i> Ycplac111 ^{ADH1} -Yta10(1-63)-hparaplegin(59-795)-HA (<i>LEU2</i>) pRS316 ^{ADH1} -Yta10(1-61)-AFG3L2(36-798)-Myc (<i>URA3</i>)	3.2.5	(Atorino et al., 2003)

Tabelle 2-4. Die hergestellten Hefestämme.

Beschreibung	Name	Hintergrund	Plasmide	Kapitel
Wildtyp	jw2-1a	Spore von <i>PCP1/Δpcp1</i>		3.1 3.2.2
<i>Δpcp1</i>	jw2-1c	Spore von <i>PCP1/Δpcp1</i>		3.1 3.2.2
<i>Δpcp1 + PARL</i>	jw2-6c	Spore von <i>PCP1/Δpcp1</i>	pES425-PARL (<i>LEU2</i>)	3.1 3.2.2
<i>Δpcp1 + PCP1</i>	jw1-4c	Spore von <i>PCP1/Δpcp1</i>	pYES2-Pcp1 (<i>URA3</i>)	3.1
<i>Δyta10Δyta12</i> + humanes Paraplegin + humanes AFG3L2 (<i>TRP1</i>)	jw8-1	YKO117	Ycplac111 ^{ADH1} -Yta10(1-63)- hparaplegin(59-795)-HA (<i>LEU2</i>) pRS314 ^{ADH1} -Yta10(1-61)- AFG3L2(36-798)-Myc (<i>TRP1</i>)	3.2.5

2.2.2 Methoden der Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefestämmen erfolgte im Wesentlichen nach Standardprotokollen (Guthrie and Fink, 1991). Hefestämme wurden in 15 % (v/v) Glycerinlösung bei -80 °C gelagert. Vor der Überführung in Flüssigkultur wurden sie auf Agarplatten kultiviert. Als Standardmedien dienten YPD oder YPGal (fermentierbare Kohlenstoffquelle) und YPG (nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle) (vgl. 2.6). Bei der Selektion auf Plasmide mit bestimmten Markergenen wurden Selektivmedien mit den gleichen Kohlenstoffquellen verwendet, denen jedoch die entsprechenden Markeraminoacidsäuren oder Markerbasen fehlten. In Flüssigkultur wurden die Stämme bei 140 rpm und 30 °C geschüttelt. Die Glycerinstammkulturen wurden hergestellt, indem 1 ml einer Kultur ($OD_{578} \approx 1$) mit 1 ml sterilem 30 % (v/v) Glycerin gemischt wurden. Alternativ dazu wurden Zellen eines Stammes direkt von einer Agarplatte mit einer Impföse in sterilem 15 % (v/v) Glycerin suspendiert. Anschließend wurden die Glycerinstammkulturen bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Sporulation diploider Hefestämme

Diploide Hefestämme wurden sporuliert, indem sie zunächst auf einer normalen YPD- oder Selektivplatte angezogen wurden. Dann wurden sie auf eine nährstoffarme Sporulationsplatte (1 % (w/v) Kaliumacetat) überimpft, um sie zum Durchlaufen einer Meiose und zur Sporulation anzuregen. Die Sporulationsplatten wurden für 3–6 Tage bei 30 °C inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop

charakteristische Vierergruppen von Sporen, so genannte Tetraden, sichtbar waren. Alle vier Sporen einer Tetrade sind Abkömmlinge derselben diploiden Zelle, besitzen aber jeweils einen haploiden Chromosomensatz.

2.2.4 Tetradendisektion

Um die vier Sporen einer Tetrade zu trennen, wurden zunächst einige Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze von den Sporulationsplatten aufgenommen und in 200 µl sterilem Wasser suspendiert. Durch Zugabe von 5 µl Zymolyase (10 mg/ml) und Inkubation für 3-5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellwände verdaut, ohne sie komplett zu zerstören. Das ermöglicht eine Trennung der vier durch eine gemeinsame Zellwand umschlossenen Sporen einer Tetrade. 50 µl der Suspension wurden auf den Rand einer YPD-Platte aufgebracht. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die vier Sporen einer Tetrade getrennt und in einer Reihe an definierten Positionen auf der Platte abgelegt. Die Platte wurde für 3 Tage bei 30 °C inkubiert und die haploiden Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgingen, auf ihren Phänotyp untersucht.

2.2.5 Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen

Die Analyse des Wachstumsphänotyps erfolgte mit dem so genannten Tüpfel Test. Die Stämme wurden unter Standardbedingungen auf SGal + 0,5% Glukose angezogen. Zellen der Kultur wurden in sterilem Wasser gewaschen und die Zellsuspension auf 1 OD₆₀₀ konzentriert. Von dieser Suspension und aufeinander folgenden fünffachen Verdünnungen (bis 1:3125 bzw. fünf Verdünnungsschritten) wurden jeweils 5 µl in einer Reihe auf eine YPD-, YPGal oder YPG-Platte getropft. Nach zwei (YPD und YPGal) oder drei Tagen (YPG) Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet.

2.2.6 Entfernen von Plasmid-DNA aus Hefestämmen mit 5-FOA

Hefestämme mit Plasmid-DNA, die das *URA3*-Gen enthalten, wurden entsprechend ihres Genotyps auf SD-Platten mit Uracil angezogen. Hierdurch fiel der Selektionsdruck auf das *URA3*-Gen weg und die Hefestämme konnten durch Teilung die Plasmid-DNA verlieren. Nach Inkubation der Platten bei 30 °C für 2 Tage wurden die Hefen mit einem Verdünnungsausstrich auf 5-FOA-Platten überimpft. Zellen, die das *URA3*-Gen enthalten, konvertieren die 5-Fluor-Orotsäure in die giftige Substanz 5-Fluorouridinmonophosphate und werden dadurch am Wachstum gehindert (Boeke et al., 1987; Sikorski and Boeke, 1991). Dagegen konnten diejenigen Zellen wachsen, die das Plasmid mit dem *URA3*-Gen verloren hatten. Die dadurch isolierten Klone wurden vor ihrer weiteren Verwendung erneut auf den korrekten Genotyp mit den entsprechenden Selektivmedien untersucht.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war (Zeiss Plan Neofluar, 100X, numerische Apertur 1,3). Digitale Aufnahmen der untersuchten Zellen wurden mit einer CCD-Kamera (Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA) bei Raumtemperatur gemacht. Mikroskop und Kamera wurden durch die MetaView 3.6a Software gesteuert (Universal Image Corporation, USA). Für die Analyse von GFP wurde Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm) (Heim and Tsien, 1996).

2.3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung mitochondrialer Morphologie

Die zu untersuchenden Stämme wurden zur Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit dem Konstrukt pVT100U-mtGFP transformiert. Die transformierten Hefen wurden in einer Flüssigkultur mit Selektivmedium über mehrere Tage angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase für das Fluoreszenzmikroskop präpariert. In mindestens drei unabhängigen Zählungen je Stamm wurden die Mitochondrien von je 100 Zellen tubulärer oder fragmentierter Morphologie zugeordnet. Die Proben wurden zuvor anonymisiert, um eine Beeinflussung des Zählers auszuschließen.

2.3.2 Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae* durch alkalische Lyse

1-1,5 ml einer Zellsuspension frisch kultivierter Hefen ($OD_{578} \approx 2-4$) wurden für 1 min bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 250 μ l 50 mM Tris/HCl pH 8,0 suspendiert und mit 50 μ l Aufschlusspuffer (1,85 M NaOH; 7,4 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 20 mM PMSF) versetzt (modifiziert nach (Yaffe and Schatz, 1984)). Es wurde gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend die Proteine mit 220 μ l 72 % (w/v) TCA gefällt (vgl. 2.4.1).

2.3.3 Methoden der Kultivierung von Säugetierzellen

Säugetierzellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FBS), 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Das Wachstum der Kultur wurde mit einem Mikroskop überwacht.

Zum Ernten wurden adhärenente Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend durch fünfminütige Inkubation mit Trypsin EDTA (PAA Laboratories, Cölbe) vom Kultivierungsgefäß losgelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde durch

Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt. Säugetierzellen in Lösung wurden bei 300 g für 7 min abzentrifugiert und in frischem Medium oder PBS zur weiteren Verwendung resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl einer Trypanblau-Lösung (0,5% (w/v) in 0,9% (w/v) NaCl) vermischt und in die Zählkammer gegeben. Das Trypanblau dringt in tote Zelle ein, hierdurch können unter dem Mikroskop tote von lebenden Zellen unterschieden werden.

2.3.4 Isolation von Mitochondrien aus HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden entsprechend den in 2.3.3 genannten Methoden kultiviert und geerntet. Die Zellen wurden mit PBS versetzt mit 5 mM EDTA gewaschen und nach Abzentrifugieren in 1 ml RSB-Puffer (10 mM HEPES pH 7,5; 1 mM EDTA; 210 mM Mannitol; 70 mM Saccharose; versetzt mit Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) resuspendiert. Die Zellen wurden durch sechsfache Passage einer 26G (Gauge) Kanüle unter Verwendung einer 5 ml Spritze aufgebrochen und für 10 min bei 2000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in RSB-Puffer resuspendiert und erneut wie beschrieben sechsfach durch die Kanüle passagiert. Dieser Schritte wurde weitere vier male wiederholt. Die Überstände der Zentrifugationen mit 2000 g wurde gesammelt und für 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Das hierbei entstandene Sediment ist reich an Mitochondrien und wurde erneut in RSB-Puffer resuspendiert. Der zytosolische Überstand wurde verworfen.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine wurden durch Zugabe von 72 % (w/v) TCA auf eine Endkonzentration von 12 % (w/v) ausgefällt. Nach mindestens 15 min Inkubation auf Eis wurden die gefällten Proteine für 15 min bei 20000 g und 4 °C abzentrifugiert und einmal mit Aceton (-20 °C) gewaschen. Die Präzipitate wurden bei 37 °C getrocknet und in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen.

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse wurden Proteine durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970). Entsprechend der Größe des Zielproteins und der Auflösung wurden Gelsysteme zwischen 10 % / 0,17 % (w/v) und 16 % / 0,26 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid und einer Laufstrecke zwischen 7 und 13 cm (Schichtdicke 1 mm) verwendet. Im Sammelgel wurden 5 % / 0,08 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben in SDS-Ladepuffer

aufgenommen und, soweit das Zielprotein nicht aggregierte, durch Inkubation bei 95 °C für 5 min denaturiert. Es wurden Probenvolumina zwischen 30-50 µl mit Proteinmengen bis 200 µg pro Spur geladen. Zum Abschätzen der Proteingrößen wurde bei jedem Lauf eine Proteinstandardlösung aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 2,5 Stunden bei 25-30 mA. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten gelöst und für den Transfer auf Nitrozellulose verwendet (vgl. 2.4.3).

Sammelgel: 5 % (w/v) Acrylamid/0,08 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED, 60 mM Tris/HCl pH 6,8

Trenngellösung: 8-16 % (w/v) Acrylamid/0,14-0,26 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,03 % (v/v) TEMED, 375 mM Tris/HCl pH 8,8

Laufpuffer: 380 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,3

2.4.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Halbtrockenverfahren auf Nitrozellulosemembranen geblottet (Towbin et al., 1992). Gel, Nitrozellulosemembran und mehrere Lagen Whatman Filterpapier wurden mit Blot-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS) getränkt. Zwei Bögen des Filterpapiers wurden auf die untere Graphitelektrode (Anode) gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde auf dem getränkten Filterpapier und auf der Membran wiederum das Gel platziert. Das Gel wurde erst mit zwei Lagen Filterpapier und dann mit der oberen Graphitelektrode (Kathode) abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h 30 min bei 200 mA. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen und in Ponceau S-Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) geschwenkt. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen mit entsalztem Wasser entfernt, so dass die gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung spezifischer, gegen OPA1 gerichteter Antiseren wurden chemisch synthetisierte Peptide als Antigene eingesetzt. Für ein polyklonales Antiserum gegen den C-Terminus von OPA1 wurde ein Peptid mit der Sequenz

CDLKKVREIQEKLDAFIEALHQEK - COOH verwendet, die den Aminosäureresten 939-1015 bezogen auf OPA1-Transkriptionsvariante 8 (RefSeq NM_130837) entspricht. Diese Sequenz ist Teil aller beschriebenen OPA1-Transkriptionsvarianten im Menschen und in der Maus. Das Peptid trägt am N-Terminus einen zusätzlichen Cystein-Rest für die Kopplung an eine Affinitätsmatrix. Die Peptidsynthese, die Kopplung des Peptids an Keyhole Limpet Hämocyanin und die Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch die Firma Pineda Antikörperservice (Berlin, Deutschland).

2.5.2 Kopplung synthetischer Peptide an SulfoLink® Coupling Gel (Pierce)

Für die Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern wurden die immunogenen Peptide mit einem zusätzlichen Cysteinrest am N-Terminus synthetisiert. Dieser Cysteinrest wurde für die Kopplung der Peptide an die Affinitätsmatrix genutzt. SulfoLink® Coupling Gel (Pierce) besitzt zu diesem Zweck Iodacetylgruppen, die über einen 12 Atome langen Arm an die Matrix gebunden sind. Eine Säule mit 1 ml Gelbettvolumen an SulfoLink® Coupling Gel wurde mit 6 Säulenvolumina Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 8,5) äquilibriert. 10 mg des zu koppelnden Peptids wurden in 1 ml Bindungspuffer gelöst und das äquilibrierte Säulenmaterial darin suspendiert. Die Kopplung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Kopplungslösung entfernt und die Säule mit 3 Säulenvolumina Kopplungspuffer gewaschen. Um Bindungsstellen abzusättigen, die während der Kopplungsreaktion nicht reagiert haben, wurde das Säulenmaterial nochmals in 1 ml 50 mM Cystein in Kopplungspuffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Lösung abgelassen und die Säule mit 16 Säulenvolumina 1 M NaCl und 16 Säulenvolumina 0,05 % (w/v) Natriumazid gewaschen. Schließlich wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7,6 mit 0,02 % (w/v) Natriumazid gewaschen und in dieser Lösung bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Affinitätssäule mit dem gekoppelten Peptid wurde zunächst nacheinander mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM Glycin/HCl pH 2,5, 10 mM Tris/HCl pH 8,8 und 100 mM NaPi pH 11,5 gewaschen, um eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule wieder mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 äquilibriert. 4 ml des Antiserums wurden mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 und 70 µl 0,2 M PMSF versetzt und bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min mit einer Peristaltikpumpe dreimal über die Säule gepumpt. Es wurde je zweimal mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 und 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 und 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte in drei Schritten bei verschiedenen pH-Werten. Zunächst wurde mit 10 ml 100 mM Citratpuffer pH 4, dann mit 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5 und schließlich mit 10 ml 100 mM NaPi pH 11,5 eluiert. Es wurden

jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt und der pH-Wert schnell mit 1 M Tris-Base (1. und 2. Elution) bzw. 1 M Glycin/HCl pH 2,5 (3. Elution) neutralisiert. Die Proteinkonzentration in den Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt (vgl. 2.4.2). Der Antikörper eluierte in den meisten Fällen in den Fraktionen 2-4 der Glycin/HCl pH 2,5 Elution. Diese Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert. Die Proteinkonzentration betrug in den meisten Fällen zwischen 0,5 und 1 mg/ml. Schließlich wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7,6 mit 0,02 % (w/v) Natriumazid gewaschen und in dieser Lösung bis zur erneuten Benutzung bei 4 °C gelagert.

2.5.4 Immundekoration von Western-Blots

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Proteintransfer bei RT 60 min in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer geschwenkt. Es folgte eine 60-120minütige Immundekoration mit einem spezifischen Antiserum oder einem affinitätsgereinigten Antikörper, das je nach Titer zwischen 1:250 und 1:500 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt war. Danach wurden die Membranen 3 mal 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen gerichtete Antikörper verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war (Ziege anti-Kaninchen-HRP Konjugat, Biorad). Diese Antikörper wurden 1:10 000 (Ziege anti-Kaninchen) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer verdünnt und die Membranen 60 min mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham Biosciences) nachgewiesen. Dafür wurden die beiden Lösungen ECL1 (100 mM Tris/HCl; 0,044 % (w/v) Luminol; 0,0066 % (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5) und ECL2 (100 mM Tris/HCl; 0,024 % (w/v) H₂O₂; pH 8,5) unmittelbar vor der Reaktion im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und zwischen 1 s und 40 min auf Röntgenfilmen (SuperRX, Fuji) exponiert.

2.6 Puffer und Medien

5-FOA-Platten	SD-Medium mit benötigten Auxotrophiemarkern; 1 g/l 5-FOA; 50 mg/l Uracil Endkonzentration
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid; Für LB ^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.
LB-Platten:	LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar; Für LB ^{Amp} -Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml

Ampicillin zugegeben.

S-Medium: 1,7 g/l *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; 2 % (w/v) Glukose (SD), 2 % (w/v) Galaktose (SGal) oder eine Mischung aus 2 % (w/v) Galaktose und 0,5 % (w/v) Glukose (SGal + 0,5 % D);

Auxotrophiemarker:

Adenin 20 mg/l

Uracil 20 mg/l

Histidin 30 mg/l

Leucin 30 mg/l

Lysin 30 mg/l

Methionin 30 mg/l

Tryptophan 30 mg/l

Die Aminosäuren wurden als konzentrierte Stammlösungen (Adenin, Uracil 0,2 g / 100 ml; Histidin, Leucin, Lysin, Methionin, Tryptophan 1 g / 100 ml) separat autoklaviert.

SDS-

Probenauftragspuffer: 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl (Lämmli) pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Sporulationsplatten: 1 % (w/v) Kaliumacetat; 2 % (w/v) Agar

TBS-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid

TE-Puffer: 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8,0

YP-Medium: 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Bacto-Pepton; mit HCl auf pH 5 einstellen; 2 % (w/v) Glukose (YPD); 2 % (w/v) Galaktose (YPGal) oder 2 % (w/v) Glycerin (SG); Glukose, Galaktose und Glycerin wurden als 40 % (w/v) (Glukose und Glycerin) bzw. 30 % (w/v) (Galaktose) konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert.

Für die Herstellung von Kulturplatten für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des entsprechenden Flüssigmediums 2 % (w/v) Agar zugegeben. Flüssigmedium und Agar wurden separat autoklaviert.

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert (München)	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Biosciences (Freiburg)	ECL-Immunoblot-Detektionssystem
ARK-Sigma (Darmstadt)	Oligonukleotide
Biorad (München)	Proteinstandard und Proteinreagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG, Prestained SDS-PAGE Standards
BioCat (Open Biosystems, USA)	Hefestämme (vgl. 2.2.1)
Boehringer (Mannheim)	Desoxynukleosidtriphosphate, <i>Expand</i> PCR-Kit, Ethidiumbromid, Restriktionsenzyme, Tris
Braun (Melsungen)	Kanülen, Spritzen
DIFCO (Detroit, USA)	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, <i>Yeast Nitrogen Base</i>
EUROSCARF (Frankfurt)	Hefestämme (vgl. 2.2.1)
Fuji (Tokyo, Japan)	SuperRX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm
Genomed (Bad Oeynhausen)	Jetstar®-Reagenzien und Säulen zur Plasmidisolierung
Gerbu (Gaiberg)	Acrylamid, Ampicillin
GIBCO-BRL (Eggenstein)	Agarose, T4-DNA-Ligase, Restriktionsenzyme
GL BioTech (Hude)	GL <i>taq</i> PCR-Kit
ICN Pharmaceuticals (Eschwege)	Tris
Invitrogen (Groningen)	DH5 α , Elektroporationsküvetten
Metabion (Martinsried)	Oligonukleotide
Nestlé-Alete (München)	Magermilchpulver
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsenzyme und 10 x Puffer für Restriktionsenzyme
PAA Laboratories (Cölbe)	Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), fetales Kälberserum (FBS), Dulbecco's PBS, Trypsin EDTA
peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)	peqGOLD Proteinmarker, Molekulargewichts-Standard für SDS-PAGE
Pierce (Rockford, USA)	SulfoLink® Coupling Gel
Pineda Antikörper Service (Berlin)	Antikörper gegen C-Terminus von OPA1 (vgl. 2.5.1)
Promega (Heidelberg)	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
Qiagen (Hilden)	QIAquick Gel Extraction Kit®
Riedel de Haen (Seelze)	Kaliumacetat

Sarstedt (Bad Homburg)	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll (Kassel)	Protran Nitrozellulosemembranen BA83, Whatman Filterpapiere, Faltenfilter, Sterilfilter
Seikagaku (Tokyo, Japan)	Zymolyase 20T
Serva (Heidelberg)	Bisacrylamid, Ethanol, Ponceau S, Saccharose (Sucrose), SDS, TEMED
Sigma (München)	Aminosäuren, Ethidiumbromid, Glycerin, Lachsspermien- DNA, β -Mercaptoethanol, PMSF, CCCP, G418

Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.7.2 Geräte

Agarose-Geldokumentation	The Imager© Imaging System, Appligene (Heidelberg)
Autoklav	Varioclav© 400E, H + P Labortechnik (Oberschleißheim)
Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus Christ (Osterode)
CCD-Kamera für Fluoreszenzmikroskop	Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA
Durchlichtscanner und Quantifizierungssoftware	CanonScanLIDE 50, Canon Image Scanner und Software Image Master 1D, Amersham Biosciences (Freiburg)
Elektroporationssystem	Gene Pulser, BioRad
Entwicklermaschine	Gevamatic 60© Agfa-Gevaert (München)
Feinwaagen	Sartorius (Mainz)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Inversmikroskop	Axiinvert 40 CFL, Carl Zeiss Jena GmbH
Kolbenhubpipetten	Abimed (Düsseldorf)
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidorph
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Peristaltische Pumpe	P-1, Amersham Biosciences (Freiburg)
Photometer	Ultraspec 10, GeneQuant pro, Amersham Biosciences (Freiburg) Eppendorf
Quarzküvetten	Hellma
Reinstwasseranlagen	PureLab Plus, USF Deutschland GmbH (Ransbach- Baumbach)

Halbtrocken Blotapparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Software Fluoreszenzmikroskop	MetaView 3.6 a, Universal Image Corporation, USA
Spannungsquellen	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences (Freiburg)
Sterilbank	BDK
Thermocycler	Primus 25/96, MWG Biotech (Ebersberg)
Thermomixer	Thermomixer compact Eppendorf (Hamburg)
Überkopfschüttler	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Vortex-Mixer	Bender und Hobein (München)
Wärmeschränke	Memmert (Hannover)
Zentrifugen	Beckman Instruments: Kühlzentrifuge J2-21 Eppendorf: Tischzentrifuge (5415D) Heraeus Christ: Tischzentrifuge Bactifuge©, Multifuge© 1 Sigma: Kühlzentrifuge 3K30

3 Ergebnisse

3.1 Komplementation der Rhomboidprotease Pcp1 durch PARL

3.1.1 PARL-Transkriptionsvariante 1 hat größere Ähnlichkeit mit Pcp1 als PARL-Transkriptionsvariante 2

Zu Beginn dieser Arbeit war keine menschliche mitochondriale Rhomboidprotease bekannt. Anhand phylogenetischer Untersuchungen konnten menschliche Proteinsequenzen mit Ähnlichkeit zu Pcp1 identifiziert werden. Das menschliche Protein mit größter Homologie zu Pcp1 ist hiernach das Presenilins-Associated Rhomboid-Like Protein (abgekürzt PARL oder PSARL) (Koonin et al., 2003).

Es wurden zwei Transkriptionsvarianten von PARL identifiziert (Transkriptionsvariante 1, RefSeq NM_018622; Transkriptionsvariante 2, RefSeq NM_001037639). Um die konservierten Bereiche zwischen Pcp1 und den Transkriptionsvarianten von PARL zu zeigen, wurde ein Alignment durchgeführt (Abbildung 3-1). Eine zusätzliche N-terminal gelegene Transmembranhelix, wie sie für Pcp1 beschrieben wurde (Bornhövd, 2006), konnte sowohl für PARL-

Pcp1MSGVSSVMLGLRPATRIF	18
PARL Isoform 1	MAWRGWAQRGWGCGQAWGASVGGRSCEELTAVLTPPQLLG	40
PARL Isoform 2	MAWRGWAQRGWGCGQAWGASVGGRSCEELTAVLTPPQLLG	40
Consensus	l p	
Pcp1	FRSNISVSPSRTFVSYIGRSQS.TSILKNAPNLEDNVTNL	57
PARL Isoform 1	RRFNFFIQQKCGFRKAPRKVEPRRSDPGTSGEAYKRSALI	80
PARL Isoform 2	RRFNFFIQQKCGFRKAPRKVEPRRSDPGTSGEAYKRSALI	80
Consensus	r n f s	
	<i>TMH PARL</i>	
Pcp1	QKIIPKRFFSQTSILKSRWKPIFNEETTNRVRLNRFQOY	97
PARL Isoform 1	PPVEETVFYPSYPPIRSLIKPLFFTVGFTGCAFGSAAIWQ	120
PARL Isoform 2	PPVEETVFYPSYPPIRSLIKPLFFTVGFTGCAFGSAAIWQ	120
Consensus	f s kp f	
	<i>TMH Pcp1</i>	
Pcp1	QQQRSGGNPLGSMITLGLSLMAGIYFGSPYLF EHVPPFTY	137
PARL Isoform 1	Y ESLKSRVQSYFDGIKADWLDSIRPQKEGDFRKEINKWWN	160
PARL Isoform 2	Y ESLKSRVQSYFDGIKADWLDSIRPQKEGDFRKEINKWWN	160
Consensus	i l	

	<i>TMH 1</i>	
Pcp1	FKTHPKNLVYALLGINVAVFGLWQLPKCWRFLQKYMLLQK	177
PARL Isoform 1	NLSDGQRTVTGIIAANLVFCLWRVPSLQRTMIRYFTSNP	200
PARL Isoform 2	NLSDGQRTVTGIIAANLVFCLWRVPSLQRTMIRYFTSNP	200
Consensus	v nv vf lw p r y	
	<i>TMH 2</i>	
Pcp1	DYVTSKISIIIGSAFSHQEFWHLGMNMLALWSFGTSLATML	217
PARL Isoform 1	ASKVLCSPMLLSTFSHFSLFHMAANMYVLWSFSSSIVNIL	240
PARL Isoform 2	AS.....	202
Consensus	s fsh h nm lwsf s l	
	<i>TMH 3</i>	
Pcp1	GASNFFSLYMNSAIAAGSLFSLWYPKLRARLAIVGP SLGASG	257
PARL Isoform 1	GQEQFMAVYL.SAGVISNFVSYVGVKATG.RYGPSL GASG	278
PARL Isoform 2SVISNFVSYVGVKATG.RYGPSL GASG	228
Consensus	g f y s s f k a gpslgasg	
	<i>TMH 4</i>	<i>TMH 5</i>
Pcp1	ALFGVLGCFSYLFP.HAKILLFVFPVPGGAWVAFLASVAW	296
PARL Isoform 1	AIMTVLAAVCTKIPEGRLAIIIFLPMFTFTAGNALKAIIAM	318
PARL Isoform 2	AIMTVLAAVCTKIPEGRLAIIIFLPMFTFTAGNALKAIIAM	268
Consensus	a vl p f a a a a	
	<i>TMH 6</i>	
Pcp1	NAAGCALRWGSFDYAAHLGGSMGVLYGWYISKAVEKQRQ	336
PARL Isoform 1	DTAGMILGWKFFDHA AHLGGALFGIYWVTYGHELIWKNRE	358
PARL Isoform 2	DTAGMILGWKFFDHA AHLGGALFGIYWVTYGHELIWKNRE	308
Consensus	ag l w fd aahlgg g y y k r	
Pcp1	RRLQAAGRWF.....	346
PARL Isoform 1	PLVKIWHEIRTNGPKKGGGSK	379
PARL Isoform 2	PLVKIWHEIRTNGPKKGGGSK	329
Consensus		

Abbildung 3-1. Pcp1 und PARL sind konservierte Rhomboidproteasen. Mit Hilfe des Computerprogramms DNAMAN (Lynnon BioSoft) wurde eine Alignment der Aminosäuresequenzen von Pcp1, PARL-Transkriptionsvariante 1 und PARL-Transkriptionsvariante 2 durchgeführt. Die sechs Transmembranhelices (*TMH 1 – 6*) wurden ebenso wie die vorgeschlagenen katalytischen Aminosäuren Serin (S) in *TMH 4* und Histidin (H) in *TMH 6* sowie die konservierten Reste in *TMH 2* hervorgehoben (Koonin et al., 2003). Ebenso wurden die zusätzlichen N-terminal gelegenen Transmembranhelices von Pcp1 (*TMH Pcp1*) und der PARL-Transkriptionsvarianten (*TMH PARL*) hervorgehoben.

Transkriptionsvarianten 1 als auch für PARL-Transkriptionsvarianten 2 mit Hilfe des Computerprogramms TMHMM vorhergesagt werden (Krogh et al., 2001; Sonnhammer et al., 1998). Sowohl Transkriptionsvariante 1 als auch Transkriptionsvariante 2 enthalten wie Pcp1 die mutmaßlich katalytischen Aminosäuren Serin (TMH 4) und Histidin (TMH 6). Die konservierten Reste in der Transmembranhelix 2 sind in Transkriptionsvariante 1 sowie Pcp1 enthalten. Bemerkenswert ist das vollständige Fehlen der Transmembranhelix 2 und die unvollständige Transmembranhelix 3 in Isoform 2, die sonst ebenso wie die bereits genannten katalytischen Aminosäuren und konservierten Reste für Rhomboid-Proteine typisch sind (Koonin et al., 2003). Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente mit Transkriptionsvariante 1 durchgeführt.

3.1.2 PARL enthält ein mitochondriales Sortierungssignal

Auf Grundlage spezieller Eigenschaften mitochondrial lokalisierter Proteine wurden Algorithmen zu deren Vorhersage entwickelt. Diese Algorithmen können mit im Internet verfügbaren Computerprogrammen auf Proteinsequenzen angewendet werden. Da zu Beginn der Arbeit die Lokalisation von PARL unbekannt war, wurde mit Hilfe solcher Computerprogramme Pcp1 und PARL-Transkriptionsvariante 1 untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. In Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Nicht alle Algorithmen sagen für PARL eine mitochondriale Lokalisation vorher. Allerdings trifft dies auch für Pcp1 zu. Lediglich MITOPRED (Guda et al., 2004a; Guda et al., 2004b) gibt für PARL eine Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation von 99,0%. Insgesamt ordnen alle Algorithmen bis auf PSORT II PARL am ehesten dem Mitochondrium zu.

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Algorithmen zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Pcp1 und PARL-Transkriptionsvariante 1.

Algorithmus	Pcp1	PARL- Transkriptionsvariante 1
TargetP (Emanuelsson et al., 2000)	Lokalisation: mitochondrial Verlässlichkeitsklasse: 1 (höchste)	Lokalisation: mitochondrial Verlässlichkeitsklasse: 5 (niedrigste)
MitoProt II (Claros and Vincens, 1996)	Wahrscheinlichkeit des Exports in Mitochondrien: 0.9931	Wahrscheinlichkeit des Exports in Mitochondrien: 0.6033

PSORT II (Nakai and Horton, 1999)	69.6 %: mitochondrial 13.0 %: nuklear 8.7 %: zytoplasmatisch 4.3 %: extrazellulär, einschließlich Zellwand 4.3 %: zytoskeletal	34.8 %: zytoplasmatisch 21.7 %: mitochondrial 17.4 %: nuklear 13.0 %: endoplasmatisches Retikulum 4.3 %: Vesikel des sekretorischen Systems 4.3 %: Golgi 4.3 %: peroxisomal
MITOPRED (Guda et al., 2004a; Guda et al., 2004b)	Nicht mitochondrial	Mitochondrial 99.0%
Predator (Small et al., 2004)	Mitochondrial: 0.54 ER: 0.02 Anderswo: 0.45 Vorhersage: mitochondrial	Mitochondrial: 0.47 ER: 0.01 Anderswo: 0.53 Vorhersage: möglicherweise mitochondrial

3.1.3 Gewinnung von *Δpcp1* Stämmen mit funktionellem PARL

Die mitochondriale Lokalisation sowie die möglicherweise mit Pcp1 vergleichbare funktionelle Aktivität der menschlichen Rhomboidprotease PARL sollte durch Expression in Hefe und Komplementation des Phänotyps der Deletion von *PCP1* untersucht werden. Menschliche RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA transkribiert und die Nukleotidsequenzen der mRNA von PARL-Transkriptionsvariante 1 mit PCR und entsprechenden Primern amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pES425#1 kloniert (siehe auch 2.1.18.1). Das Plasmid pYES2-Pcp1 ermöglicht die Expression von Pcp1 und diente als Kontrolle (Bornhövd, 2006).

Die Fähigkeit von *S. cerevisiae* auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen ist abhängig von *PCP1* (Dimmer et al., 2002). Der entsprechende Wachstumsphänotyp von *Δpcp1* ist auf den irreversiblen Verlust von mtDNA zurückzuführen (Herlan et al., 2003; Sesaki et al., 2003a). Die volle Komplementation und Wiederherstellung eines dem Wildtyp ähnlichen Wachstumsphänotyps ist daher durch einfache Expression von PARL in Mutanten mit homozygoter Deletion von *PCP1* nicht möglich.

Diploide Stämme mit heterozygoter Deletion von *PCP1* (*PCP1/Δpcp1*) wurden mit den Konstrukten pES425-PARL und pYES2-Pcp1 transformiert und sporuliert. Nach Sporulation können durch Dissektion der resultierenden Tetraden (siehe 2.2.3 und 2.2.4) Sporen mit nur einem Chromosomensatz isoliert werden. Zwei der 4 Sporen enthalten folglich bei Verwendung einer heterozygot diploiden *PCP1*-Deletionsmutante eine Deletion von *PCP1*, die zwei anderen entsprechen dem haploiden Wildtyp (Abbildung 3-2). Die Sporen wurden nach Anwachsen auf verschiedene Selektivmedien und auf Medium mit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG) überführt. Zum einen konnte dadurch die Persistenz der Plasmide geprüft werden, zum anderen konnten die Sporen auf den entsprechenden Platten mit Selektivmedium auf ihren Genotyp (KanMX-Kassette, Auxotrophiemarker) untersucht werden (Abbildung 3-2). Durch dieses Verfahren wurden Sporen isoliert, die pYES2-Pcp1, pES425-PARL oder kein Plasmid enthalten. In Tabelle 3-2 sind die in den folgenden Experimenten verwendeten Stämme aufgeführt.

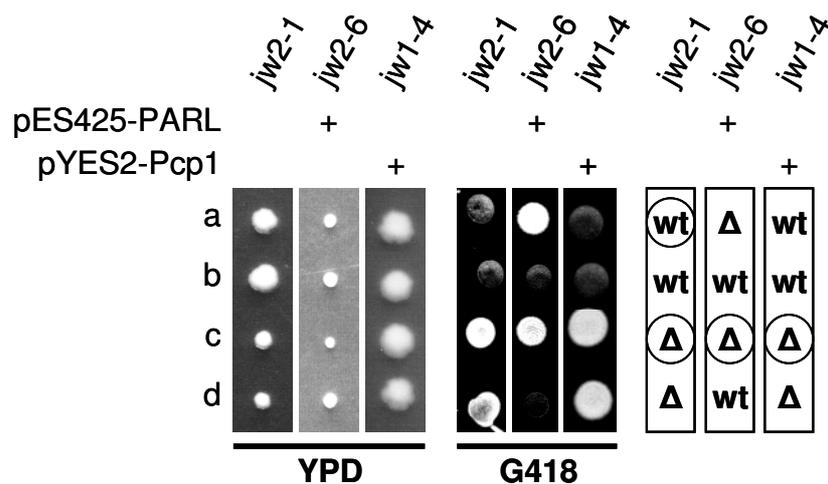


Abbildung 3-2. Tetradenanalyse der erzeugten Hefestämme. Heterozygot diploide Stämme von *PCP1/Δpcp1* wurden mit den Konstrukten pES425-PARL und pYES2-Pcp1 transformiert, sporuliert und die Tetraden auf YPD dissektiert (links). Auf Platten mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) wurden die Sporen auf die Präsenz der zur Deletion von *PCP1* verwendeten KanMX-Kassette geprüft (Mitte) und die Ergebnisse in einer Grafik dargestellt (rechts; wt, haploider Wildtyp; Δ, haploider Stamm mit Deletion von *PCP1*). Die in den folgenden Experimenten verwendeten vier Stämme wurden mit Kreisen markiert.

Tabelle 3-2. Bezeichnungen der hergestellten und in den folgenden Experimenten verwendeten Stämme.

Beschreibung	Name	Plasmide
Wildtyp	jw2-1a	
$\Delta pcp1$	jw2-1c	
$\Delta pcp1 + PARL$	jw2-6c	pES425-PARL
$\Delta pcp1 + PCP1$	jw1-4c	pYES2-Pcp1

Die An- oder Abwesenheit von Pcp1 wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Hierzu wurden die in den weiteren Experimenten verwendeten Stämme (Tabelle 3-2) auf Selektivmedium (SGal + 0,5% Glukose) mit oder ohne die entsprechenden Auxotrophiemarker (Leu, Ura) angezogen. Der Gesamtzellextrakt wurde mit SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Pcp1 analysiert (Abbildung 3-3). Sowohl in $\Delta pcp1$ als auch in $\Delta pcp1 + PARL$ war Pcp1 nicht nachweisbar. Im Verhältnis zum Wildtyp war in $\Delta pcp1 + PCP1$ eine erhöhte Expression von Pcp1 nachweisbar. Dies bestätigte die der genotypischen Zuordnung der jeweiligen Stämme.

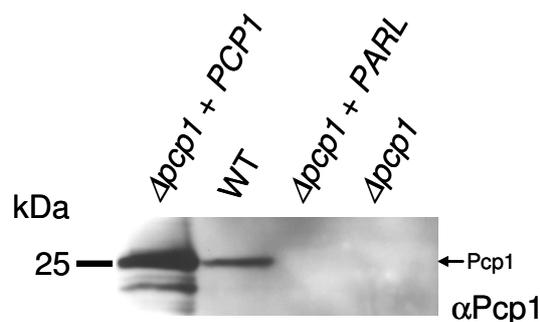


Abbildung 3-3. Überprüfung der Expression von PCP1. Zellextrakte von $\Delta pcp1 + PCP1$, Wildtyp (WT), $\Delta pcp1 + PARL$ und $\Delta pcp1$ wurden nach SDS-PAGE (16%) und Western-Blot mittels Antikörpern gegen Pcp1 auf dessen Expression untersucht.

3.1.4 Die Expression von PARL kann den Wachstumsphänotyp der PCP1-Deletion komplementieren

Um das Wachstumsverhalten von $\Delta pcp1 + PARL$ zu untersuchen, wurde ein Wachstumstest mit den in Tabelle 3-2 aufgeführten Stämmen durchgeführt (Abbildung 3-4). Zur Kontrolle wurde des Weiteren die Spore $\Delta pcp1 + PARL$ (jw2-6c)

mit den übrigen Sporen der Tetrade *fw2-6* verglichen (Abbildung 3-5). Die Hefen wurden zuvor auf Selektivmedien (SGal + 0,5% Glukose mit und ohne die entsprechenden Auxotrophiemarker Leucin bzw. Uracil) angezogen und in fünffachen Verdünnungsschritten auf Platten mit drei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Glukose, Glycerin und Galaktose) aufgetragen (siehe auch 2.2.5).

Sowohl $\Delta pcp1 + PARL$ und $\Delta pcp1 + PCP1$ zeigten ein Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Die Wachstumsgeschwindigkeit von $\Delta pcp1$ war auf YPD und YPGal deutlich vermindert. Auf YPG zeigte $\Delta pcp1$ wie erwartet kein Wachstum, da die Hefe die Fähigkeit, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen, verloren hat. Die Expression von PARL im Wildtyp führte zu einem Wildtyp-ähnlichen Wachstumsverhalten. Demnach komplementiert PARL den Wachstumsdefekt der *PCP1*-Deletion auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen und ermöglicht ein Wildtyp-ähnliches Wachstumsverhalten. Des Weiteren hat PARL auch keinen dominant negativen Einfluss im Wildtyp-Hintergrund.

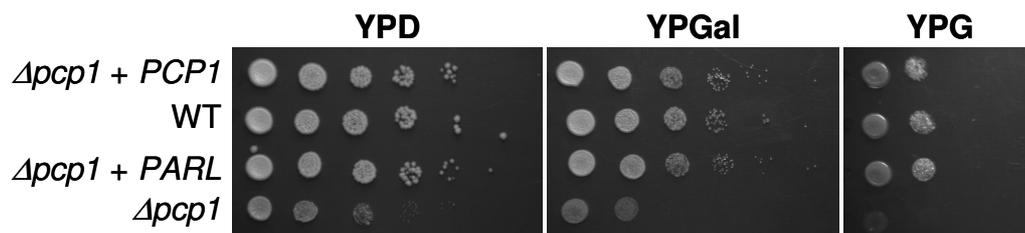


Abbildung 3-4. PARL komplementiert den Wachstumsphänotyp von $\Delta pcp1$. Mit $\Delta pcp1 + PCP1$, Wildtyp (WT), $\Delta pcp1 + PARL$ und $\Delta pcp1 + PCP1$ wurde ein Wachstumstest auf Platten mit Glukose (YPD), Galaktose (YPGal) oder Glycerin (YPG) als Kohlenstoffquelle durchgeführt.

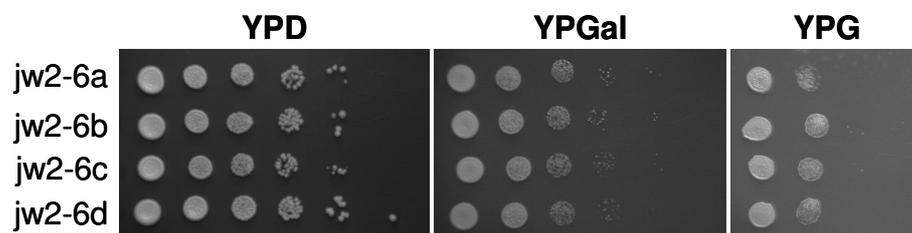


Abbildung 3-5. PARL hat keinen dominant negativen Einfluss im Wildtyphintergrund. Die in Abbildung 3-2 gezeigten Sporen der Tetrade *fw2-6* (b und d entsprechen *PCP1 + PARL*, a und c entsprechen $\Delta pcp1 + PARL$) wurde auf ihr Wachstumsverhalten auf Platten mit Glukose (YPD), Galaktose (YPGal) oder Glycerin (YPG) als Kohlenstoffquelle untersucht.

3.1.5 Mgm1 wird durch PARL proteolytisch prozessiert

In *S. cerevisiae* entstehen aus dem Vorstufenprotein von Mgm1 nach Prozessierung durch MPP lange Isoform I-Mgm1 und nach weiterer Prozessierung durch Pcp1 die kurze Isoform s-Mgm1 (siehe auch 1.1.5.1) (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003a).

Die Prozessierung von Mgm1 durch PARL wurde untersucht, indem die Stämme $\Delta pcp1$, $\Delta pcp1 + PARL$, $\Delta pcp1 + PCP1$ und Wildtyp auf SGal + 0,5% Glukose mit und ohne die entsprechenden Auxotrophiemarker (Leu, Ura) angezogen wurden. Aus diesen Hefen wurde Gesamtzellextrakt gewonnen, der durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen den C-Terminus von Mgm1 untersucht wurde (Abbildung 3-6).

In Wildtyp und in $\Delta pcp1 + PCP1$ zeigte sich die erwartete Bildung von s-Mgm1 und I-Mgm1. In $\Delta pcp1$ fand sich I-Mgm1 aber kein s-Mgm1; die untere Bande (f) in $\Delta pcp1$ ist ein unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1 (Herlan et al., 2003). Auch in $\Delta pcp1 + PARL$ wurde die Bildung von s-Mgm1 beobachtet. Möglicherweise war die proteolytische Effizienz von PARL etwas geringer, da im Gegensatz zu Wildtyp und $\Delta pcp1 + PCP1$ das Verhältnis zur längeren Isoform I-Mgm1 verschoben war. Insgesamt ist demnach PARL jedoch in Hefemitochondrien proteolytisch aktiv.

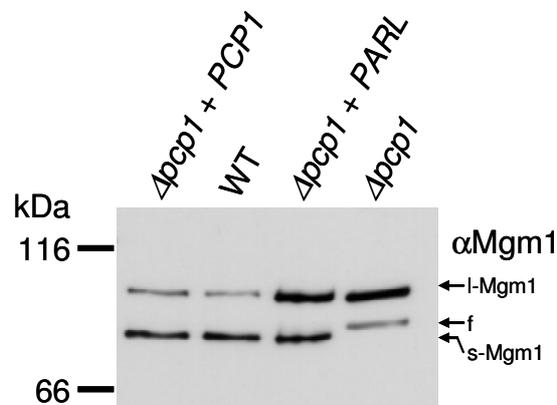


Abbildung 3-6. Mgm1 kann durch PARL proteolytisch prozessiert werden. Zellextrakt von $\Delta pcp1 + PCP1$, Wildtyp (WT), $\Delta pcp1 + PARL$ und $\Delta pcp1$ wurden nach SDS-PAGE (10%), Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Die kurze Isoform von Mgm1 (s-Mgm1), die lange Isoform von Mgm1 (I-Mgm1) und ein unspezifisches Abbauprodukt (f) wurden gekennzeichnet.

3.1.6 Ccp1 wird durch PARL proteolytisch prozessiert

Ob auch das zweite bekannte Substrat von Pcp1, die Cytochrom c-Peroxidase (Ccp1), von PARL prozessiert wird, wurde als nächstes untersucht. Hierfür wurden $\Delta pcp1$, $\Delta pcp1 + PARL$, $\Delta pcp1 + PCP1$ und Wildtyp angezogen. Gesamtzellextrakt wurde nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Ccp1 analysiert (Abbildung 3-7). Zur Kontrolle wurde das mitochondriale

Matrixprotein Mge1 dekoriert (Abbildung 3-7).

Sowohl $\Delta pcp1 + PARL$ als auch $\Delta pcp1 + PCP1$ bildeten die im Wildtyp sichtbare reife Form von Ccp1 (mCcp1). $\Delta pcp1 + pYES2-Pcp1$ zeigte die gleiche Effizienz von Pcp1 wie im Wildtyp. In dem mit PARL komplementierten Stamm wurde Ccp1 effizient in die reife Form (mCcp1) prozessiert, auch wenn das Signal etwas schwächer war als im Wildtyp. In $\Delta pcp1$ wurde Ccp1 nicht oder nahezu nicht sichtbar in seine reife Form umgesetzt.

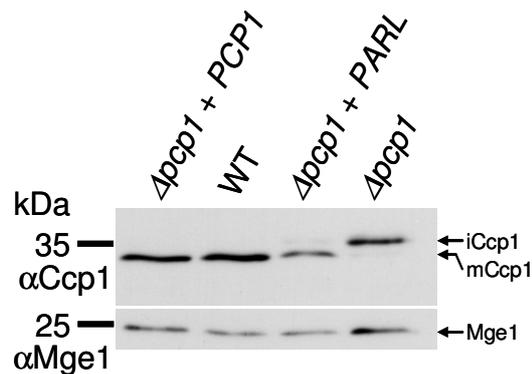


Abbildung 3-7. Ccp1 kann durch PARL proteolytisch prozessiert werden. Zellextrakte von $\Delta pcp1 + PCP1$, Wildtyp (WT), $\Delta pcp1 + PARL$ und $\Delta pcp1$ wurden nach SDS-PAGE (16%), Western-Blot und Immundekoration mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Die intermediäre Form von Ccp1 (iCcp1), die reife Form von Ccp1 (mCcp1) sowie die Kontrolle Mge1 wurden gekennzeichnet.

3.1.7 Die Expression von PARL komplementiert den mitochondrialen Phänotyp der *PCP1*-Deletion

Um zu untersuchen, inwieweit PARL auch den Phänotyp der mitochondrialen Morphologie der *PCP1*-Deletion komplementieren kann, wurden $\Delta pcp1$, $\Delta pcp1 + PARL$ und Wildtyp mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP transformiert. Dieses Plasmid führt in der Hefe zur Expression eines Fusionsproteins, das eine mitochondriale Sortierungssequenz mit GFP (Green Fluorescent Protein) enthält, wodurch die Mitochondrien unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden (siehe auch 2.1.20.3) (Westermann and Neupert, 2000).

Die Stämme wurden auf Selektivmedium angezogen (SGal + 0,5% Glukose mit und ohne die entsprechenden Auxotrophiemarker Leucin bzw. Uracil) und die mitochondriale Morphologie mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops quantitativ ausgewertet (siehe auch 2.3.1).

Anhand der mitochondrialen Morphologie konnte $\Delta pcp1 + PARL$ vom Wildtyp nicht unterschieden werden. $\Delta pcp1$ wies dagegen deutlich mehr fragmentierte Mitochondrien auf (Tabelle 3-3 und Abbildung 3-8). Abbildung 3-9 zeigt repräsentative Bilder tubulärer und fragmentierter Morphologie in den untersuchten Hefen. Zusammenfassend kann also von einer vollen Komplementation des Phänotyps der *PCP1*-Deletion durch PARL ausgegangen werden.

Tabelle 3-3. Quantitative Auswertung der mitochondrialen Morphologie. In mindestens drei unabhängigen Zählungen von je 100 Zellen der angegebenen Stämme wurden der Anteil der Zellen mit tubulärer mitochondrialer Morphologie sowie die Standardabweichung (\pm) bestimmt.

Zellen mit tubulärem mitochondrialem Netzwerk (% aller Zellen)	
Wildtyp	81,5 \pm 6,6
$\Delta pcp1$	37 \pm 9,5
$\Delta pcp1 + PARL$	77,3 \pm 3,8

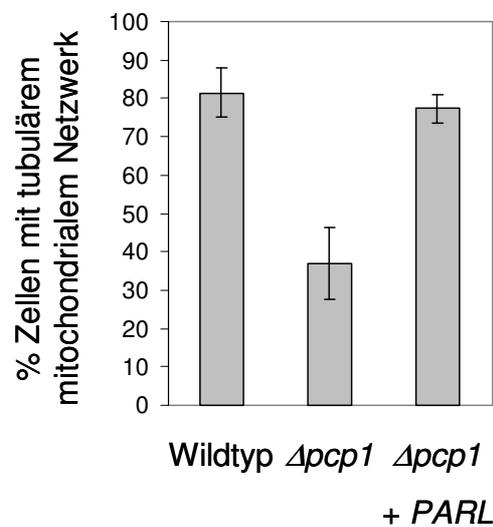


Abbildung 3-8. Die Expression von PARL komplementiert den mitochondrialen Phänotyp von $\Delta pcp1$. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der mitochondrialen Morphologie wurden in einer Grafik dargestellt. Die Standardabweichungen wurden mit Fehlerbalken visualisiert.

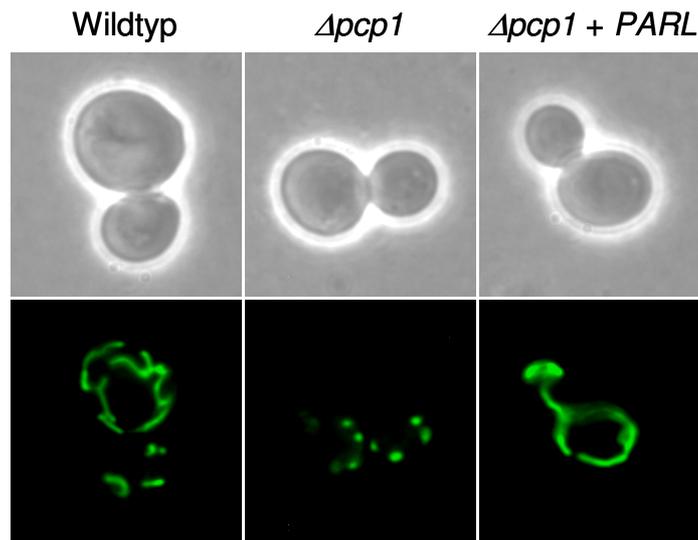


Abbildung 3-9. Repräsentative Phasenkontrastbilder (oben) und Fluoreszenzbilder (unten) der angezeigten Stämme. Die Mitochondrien wurden durch Expression von GFP visualisiert, welches mit Hilfe eines mitochondrialen Sortierungssignals in die Matrix dirigiert wurde (Westermann and Neupert, 2000).

3.2 Prozessierung von OPA1

Mitochondrien der menschlichen Zelllinie HeLa zeigten nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen den C-Terminus von OPA1 ein Muster mit fünf Banden (Abbildung 3-10).

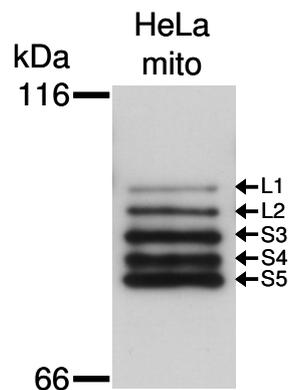


Abbildung 3-10. In Mitochondrien der menschlichen Zelllinie HeLa sind fünf OPA1-Proteinisoformen nachweisbar. Mitochondrien der Zelllinie HeLa wurden mit SDS-PAGE (10%) und Western-Blot analysiert. Nach Immundekoration mit Antikörpern gegen den C-Terminus von OPA1 lassen sich fünf Proteinisoformen nachweisen, die mit L1, L2, S3, S4 und S5 bezeichnet werden.

3.2.1 Proteolytische Prozessierung verschiedener OPA1-Transkriptionsvarianten in Hefe

Inwieweit die fünf Proteinisoformen auf alternatives Spleißen oder Proteolyse zurückzuführen sind, sollte durch Expression einzelner Transkriptionsvarianten in Hefe geklärt werden.

Aus menschlicher RNA wurde durch reverse Transkription cDNA gewonnen. Die Nukleotidsequenzen der mRNA von OPA1 wurden unter Verwendung spezifischer Primer durch PCR amplifiziert und die Transkriptionsvarianten 1, 4, 7 und 8 isoliert. Als Expressionsvektor wurde das Konstrukt pYES2 gewählt, das einen durch Galaktose induzierbaren Promotor besitzt und aufgrund seines 2 μ -Origin zur episomalen Replikation in *S. cerevisiae* befähigt ist (siehe auch 2.1.17.1 und 2.1.18.2). Die OPA1-Expressionskonstrukte wurden in Wildtyp (W303 α , siehe auch 2.2.1) transformiert und auf Selektivmedium (SGal + 0,5% Glukose ohne Uracil) angezogen. Der Gesamtzellextrakt wurde zusammen mit aus HeLa-Zellen isolierten Mitochondrien (siehe 2.3.4) durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen den C-Terminus von OPA1 analysiert (Abbildung 3-11). Die Verwendung von Antikörpern gegen den C-Terminus von OPA1 (im Folgenden als „Antikörper gegen OPA1“ bezeichnet) ermöglichte den spezifischen Nachweis einer N-terminalen proteolytischen Prozessierung.

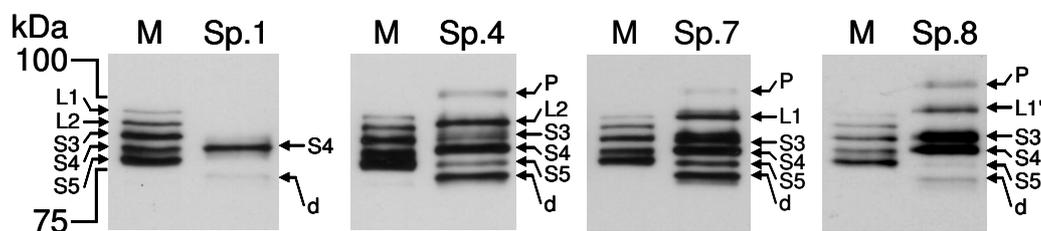


Abbildung 3-11. Die Expression einzelner OPA1-Transkriptionsvarianten in *S. cerevisiae* führt zur Bildung mehrerer Proteinisoformen. OPA1-Transkriptionsvariante (Sp.) 1, 4, 7 oder 8 wurden in Wildtyphefen exprimiert. Gesamtzellextrakt und aus HeLa-Zellen isolierte Mitochondrien (M) wurden nach SDS-PAGE (10%), Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert. Die Banden wurden entsprechend ihrer Größe analog zu den OPA1-Proteinisoformen in HeLa-Zellen beschriftet (L1, L2, S3, S4 und S5). L1' entspricht von der Größe am ehesten L1, läuft aber geringfügig höher. Das Vorstufenprotein (P) und ein hefespezifisches Abbauprodukt (d) wurden ebenfalls gekennzeichnet.

Jede Transkriptionsvariante führt zu verschiedenen OPA1-Isoformen, die identische Größen zu den Isoformen in HeLa-Mitochondrien aufweisen (Abbildung 3-11). Es fanden sich zum Beispiel in den Zellextrakten der Hefen mit Transkriptionsvariante 7 Banden, die exakt auf Höhe von L1, S3, S4 und S5 liefen.

Dies legt nahe, dass Transkriptionsvariante 7 alleine diese Banden durch limitierte Proteolyse bedingen kann. Ebenso fanden sich S3, S4 und S5 unter den proteolytischen Produkten von Transkriptionsvarianten 4 und 8. Eine längere Isoform mit einem Molekulargewicht, das nahezu aber nicht exakt dem von L1 entsprach, wurden als L1' bezeichnet. Eine zusätzliche größere Bande wurde in den Hefen mit den Transkriptionsvarianten 4, 7 und 8 beobachtet. Diese entspricht vermutlich dem Vorläuferprotein, das aufgrund der Überexpression akkumuliert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die verschiedenen Transkriptionsvarianten von OPA1 im Hefesystem auf eine ähnliche Weise wie in Säugetieren prozessiert werden.

3.2.2 Pcp1 und PARL haben keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 in der Hefe

Da OPA1 in der Hefe einer ähnlichen Prozessierung wie in menschlichen Zellen unterliegt, sollte der Einfluss der mitochondrialen Rhomboidproteasen Pcp1 und PARL darauf untersucht werden. Dafür eigneten sich Hefestämme mit und ohne Deletion von *PCP1* und der bereits beschriebenen Hefestamm, in dem Pcp1 durch PARL funktionell ersetzt wurde.

Δpcp1 + PARL, *Δpcp1* und Wildtyp (jw2-1a; siehe auch Tabelle 2-3) wurden mit den Konstrukten der Serie pYES2-OPA1 transformiert und angezogen. Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert (Abbildung 3-12).

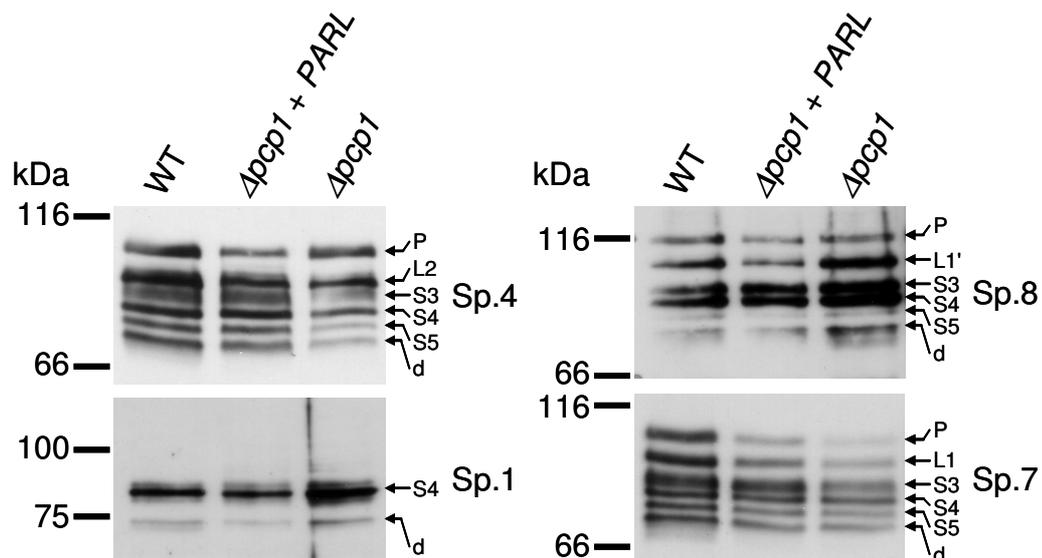


Abbildung 3-12. Die mitochondrialen Rhomboidproteasen Pcp1 und PARL haben keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 in der Hefe. Aus Wildtyp (WT), *Δpcp1 + PARL* und *Δpcp1*, die zugleich die OPA1-Transkriptionsvariante (Sp.) 1, 4, 7 oder 8 exprimieren, wurden Gesamtzellextrakt gewonnen und nach SDS-PAGE (10%), Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert.

Die OPA1-Muster der untersuchten Transkriptionsvarianten 1, 4, 7 und 8 waren in den Hefestämmen unabhängig von der Expression von Pcp1 oder PARL (Abbildung 3-12). Im Hefesystem wurde die proteolytische Prozessierung der untersuchten OPA1-Transkriptionsvarianten weder durch die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 noch durch dessen funktionell aktiven menschlichen Ortholog PARL beeinflusst.

3.2.3 PARL hat in Säugetierzellen keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss von PARL auf die proteolytische Prozessierung von OPA1 in Säugetierzellen untersucht werden. Hierzu wurden embryonale Fibroblasten einer kürzlich vorgestellten *PARL*^{-/-}-Maus (Cipolat et al., 2006) herangezogen. Zum Vergleich dienten embryonale Fibroblasten der entsprechenden Wildtyp-Maus (*PARL*^{+/+}). Bereits zuvor konnte im Rahmen dieser Arbeit und in einer anderen Studie durch Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials mit Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) proteolytische Prozessierung von den langen OPA1-Isoformen zu den kurzen induziert werden (Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Durch Behandlung der *PARL*^{-/-}-Zellen mit CCCP sollte der Einfluss von PARL auf die durch Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials induzierbare Proteolyse überprüft werden (Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006).

Murine Wildtyp- und *PARL*^{-/-}-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stéphane Duvezin-Caubet kultiviert und schließlich über 30 Minuten mit 20 µM CCCP behandelt oder nicht behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, ein Gesamtzellextrakt gewonnen und dieser zusammen mit aus HeLa-Zellen isolierten Mitochondrien mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration von OPA1 analysiert.

Die in HeLa-Mitochondrien zu beobachtenden OPA1-Proteinisofomen L1, L2, S3, S4 und S5 waren auch in embryonalen Fibroblasten der Maus nachweisbar. Sowohl murine Wildtyp- als auch *PARL*^{-/-}-Zellen wiesen ein identisches OPA1-Muster auf. Die Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials induzierte sowohl in Wildtyp- als auch in *PARL*^{-/-}-Zellen gleichermaßen eine proteolytische Prozessierung von OPA1.

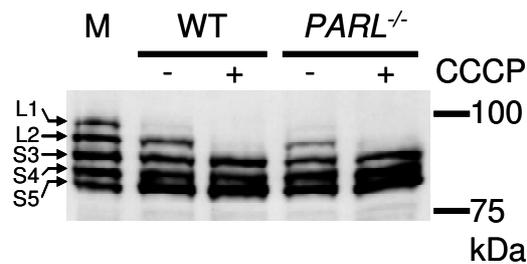


Abbildung 3-13. Die Biogenese und die induzierbare Proteolyse von OPA1 ist in murinen Zellen unabhängig von PARL. Kultivierte murine embryonale Fibroblasten von Wildtyp (WT) und *PARL*^{-/-} wurden 30 Minuten mit 20 μM CCCP behandelt (+) oder nicht behandelt (-). Gesamtzellextrakt sowie HeLa-Mitochondrien (M) zum Vergleich wurden nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert.

3.2.4 Die Prozessierung von OPA1 ist in der Hefe abhängig von der mitochondrialen *m*-AAA-Protease

Obwohl OPA1 sowohl in der Hefe als auch in Säugetierzellen einer proteolytischen Prozessierung unterliegt, scheint diese unabhängig von der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1 beziehungsweise PARL zu sein. Zur Identifizierung der für die Prozessierung in Hefe verantwortlichen Protease wurden verschiedene lebensfähige Deletionsmutanten bekannter oder mutmaßlicher mitochondrialer Proteasen untersucht.

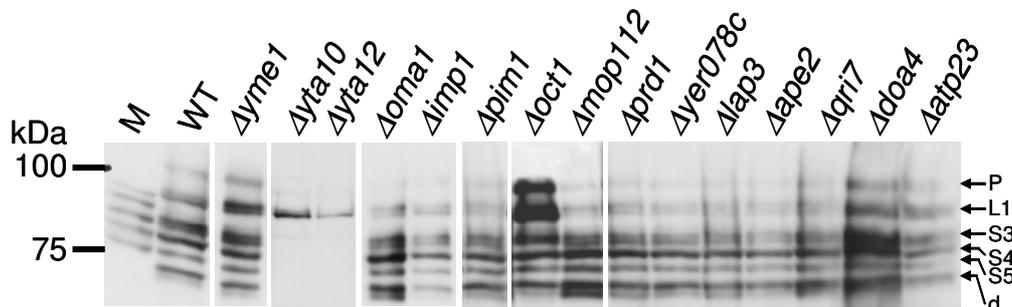


Abbildung 3-14. Die Prozessierung von OPA1 ist in der Hefe abhängig von den Untereinheiten der *m*-AAA-Protease. In Wildtyp (WT) und in den angegebenen Stämmen mit Deletion bekannter oder mutmaßlicher mitochondrialer Proteasen wurde OPA1-Transkriptionsvariante 7 exprimiert. Gesamtzellextrakt wurde zusammen mit aus HeLa-Zellen isolierten Mitochondrien (M) mit SDS-PAGE (10%), Western-Blot und anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Michael Zick). Ein mit dem Wildtyp vergleichbares OPA1-Muster konnte in allen untersuchten Stämmen bis auf *Δyta10* und *Δyta12* beobachtet werden.

Die für das Screening in Frage kommende mitochondriale Proteasen wurden mit Hilfe der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (Cherry et al., 1997) anhand einer entsprechenden Annotation identifiziert. Die Deletionsstämme wurden in Zusammenarbeit mit Michael Zick mit pYES2-OPA1-Sp.7 transformiert und auf Selektivmedium (SGal + 0,5% Glukose ohne Uracil) angezogen. Gesamtzellextrakte wurden neben aus HeLa-Zellen isolierten Mitochondrien mit SDS-PAGE, Western-

Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 ausgewertet (Abbildung 3-14, mit freundlicher Genehmigung von Michael Zick). Als Wildtyp wurde der Stamm BY4742 verwendet. Zur Bezeichnung der Stämme wurde, soweit verfügbar, durchweg die Nomenklatur der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) verwendet (siehe auch 2.2.1).

Die kurzen Proteinisoformen S3, S4 und S5 akkumulierten nicht in Zellen, denen eine der Untereinheiten Yta10 oder Yta12 der mitochondrialen *m*-AAA-Protease fehlte (Abbildung 3-14) (Arnold and Langer, 2002; Escobar-Henriques and Langer, 2006; Rugarli and Langer, 2006). In den übrigen untersuchten Deletionsstämmen führte die Expression der Transkriptionsvariante 7 zu den im Wildtyp beobachteten Isoformen. Die verstärkte Akkumulation der Proteinisoformen P und L1 in $\Delta oct1$ ist ungeklärt, könnte aber auf den beschriebenen Importdefekt dieser Mutante zurückzuführen sein (Isaya et al., 1994).

3.2.5 Die menschliche mitochondriale *m*-AAA-Protease kann OPA1 in der Hefe prozessieren

Die Untereinheiten der *m*-AAA-Protease des Menschen sind Paraplegin und AFG3L2 (siehe auch 1.1.4) (Arnold and Langer, 2002; Escobar-Henriques and Langer, 2006; Rugarli and Langer, 2006). Eine Koexpression der Untereinheiten in Hefe kann die Deletion von *YTA10* und *YTA12* funktionell komplementieren (Atorino et al., 2003). Mit Hilfe dieser Expressionskonstrukte sollte die Prozessierung von OPA1 durch die menschliche *m*-AAA-Protease in Hefe rekonstituiert werden.

Die Stämme $\Delta yta10\Delta yta12$ und $\Delta yta10\Delta yta12$ + humanes Paraplegin + humanes AFG3L2 wurden mit den Konstrukten der Serie pYES2-OPA1 zur Expression der Transkriptionsvariante 1, 4, 7 oder 8 transformiert und zusammen mit den Wildtypstämmen aus 3.2.1 auf Selektivmedium angezogen. Gesamtzellextrakte wurden gewonnen und zusammen mit aus HeLa-Zellen isolierten Mitochondrien nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert (Abbildung 3-15). Die proteolytische Aktivität der rekonstituierten *m*-AAA-Protease wurde nach einer weiteren SDS-PAGE (16%) der Gesamtzellextrakte und Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Ccp1 überprüft. Die Dekoration mit Antikörpern gegen Mge1 diente als Mengenkontrolle (Abbildung 3-16).

Bei Fehlen der menschlichen *m*-AAA-Protease in $\Delta yta10\Delta yta12$ wurden die kurzen Formen (S3, S4, S5) nicht oder nur in äußerst geringen Maße gebildet und die langen OPA1-Isoformen (L1, L1', L2) und das Vorläuferprotein (P) akkumulierten. Die kleinen OPA1-Isoformen S3 und S4 konnten bei Präsenz der menschlichen *m*-AAA-Protease in $\Delta yta10\Delta yta12$ gebildet werden. Hingegen fanden sich die im Wildtyp sichtbare kurze Isoform S5 oder das Abbauprodukt (d) nicht.

Wie bereits in einer anderen Studie beschrieben wurde, wird durch Expression der menschlichen *m*-AAA-Protease in $\Delta yta10\Delta yta12$ die Prozessierung des

Vorstufenproteins von Ccp1 zur reifen Form (mCcp1) ermöglicht (Atorino et al., 2003) (Abbildung 3-16). Im Gegensatz zum Wildtyp ist im komplementierten Stamm das Vorstufenprotein zwar weiterhin nachweisbar, aber dies ist vermutlich lediglich auf eine reduzierte Aktivität der menschlichen *m*-AAA-Protease im Hefesystem zurückzuführen. In $\Delta yta10\Delta yta12$ ist die Bildung der reifen Form von Ccp1 und eines Abbauprodukts nur in sehr geringem Maße zu beobachten..

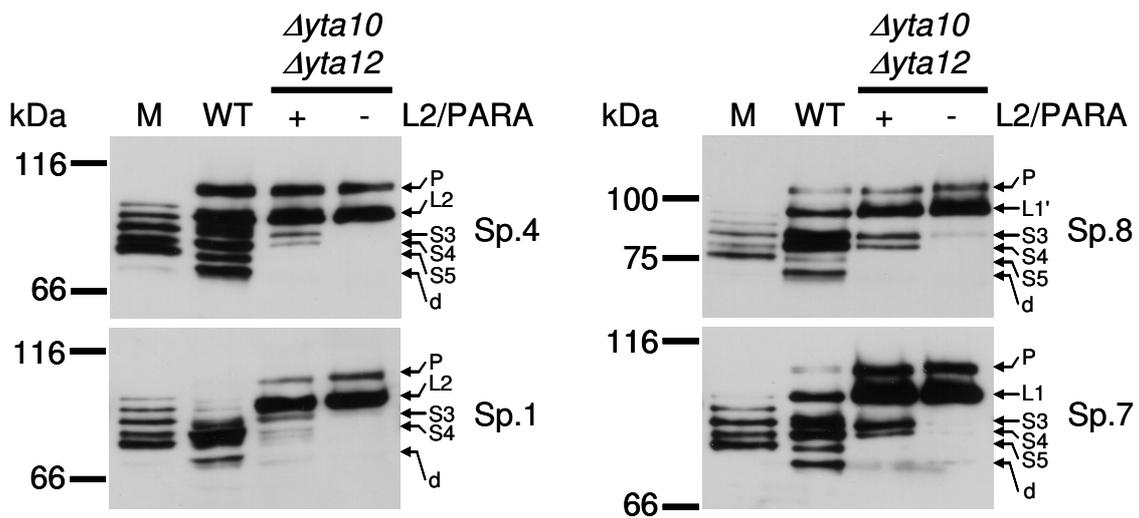


Abbildung 3-15. OPA1 wird durch die menschliche *m*-AAA-Protease prozessiert. In Wildtyp (WT), $\Delta yta10\Delta yta12$ und $\Delta yta10\Delta yta12$ komplementiert mit den menschlichen Orthologen AFG3L2 und Paraplegin (L2/PARA) wurden die OPA1-Transkriptionsvarianten (Sp.) 1, 4, 7 oder 8 exprimiert. Gesamtzellextrakt wurde neben HeLa-Mitochondrien (M) nach SDS-PAGE (10%), Western-Blot und Immundekoration gegen OPA1 analysiert.

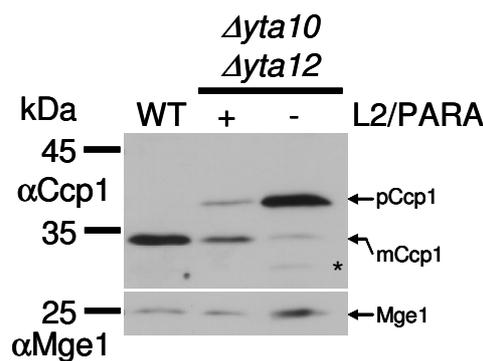


Abbildung 3-16. Die proteolytische Effizienz der *m*-AAA-Protease ist im komplementierten Stamm im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Gesamtzellextrakt von Wildtyp (WT) und $\Delta yta10\Delta yta12$ und $\Delta yta10\Delta yta12$ komplementiert mit den menschlichen Orthologen AFG3L2 und Paraplegin (L2/PARA) wurde nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die intermediäre Form von Ccp1 (iCcp1), die reife Form von Ccp1 (mCcp1) sowie Mge1 wurden gekennzeichnet. Eine weitere Bande geringer Intensität in $\Delta yta10\Delta yta12$ wurde mit einem Stern (*) markiert.

Insgesamt ist demnach die menschliche *m*-AAA-Protease in der Hefe proteolytisch aktiv und in der Lage, die kurzen Proteinisoformen S3 und S4 zu erzeugen. Die entstandenen Isoformen entsprechen denen, die auch in menschlichen Zellen entstehen. Somit wurde die Prozessierung von OPA1 erfolgreich in Hefe rekonstituiert.

3.2.6 Überexpression von PARL hat keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 in $\Delta yta10\Delta yta12$

Ein Einfluss der menschlichen mitochondrialen Rhomboidprotease PARL auf die Prozessierung von OPA1 in Stämmen mit Deletion der *m*-AAA-Protease ($\Delta yta10\Delta yta12$) wurde untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden OPA1-Transkriptionsvarianten 1, 4, 7 oder 8 mit PARL in $\Delta yta10\Delta yta12$ (siehe 3.2.5) exprimiert.

Die resultierenden Stämme sowie deren Ausgangsstämme ohne *PARL* wurden auf Selektivmedium angezogen. Gesamtzellextrakt wurde nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert.

In keinem der untersuchten Stämme mit *PARL* wurden zusätzliche Banden an OPA1 im Vergleich zu deren Ausgangsstämmen ohne *PARL* nachgewiesen. Zusammenfassend hat demnach die menschliche Rhomboidprotease PARL keinen mit der *m*-AAA-Protease konkurrierenden Einfluss auf die Proteolyse von OPA1 in Hefe.

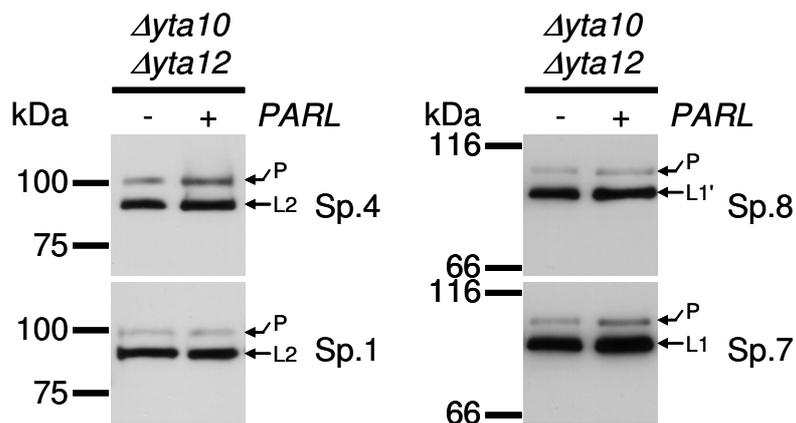


Abbildung 3-17. PARL hat keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 in $\Delta yta10\Delta yta12$. OPA1-Transkriptionsvariante (Sp.) 1, 4, 7 oder 8 wurden zusammen mit (+) oder ohne (-) PARL in $\Delta yta10\Delta yta12$ exprimiert. Gesamtzellextrakt wurde mit SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen OPA1 analysiert.

4 Diskussion

In menschlichen Zellen werden in den meisten Geweben mehrere Transkriptionsvarianten von OPA1 exprimiert (Delettre et al., 2001). Wir und andere konnten bis zu fünf Proteinisoformen voneinander unterscheiden (Delettre et al., 2001; Duvezin-Caubet et al., 2006; Olichon et al., 2003; Olichon et al., 2006). Inwieweit diese verschiedenen Proteinisoformen von den einzelnen Transkriptionsvarianten generiert werden, war zu Beginn dieser Arbeit völlig unklar. Wurden anfänglich die einzelnen Proteinisoformen als direktes Korrelat einzelner Transkriptionsvarianten diskutiert, gibt es mittlerweile mehrere Studien, einschließlich der vorliegenden, die für eine proteolytische Prozessierung von OPA1 in mehreren Schritten sprechen. Bereits vor einigen Jahren wurde nach Experimenten mit OPA1-GFP-Hybridproteinen eine proteolytische Prozessierung im von Exon 5 kodierten Bereich vermutet (Sato et al., 2003). Für das Ortholog in Hefe, Mgm1, wurde proteolytische Prozessierung gezeigt (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b).

Im Rahmen dieser Arbeit und in einer anderen Studie konnte weitere Evidenz für eine proteolytische Prozessierung von OPA1 erbracht werden: durch Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials mit Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) ließ sich eine proteolytische Prozessierung von den langen OPA1 Isoformen zu den kurzen induzieren (Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Diese proteolytische Umsetzung ging mit einer Fragmentierung der Mitochondrien einher (Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Bemerkenswerterweise konnte eine solche Verschiebung zu den kleinen Proteinisoformen in verschiedenen Modellsystemen für humane Mitochondriopathien und in Gewebeproben von Patienten mit mitochondrialen Krankheiten beobachtet werden (Duvezin-Caubet et al., 2006). Welche Proteasen für die proteolytische Umsetzung von OPA1 verantwortlich ist, ist eine Frage, der in dieser Arbeit nachgegangen wurde.

4.1 Die heterologe Expression von OPA1 in Hefe

In der vorliegenden Arbeit konnten vier der acht OPA1-Transkriptionsvarianten erfolgreich in Hefe exprimiert werden. Jede Transkriptionsvariante führte zu mehreren Proteinisoformen, die nach ihrem Laufverhalten in der SDS-PAGE Proteinisoformen aus HeLa-Mitochondrien zugeordnet werden konnten. Die Proteolyse von OPA1 in Hefe entspricht nach den hier vorliegenden Ergebnissen weitgehend der Proteolyse in Säugetierzellen. Demnach eignet sich die Hefe für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen zur Biogenese von OPA1. Zum einen kann wie in der vorliegenden Arbeit und einer weiteren Studie (Ishihara et al., 2006) dieses System zur Identifikation der zugrunde liegenden Proteasen verwendet werden.

Weiterhin ist auch die Untersuchung von Kofaktoren denkbar, die die Prozessierung regulieren könnten. In einer weiteren Studie konnte durch Expression von OPA1 die Deletion von Msp1 in *S. pombe* komplementiert werden (Lenaers et al., 2002; Olichon et al., 2006). Möglicherweise eignet sich daher die Hefe auch zur funktionellen Charakterisierung von OPA1.

4.2 OPA1 wird in mehreren Schritten N-terminal prozessiert

Aufgrund der Spezifität der Antikörper konnten die Proteinisoformen der OPA1-Transkriptionsvarianten auf mehrere N-terminale Prozessierungsschritte zurückgeführt werden. Die Untersuchung von OPA1 mit dem Computerprogramm MitoProt II (Claros and Vincens, 1996) deuteten auf einen ersten N-terminalen Prozessierungsschritt durch die mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) hin. Dieser erste Prozessierungsschritt konnte durch zwei experimentelle Studien bestätigt werden: sowohl die N-terminale Sequenzierung von L1 (Ishihara et al., 2006) als auch eine Massenspektrometrie der einzelnen Proteinisoformen in HeLa-Zellen (Duvezin-Caubet et al., 2007) ergaben eine Prozessierung im Bereich der Erkennungssequenz, die für MPP vorhergesagt und in Exon 2 kodiert wird. Allen Transkriptionsvarianten ist demnach ein erster Prozessierungsschritt durch MPP vor den alternativ gespleißten Exons 4, 4b und 5b gemein. Dieser Prozessierungsschritt führt zur Bildung der langen Proteinisoformen L1 und L2 in HeLa-Zellen, die jeweils aus den Transkriptionsvarianten 7 und 1 hervorgehen (Duvezin-Caubet et al., 2007; Ishihara et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit führte die Expression der Transkriptionsvariante 8 zu einer langen OPA1-Proteinisoform (L1'), die in der SDS-PAGE ein geringfügig langsames Laufverhalten als L1 aufwies. L1' war in HeLa-Zellen nicht nachweisbar. Das Fehlen der Proteinisoform L1' in HeLa-Zellen kann durch eine zu geringe oder nicht vorhandene Expression der Transkriptionsvariante 8 erklärt werden (Sato et al., 2003). L1 geht in HeLa-Zellen aus der Transkriptionsvariante 7 hervor. Transkriptionsvariante 7 unterscheidet sich von Transkriptionsvariante 8 durch das Fehlen von Exon 4b. Da der erste Prozessierungsschritt durch MPP vor dem alternativ gespleißten Bereich liegt, haben die zu erwartenden langen Proteinisoformen von Transkriptionsvariante 7 (997 Aminosäuren) und 8 (1015 Aminosäuren) eine nicht exakt identische Größe. Hierdurch wird das geringfügig andere Laufverhalten von L1 und L1' erklärt.

Die Transkriptionsvarianten 1 und 4 resultierten jeweils in einer langen OPA1-Proteinisoform identischer Größe (L2, siehe auch 3.2.5). Das war auch zu erwarten, da beide Isoformen trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz im variablen Bereich mit 960 und 961 Resten eine ähnliche Größe haben.

Die N-Termini der kleinen Proteinisoformen S1, S2 und S3 konnten bis heute nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Ishihara und Kollegen fanden eine

Prozessierung im von Exon 5 und 5b kodierten Bereich (Ishihara et al., 2006). Diese Daten konnten von zwei kürzlich erschienenen Studien bestätigt werden (Griparic et al., 2007; Song et al., 2007). Des Weiteren wird über eine zusätzliche Prozessierung im von Exon 4b kodierten Bereich spekuliert (Griparic et al., 2007). Insgesamt handelt es sich bei den kleinen Proteinisoformen in Säugetierzellen zum Teil vermutlich um eine Mischung unterschiedlich prozessierter Transkriptionsvarianten, die in der SDS-PAGE nicht klar voneinander abzugrenzen sind.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich ein Modell über die schrittweise Prozessierung von OPA1 aufstellen: nachdem das OPA1-Vorläuferprotein (P) die Matrix der Mitochondrien erreicht, wird in einem ersten Schritt das mitochondriale Sortierungssignal durch MPP abgespalten. Aus diesem Schritt resultiert die lange OPA1-Isoform (L). Da dieser proteolytische Schnitt vor dem alternativ gespleißten Bereich von OPA1 liegt, gehen daraus für die einzelnen Transkriptionsvarianten unterschiedlich lange OPA1-Isoformen hervor (L1, L1', L2). Durch Spaltung an weiter C-terminal gelegenen proteolytische Schnittstellen im alternativ gespleißten Bereich werden die kurzen Proteinisoformen (S3, S4, S5) generiert.

4.3 PARL ist eine mitochondriale Rhomboidprotease mit konservierter Substratspezifität

Auch die Genese der kurzen Proteinisoformen von OPA1 wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. OPA1 und Mgm1 weisen eine hohe Homologie auf Aminosäureebene auf. Ebenso scheint die Funktion der beiden Proteine in Hinsicht auf die mitochondriale Fusion konserviert zu sein. Mgm1 wird von der Rhomboidprotease Pcp1 prozessiert. Dies ließ vermuten, dass auch OPA1 von einer orthologen mitochondrialen Rhomboidprotease prozessiert wird.

Koonin und Kollegen konnten anhand von phylogenetischer Untersuchungen eine menschliche Rhomboidprotease mit dem Namen PARL identifizieren, die nahe Verwandtschaft zu Pcp1 aufweist (Koonin et al., 2003). Alignment und bioinformatischen Algorithmen zu Vorhersage der subzellulären Lokalisation unterstützten die Vermutung, dass es sich bei PARL um eine mitochondrial lokalisierte Rhomboidprotease handelt.

Die konservierte Substratspezifität der mitochondrialen Rhomboidprotease konnte sowohl biochemisch als auch zellbiologisch durch Komplementation von Pcp1 durch PARL in *S. cerevisiae* gezeigt werden. Im Gegensatz zu $\Delta pcp1$ wies $\Delta pcp1 + PARL$ eine vom Wildtyp nicht unterscheidbare mitochondriale Morphologie auf. Des Weiteren zeigte der komplementierte Stamm im Gegensatz zu $\Delta pcp1$ sowohl auf fermentierbaren als auch auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ein Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Auch die Fähigkeit zur proteolytischen Prozessierung der beiden bekannten Substrate von Pcp1 in Hefe wurde

nachgewiesen. Nicht zuletzt aufgrund der erfolgreichen Proteolyse dieser Substrate ist auch von einer Lokalisation von PARL in der mitochondrialen Innenmembran auszugehen. Diese Beobachtungen stimmen im Wesentlichen mit Ergebnissen einer anderen Studie überein (McQuibban et al., 2003). Weiterhin wurde kürzlich die mitochondriale Lokalisation in Säugetierzellen bestätigt (Cipolat et al., 2006).

Anhand der funktionellen Komplementation von Pcp1 durch das menschliche PARL in Hefe ließ sich die konservierte Substratspezifität der mitochondrialen Rhomboidprotease zeigen. Die konservierte Substratspezifität in Kombination mit der hohen Konservierung der mitochondrialen Rhomboidproteasen in Eukaryoten deutet auf eine wichtige und möglicherweise ebenfalls konservierte Funktion der Protease hin.

4.4 Die Funktion der mitochondrialen Rhomboidprotease ist nicht vollständig von Hefe bis zu Säugetieren konserviert

Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in mehreren anderen Studien wurde versucht, eine Prozessierung von OPA1 durch PARL nachzuweisen. McQuibban und Kollegen regulierten in *Drosophila* die Expression einer mitochondrialen Rhomboidprotease, Rhomboid-7, und einem Ortholog von OPA1, Opa1-like, herunter. Dies führte in beiden Fällen zu fragmentierten Mitochondrien. Auch Mutationen in *rhomboid-7* und *opa1-like* führten zu Fusionsdefekten der Mitochondrien. Diese Ergebnisse deuteten auf eine konservierte Funktion der mitochondrialen Rhomboidprotease von *S. cerevisiae* zu *Drosophila* hin (McQuibban et al., 2006).

Im Rahmen einer anderen Studie wurde eine *PARL*^{-/-}-Maus erzeugt. Erstaunlicherweise zeigten die Zellen dieser Maus keine gestörte mitochondriale Morphologie und eine normale Funktion der Mitochondrien. OPA1 konnte allerdings in solchen Zellen nicht mehr seine anti-apoptotische Wirkung (Frezza et al., 2006) entfalten. Dies wurde auf die verminderte Bildung einer kleinen löslichen Isoform von OPA1 im Intermembranraum zurückgeführt, die nur einen sehr geringen Anteil (~4%) des OPA1-Gesamtproteins ausmacht. Cipolat und Kollegen führten die Genese dieser OPA1-Proteinisoform, die im Intermembranraum lokalisiert ist, auf die direkte oder indirekte proteolytische Aktivität von PARL zurück. Einerseits wurde sowohl durch Koimmunpräzipitation in Säugetierzellen als auch in einem Yeast-2-Hybrid-System eine Interaktion von PARL und OPA1 beobachtet. Zudem war die kleine lösliche Proteinisoform auch in den *PARL*^{-/-}-Zellen mit reduzierter Intensität nachweisbar (Cipolat et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der mitochondrialen Rhomboidproteasen PARL auf die proteolytische Prozessierung von OPA1 in Hefe und in der *PARL*^{-/-}-Maus untersucht. In Hefe konnte keine Prozessierung der

einzelnen OPA1-Transkriptionsvarianten in Abhängigkeit von PARL oder Pcp1 beobachtet werden: alle im Wildtyp zu sehenden OPA1-Isoformen fanden sich in gleichen Verhältnissen auch in $\Delta pcp1$. Die Koexpression des funktionell aktiven und voll komplementierenden PARL in $\Delta pcp1$ führte ebenfalls zu keinen Veränderungen der OPA1-Muster. Diese Ergebnisse werden von einer anderen Studie unterstützt, in der ebenfalls eine von Pcp1 unabhängige Prozessierung von OPA1-Transkriptionsvariante 1 und 7 in Hefe beobachtet wurde (Ishihara et al., 2006). Dies bedeutet, dass in der Hefe die schrittweise Prozessierung von OPA1 durch andere Proteasen erfolgen muss. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der $PARL^{-/-}$ -Mauszellen erbrachte ebenfalls keine Evidenz für eine von PARL abhängige Prozessierung von OPA1: die OPA1-Muster von $PARL^{-/-}$ -Zellen und Wildtypzellen wiesen keine erkennbaren Unterschiede auf. Auch nach Behandlung mit dem Entkoppler CCCP ließ sich sowohl in Wildtyp- als auch in $PARL^{-/-}$ -Zellen gleichermaßen eine proteolytische Umsetzung zu den kurzen Isoformen induzieren. Diese Untersuchungen der $PARL^{-/-}$ -Zellen wurden kürzlich im Rahmen einer anderen Studie wiederholt und führten zu den gleichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Studie (Griparic et al., 2007). Unterstützt werden diese Ergebnisse auch durch die Tatsache, dass sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in einer anderen Studie die induzierbare Proteolyse von OPA1 in Säugetierzellen mit 1,10-Phenanthrolin (o-Phe), einem Metalloproteaseinhibitor, aber nicht mit Serinproteaseinhibitoren inhibiert werden konnte (Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Dies ist ein Indiz, das gegen eine Proteolyse durch PARL spricht, da dies eine Serinprotease und keine Metalloproteasen ist.

Eine direkt oder indirekt von PARL abhängige Prozessierung eines sehr geringen Anteils von OPA1 kann dennoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die kleine PARL-abhängige anti-apoptotische Proteinisoform nur wie von Cipolat und Kollegen beschrieben nach hypotonem Schwellen, Salzwäsche und Fraktionierung der Mitochondrien (Jacobs and Sanadi, 1960) nachweisbar (Cipolat et al., 2006) und wurde durch die Experimente der vorliegenden Studie und der anderen Studie (Griparic et al., 2007) nicht erfasst.

Die Deletion von $PCP1$ in der Hefe führt zu einer gestörten mitochondrialen Morphologie und einem Wachstumsdefekt, der auf den Verlust der mitochondrialen DNA zurückgeführt wurde (Dimmer et al., 2002; Herlan et al., 2003). Dieser Phänotyp ist auf die fehlende Prozessierung von Mgm1 zurückzuführen, da erstens die Deletion von $MGM1$ sehr ähnliche Auswirkungen hat und zweitens die Deletion von $PCP1$ durch Expression von s-Mgm1 teilweise komplementiert werden kann (Herlan et al., 2003) (siehe auch 1.1.5.1). Es ist bemerkenswert, dass sowohl die $PARL^{-/-}$ -Maus als auch die $rhomboid-7^{-/-}$ -*Drosophila* lebensfähig sind (Cipolat et al., 2006; McQuibban et al., 2006). Dies bedeutet, dass der Erhalt der mitochondrialen DNA (respiratorische Kompetenz) in Säugetier- und in Fliegenzellen unabhängig von der

mitochondrialen Rhomboidprotease gewährleistet sein muss. Weiterhin ist festzuhalten, dass Zellen der *PARL*^{-/-}-Maus eine normale mitochondriale Morphologie aufweisen (Cipolat et al., 2006). Die gänzlich unterschiedlichen Phänotypen der Deletion von PARL beziehungsweise PCP1 in Säugetier beziehungsweise Hefe könnten durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie erklärt werden: In der Hefe ist die Funktion von Mgm1 abhängig von der Prozessierung durch die mitochondriale Rhomboidprotease. Dagegen ist in Säugetierzellen die entsprechende Funktion von OPA1 unabhängig von der mitochondrialen Rhomboidprotease. Die heute vorliegenden Daten legen daher nahe, dass die bisher charakterisierten Funktionen der mitochondrialen Rhomboidprotease von Hefe bis zu Säugetieren nicht konserviert sind.

4.5 Die *m*-AAA-Protease prozessiert OPA1

Die PARL- beziehungsweise Pcp1-unabhängige Prozessierung von OPA1 war sowohl in Hefe als auch in Säugetierzellen nachzuweisen. Dies begründete den Verdacht, dass andere Proteasen an der Genese der kurzen OPA1-Isoformen beteiligt sein müssen. Tatsächlich konnte anhand der heterologen Expression von OPA1 in einer Reihe von Hefe-Deletionsmutanten die fehlende Entstehung der kurzen Proteinisoformen (S3, S4, S5) in $\Delta yta10$ und $\Delta yta12$ festgestellt werden. Gleichzeitig wurde eine Akkumulation der langen Proteinisoformen (L1, L2, L1') beobachtet. Eine andere Studie führte zu denselben Ergebnissen (Ishihara et al., 2006).

Yta10 und Yta12 sind die beiden Untereinheiten der mitochondrialen AAA-Protease der Matrix (*m*-AAA-Protease, siehe auch 1.1.4.1) (Arlt et al., 1996; Leonhard et al., 1996). Eine der beschriebenen Funktionen der *m*-AAA-Protease ist der Abbau falsch gefalteter Proteine (Arlt et al., 1998). Es wäre also denkbar, dass OPA1 in der Hefe eine Fehlfaltung aufweist und infolgedessen von der *m*-AAA-Protease abgebaut wird. Es sprechen jedoch mehrere Punkte gegen einen unspezifischen Abbau. So entstehen in Hefe und in HeLa-Zellen Proteinisoformen mit identischer Größe und es erfolgt anscheinend kein weiterer Abbau dieser Formen. Demnach unterliegt OPA1 in der Hefe einer spezifischen Proteolyse. Theoretisch ist es auch möglich, dass eine OPA1-spezifische Aktivität von PARL durch die spezifische oder unspezifische Aktivität der *m*-AAA-Protease maskiert wird. Eine derartige Prozessierung der langen OPA1-Proteinisoformen durch PARL ließ sich allerdings in der Hefe anhand der Koexpression von PARL in $\Delta yta10\Delta yta12$ ausschließen (siehe auch 3.2.6).

Heterooligomere Komplexe aus den menschlichen Orthologen AFG3L2 und Paraplegin können die *m*-AAA-Protease der Hefe bestehend aus den Untereinheiten Yta10 und Yta12 funktionell ersetzen (Atorino et al., 2003). Dieses System wurde genutzt, um den spezifischen Einfluss der menschlichen *m*-AAA-Protease auf die

Prozessierung von OPA1 in Hefe zu untersuchen. In $\Delta yta10\Delta yta12$ wurde eine Prozessierung und die Generierung der kurzen Isoformen S3 und S4 bei Präsenz, aber nicht bei Fehlen der menschlichen *m*-AAA-Protease beobachtet. Bemerkenswerterweise decken sich die Banden, die in Hefe aus den Transkriptionsvarianten 4 und 7 entstehen, exakt mit denen, die bei Untersuchungen zweier anderer Studien in HeLa-Zellen aus diesen Transkriptionsvarianten hervorgingen (Ishihara et al., 2006; Olichon et al., 2006). Die Effizienz der Proteolyse variierte zwischen den verschiedenen Transkriptionsvarianten. Dies kann als Indiz für eine substratspezifische Aktivität der *m*-AAA-Protease gewertet werden. In Gegenwart der Hefeprotease war die Proteolyse generell effizienter, aber es wurde eine Bildung der kurzen Isoform S5 sowie des mutmaßlichen Abbauprodukts (d) beobachtet. Es sei hier angemerkt, dass die heterooligomeren Komplexe aus den menschlichen AFG3L2 und Paraplegin offenbar auch das in Hefe „natürliche“ Substrat Ccp1 der *m*-AAA-Protease mit wesentlich geringerer Effizienz schneiden. Dies könnte zum Beispiel auf fehlende menschliche Kofaktoren oder eine veränderte Lipidzusammensetzung der Hefemitochondrien zurückzuführen sein.

4.6 Homooligomere *m*-AAA-Protease ermöglicht die Prozessierung von OPA1

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass heterooligomere Komplexe der *m*-AAA-Protease bestehend aus Paraplegin und AFG3L2 OPA1 direkt oder indirekt prozessieren können. Im weiteren Verlauf dieser Studie wurde daher in Zusammenarbeit mit Andrea Bernacchia und Elena I. Rugarli ein Mausmodell untersucht, in dem Paraplegin inaktiviert wurde (*SPG7*^{-/-}). Dieses Mausmodell zeigte in einer früheren Studie eine schwer beeinträchtigte mitochondriale Morphologie (Ferreirinha et al., 2004). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie könnte dies möglicherweise auf eine gestörte proteolytische Prozessierung von OPA1 zurückzuführen sein. Überraschenderweise war allerdings die Prozessierung von OPA1 in Fibroblasten der *SPG7*^{-/-}-Maus nicht beeinträchtigt (Duvezin-Caubet et al., 2007). Auch nach Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials mit CCCP konnte kein unterschiedliches Prozessierungsverhalten zwischen Wildtyp- und *SPG7*^{-/-}-Zellen festgestellt werden. Der Vergleich der OPA1-Muster mehrerer Gewebetypen in Mitochondrien (Gehirn, Rückenmark und Leber) isoliert aus Wildtyp und *SPG7*^{-/-}-Zellen zeigte ebenfalls keine Unterschiede (Duvezin-Caubet et al., 2007)(pers. Mitteilung von Elena I. Rugarli).

Wie kann dieser scheinbare Widerspruch erklärt werden? Es wurde gezeigt, dass auch homooligomere Komplexe der menschlichen und der murinen *m*-AAA-Protease bestehend aus AFG3L2 (Mensch) beziehungsweise Afg3l1 oder Afg3l2 (Maus) proteolytische Aktivität besitzt (Koppen et al., 2006). Um zu überprüfen, ob

OPA1 auch durch solche homooligomeren Komplexe prozessiert werden kann, wurden in Zusammenarbeit mit Mirko Koppen und Thomas Langer die OPA1-Transkriptionsvarianten in Hefe in Kombination mit den verschiedenen Untereinheiten der menschlichen oder murinen *m*-AAA-Protease untersucht. Die OPA1-Transkriptionsvarianten 1, 4, 7 oder 8 wurden in $\Delta yta10\Delta yta12$ zusammen mit dem menschlichen AFG3L2 oder einer proteolytisch inaktiven Variante AFG3L2^{EQ} exprimiert. Tatsächlich konnten die OPA1-Transkriptionsvarianten 1, 4, 7 und 8 durch die menschliche homooligomere *m*-AAA-Protease prozessiert werden. In der Maus existiert noch eine zusätzliche Untereinheit, Afg3l1, mit hoher Homologie zu Afg3l2 und Paraplegin (Maus) (Kremmidiotis et al., 2001). Die Prozessierung der OPA1-Transkriptionsvarianten 1, 4, 7 oder 8 durch verschiedene Kombinationen der drei murinen Untereinheiten wurde ebenfalls in der Hefe untersucht. Als Ergebnis zeigte sich eine proteolytische Prozessierung von OPA1 durch die Untereinheiten Afg3l2 oder Afg3l1, sowohl in Form von homo- als auch heterooligomeren Komplexen mit Paraplegin. Die Untereinheit Paraplegin (Maus) schien dabei selbst nur eine geringe proteolytische Aktivität zu besitzen. Auch gab es Indizien für unterschiedliche proteolytische Substratspezifität der Untereinheiten Afg3l1 und Afg3l2 (Duvezin-Caubet et al., 2007).

Wie bereits erwähnt, wurde auch in einer anderen Studie ein Zusammenhang zwischen der proteolytischen Prozessierung von OPA1 und der *m*-AAA-Protease gefunden (Ishihara et al., 2006). Die Proteolyse wird dort allerdings hauptsächlich auf die Aktivität von Paraplegin zurückgeführt. Die Untersuchungen der homo- und heterooligomeren Komplexe der *m*-AAA-Protease in Hefe sowie die vorhandene Prozessierung von OPA1 in der *SPG7*^{-/-}-Maus deuten im Gegensatz dazu auf eine wesentliche Rolle der Untereinheit AFG3L2 hin. Es lässt sich des Weiteren spekulieren, dass die unterschiedliche Substratspezifität der Untereinheiten und die gewebeabhängige Expression von OPA1 und der Untereinheiten der *m*-AAA-Protease das Krankheitsbild der hereditären spastischen Paraplegie beeinflussen.

Anhand der Experimente konnte gezeigt werden, dass die langen OPA1-Proteinisoformen in Abhängigkeit von der humanen und auch der murinen *m*-AAA-Protease in Hefe in die kurzen Proteinisoformen umgesetzt werden können. Die Prozessierung von OPA1 könnte dabei direkt oder indirekt durch die *m*-AAA-Protease erfolgen. Da aus den langen OPA1-Proteinisoformen bis zu drei kurze Isoformen hervorgehen, ist es durchaus vorstellbar, dass noch weitere Proteasen an der Biogenese beteiligt sind. Tatsächlich konnte in zwei kürzlich erschienenen Studien gezeigt werden, dass auch die AAA-Protease des Intermembranraums (*i*-AAA-Protease) an der Genese kurzer OPA1-Proteinisoformen beteiligt ist. Die Expression verschiedener mitochondrialer Proteasen wurde hierbei mittels RNAi in Säugetierzellen herunterreguliert. OPA1 wird demnach in Abhängigkeit von der *i*-AAA-Protease in Exon 5b (Gripacic et al., 2007; Song et al., 2007) und in Exon 4b

(Griparic et al., 2007) prozessiert. Dagegen ist die Prozessierung in Exon 5 unabhängig von der *i*-AAA-Protease. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Prozessierung in Exon 5b nicht durch Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials induziert wird (Griparic et al., 2007; Song et al., 2007). RNAi gegen PARL hatte keinen Einfluss auf die Prozessierung von OPA1 (Griparic et al., 2007).

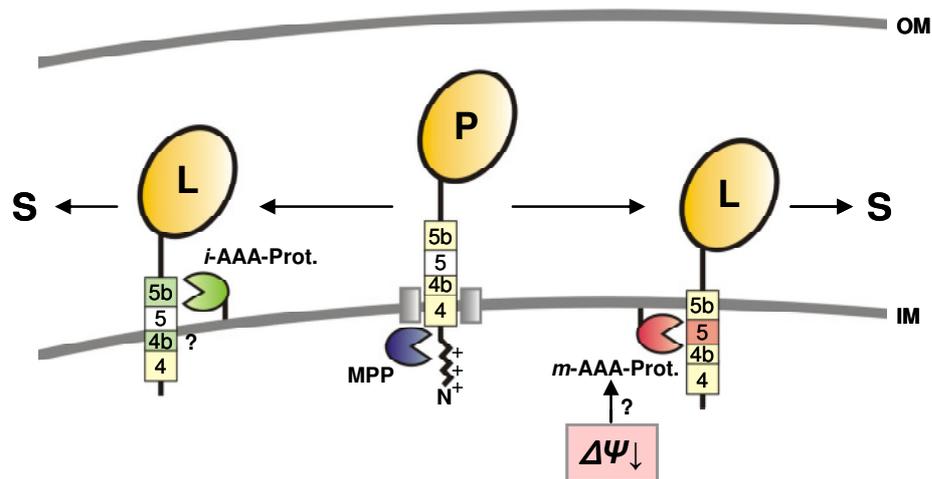


Abbildung 4-1 Mindestens drei mitochondriale Proteasen sind an der Biogenese der verschiedenen OPA1-Proteinisoformen beteiligt. Das OPA1-Vorläuferprotein (P) wird aufgrund der positiven Ladungen des N-terminalen Sortierungssignals über den TIM23-Komplex (graue Rechtecke) teilweise in die Matrix importiert. Aus dem Vorläuferprotein geht nach Abspaltung des N-terminalen Sortierungssignals durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) die lange OPA1-Proteinisoformen (L) hervor. Da sich die Konsensussequenz von MPP N-terminal der alternativ gespleißten Exons 4, 4b und 5b befindet, hat dies für jede der acht OPA1-Transkriptionsvarianten eine lange Proteinisoform individueller Größe zur Folge. Lange OPA1-Proteinisoformen können sowohl von der *i*-AAA-Protease als auch von der *m*-AAA-Protease prozessiert werden, woraus die kurzen OPA1-Proteinisoformen (S) hervorgehen. Die Aktivität der *i*-AAA-Protease ist dabei abhängig vom Vorhandensein der Exons 5b und möglicherweise 4b, da sich in diesen die Schnittstellen befinden. Die *m*-AAA-Protease prozessiert OPA1 in Exon 5. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi\downarrow$) könnte ein regulatorischer Stimulus für die *m*-AAA-Protease sein. Hierdurch ließe sich die rasche Umsetzung der langen Isoformen zu den kurzen nach Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials erklären.

In Verbindung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie und einer anderen Studie (Ishihara et al., 2006) kann daher das Modell der schrittweisen Prozessierung von OPA1 erweitert werden: Nachdem das OPA1-Vorläuferprotein (P) die Matrix der Mitochondrien erreicht, wird in einem ersten Schritt das mitochondriale Sortierungssignal durch MPP abgespalten. Aus diesem Schritt geht für jede Transkriptionsvariante eine lange OPA1-Isoform hervor (L). OPA1 kann nun sowohl von der *m*-AAA-Protease als auch von der *i*-AAA-Protease prozessiert werden. Die *m*-AAA-Protease schneidet OPA1 in Exon 5, die *i*-AAA-Protease schneidet in Exon

5b und möglicherweise in 4b. Die Prozessierung durch die *i*-AAA-Protease wird konstitutiv reguliert und ist unabhängig vom Membranpotential. Die durch CCCP induzierbare Prozessierung von OPA1 könnte daher Ausdruck einer durch das mitochondriale Membranpotential regulierten Aktivität der *m*-AAA-Protease sein, obgleich hierfür noch keine experimentelle Evidenz besteht (Abbildung 4-1). Es ist nicht auszuschließen, dass noch weitere Proteasen OPA1 prozessieren.

4.7 Die regulierte Prozessierung von OPA1 bestimmt wesentlich dessen Funktion

Dem mitochondrialen Dynamin-ähnlichen Protein OPA1 werden zwei wichtige mitochondriale Funktionen zugeschrieben. Zum einen besitzt es eine anti-apoptotische Aktivität, die auf eine Kontrolle der Freisetzung von Cytochrom *c* durch Stabilisierung der Cristaeinmündungen zurückgeführt wird (Frezza et al., 2006).

Die zweite wichtige Funktion von OPA1 wird in seiner Rolle bei der mitochondrialen Fusion gesehen. Ähnlich wie bei Mgm1 sind für eine effiziente Fusion der Mitochondrien sowohl lange als auch kurze OPA1-Proteinisoformen erforderlich (Song et al., 2007). Entsprechend geht die durch Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials induzierte Prozessierung von OPA1 von den langen Proteinisoformen zu den kurzen mit einer Fragmentierung der Mitochondrien einher (Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006). In Gewebeproben von Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutliche Verlagerung des Gleichgewichts der OPA1-Proteinisoformen zu den kleinen Formen beobachtet werden. Die Stärke der Verlagerung geht dabei mit dem Ausmaß der mitochondrialen Beeinträchtigung des betroffenen Patienten einher (Duvezin-Caubet et al., 2006).

Diese Daten sprechen für eine physiologische Relevanz der durch ein gestörtes mitochondriales Membranpotential aktivierbaren Proteolyse von OPA1. Der Sinn dieses Prozesses könnte in einer gezielten Isolation und Elimination dysfunktioneller Mitochondrien liegen. Anhand unserer Ergebnisse wurde folgende Hypothese aufgestellt: Störungen in der Funktion von Mitochondrien, zum Beispiel aufgrund einer Mutation in der mtDNA, führen zur Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials (Duvezin-Caubet et al., 2006; Herlan et al., 2004). Hierdurch wird eine proteolytische Umsetzung der langen OPA1-Proteinisoformen zu den kurzen ausgelöst, wodurch das Mitochondrium seine Fusionskompetenz verliert und sich somit vom dynamischen mitochondrialen Netzwerk isoliert. In einem weiteren Schritt könnte dann das geschädigte Mitochondrium gezielt abgebaut werden, zum Beispiel durch Autophagie (Abbildung 4-2).

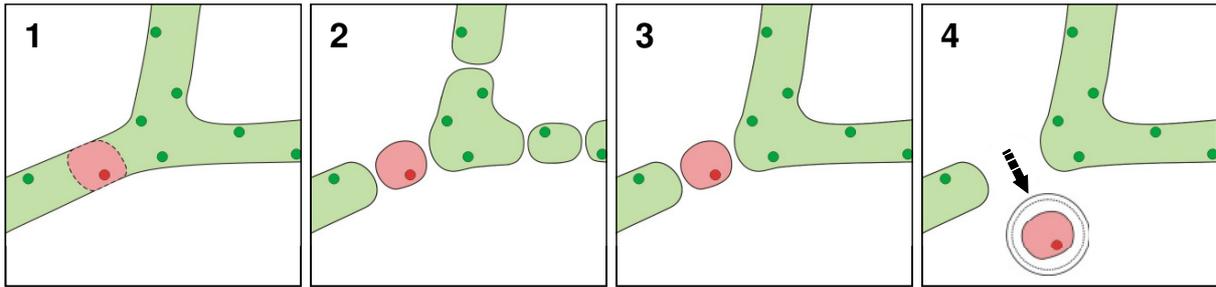


Abbildung 4-2. Hypothese zur Qualitätssicherung der Mitochondrien. (1) Das mitochondriale Netzwerk (grün hinterlegt) einer Zelle enthält zahlreiche Nukleoide (dunkel grün). Zufällig auftretende Mutationen der mitochondrialen DNA (rote Nukleoide) führen zu einer lokalen funktionellen Beeinträchtigung (rot hinterlegt). (2) Nach physiologischen Teilungsprozessen kommt es in einem dysfunktionellen Kompartiment zu einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials. (3) Die dadurch induzierte Proteolyse von OPA1 bedingt eine Isolation des dysfunktionellen Kompartiments durch Unterbindung der Fusion. (4) Das isolierte dysfunktionelle Kompartiment könnte z.B. durch Bildung eines Autophagosoms (ringförmig) eliminiert werden.

4.8 Ausblick

Sowohl in der Apoptose als auch in der mitochondrialen Fusion scheint die regulierte proteolytische Prozessierung von OPA1 für die Funktion des Proteins eine entscheidende Rolle zu spielen. Die genauen Mechanismen, die diese kritischen proteolytischen Schritte regulieren, werden in Zukunft zu klären sein. Dabei sind zunächst folgende Aspekte besonders zu berücksichtigen: Wie reguliert eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials tatsächlich die Proteolyse von OPA1? Welche Kofaktoren sind an der Regulation beteiligt und gibt es noch weitere Proteasen, die bei der Prozessierung involviert sind? Möglicherweise lässt sich durch Klärung dieser Fragen auch verstehen, weshalb die *m*-AAA-Protease und nicht die mitochondriale Rhomboidprotease PARL OPA1 prozessiert.

Eine weitere spannende Frage ist nicht zuletzt die nach der Funktion von PARL in Säugetieren. Bemerkenswerterweise ist die mitochondriale Rhomboidprotease von der Hefe bis zum Menschen konserviert und die Substratspezifität erhalten. Sie übernimmt aber, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, offenbar unterschiedliche Funktionen. In der Hefe ist das einzige weitere bekannte Substrat von Pcp1 neben Mgm1 die Cytochrom *c*-Peroxidase (Ccp1). Ein Homolog von Ccp1 konnte in Säugetieren aber bisher nicht identifiziert werden. Daher müssen zunächst die Substrate von PARL in Säugetieren gefunden werden. Möglicherweise könnte die Rekonstitution in Hefe mit funktionell aktivem PARL bei der Identifikation dieser Substrate in Zukunft hilfreich sein.

5 Zusammenfassung

Die autosomal dominante Optikusatrophie ist mit Mutationen in dem Gen *OPA1* assoziiert. *OPA1* kodiert eine konservierte mitochondriale Dynamin-ähnliche GTPase. Das Ortholog von *OPA1* in *S. cerevisiae* ist Mgm1. Mgm1 liegt im Intermembranraum der Mitochondrien assoziiert mit der Innenmembran in zwei Proteinisoformen vor: der langen (l-Mgm1) und der kurzen Isoform (s-Mgm1). Beide Isoformen sind für den Erhalt der mitochondrialen Morphologie und der mitochondrialen DNA erforderlich. l-Mgm1 wird von der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1 durch limitierte N-terminale Proteolyse in s-Mgm1 umgesetzt. *OPA1* ist ebenfalls für den Erhalt normaler mitochondrialer Morphologie in Säugetierzellen erforderlich. Zusätzlich reguliert es die Freisetzung von Cytochrom *c* während der Apoptose. Insgesamt acht Transkriptionsvarianten von *OPA1* sind bekannt, die durch alternatives Spleißen der N-terminal gelegenen Exons 4, 4b und 5b entstehen. Auf Proteinebene ließen sich bis zu fünf *OPA1*-Proteinisoformen unterschiedlicher Größe voneinander abgrenzen. Die Proteinisoformen liegen zum einen Teil membranverankert in der Innenmembran und zum anderen Teil peripher mit der Innenmembran assoziiert im Intermembranraum der Mitochondrien vor.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Biogenese der verschiedenen *OPA1*-Proteinisoformen. Hierzu wurden *OPA1*-Transkriptionsvarianten in Hefe heterolog exprimiert. *OPA1* wird in Hefe ähnlich wie in Säugetierzellen prozessiert. Die Prozessierung erfolgt N-terminal, an mehreren Stellen und schrittweise. Die menschliche mitochondriale Rhomboidprotease PARL kann Pcp1 in der Hefe voll komplementieren, aber weder Pcp1 noch PARL prozessieren *OPA1*. In *PARL*^{-/-}-Mauszellen wird *OPA1* normal prozessiert. In der Hefe ist die Prozessierung von *OPA1* von den Untereinheiten Yta10 und Yta12 der mitochondrialen AAA-Protease der Matrix (*m*-AAA-Protease) abhängig. Durch Expression der Untereinheiten der menschlichen *m*-AAA-Protease, Paraplegin und AFG3L2, lässt sich die Prozessierung von *OPA1* in $\Delta yta10\Delta yta12$ rekonstituieren.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Biogenese von Mgm1/*OPA1* nicht vollständig von der Hefe bis zu Säugetieren konserviert ist. Der Austausch der prozessierenden Protease könnte in Verbindung mit einem Mechanismus zur Qualitätssicherung der Mitochondrien in Metazoa stehen.

6 Literaturverzeichnis

- Adam, A., M. Endres, C. Sirrenberg, F. Lottspeich, W. Neupert, and M. Brunner. 1999. Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J.* 18:313-9.
- Aijaz, S., L. Erskine, G. Jeffery, S.S. Bhattacharya, and M. Votruba. 2004. 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.* 45:1667-73.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science, New York and London.
- Alexander, C., M. Votruba, U.E. Pesch, D.L. Thielson, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S.S. Bhattacharya, and B. Wissinger. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 26:211-5.
- Amati-Bonneau, P., S. Odent, C. Derrien, L. Pasquier, Y. Malthiery, P. Reynier, and D. Bonneau. 2003. The association of autosomal dominant optic atrophy and moderate deafness may be due to the R445H mutation in the OPA1 gene. *Am J Ophthalmol.* 136:1170-1.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, and I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457-65.
- Andersson, S.G., A. Zomorodipour, J.O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U.C. Alsmark, R.M. Podowski, A.K. Naslund, A.S. Eriksson, H.H. Winkler, and C.G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 396:133-40.
- Andreoli, C., H. Prokisch, K. Hortnagel, J.C. Mueller, M. Munsterkotter, C. Scharfe, and T. Meitinger. 2004. MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res.* 32:D459-62.
- Arlt, H., G. Steglich, R. Perryman, B. Guiard, W. Neupert, and T. Langer. 1998. The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *Embo J.* 17:4837-47.
- Arlt, H., R. Tauer, H. Feldmann, W. Neupert, and T. Langer. 1996. The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell.* 85:875-85.
- Arnold, I., and T. Langer. 2002. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1592:89-96.
- Arnoult, D., A. Grodet, Y.J. Lee, J. Estaquier, and C. Blackstone. 2005. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem.* 280:35742-50.
- Atorino, L., L. Silvestri, M. Koppen, L. Cassina, A. Ballabio, R. Marconi, T. Langer, and G. Casari. 2003. Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol.* 163:777-87.
- Aung, T., L. Ocaka, N.D. Ebenezer, A.G. Morris, G. Brice, A.H. Child, R.A. Hitchings, O.J. Lehmann, and S.S. Bhattacharya. 2002a. Investigating the association between OPA1 polymorphisms and glaucoma: comparison between normal

- tension and high tension primary open angle glaucoma. *Hum Genet.* 110:513-4.
- Aung, T., L. O'Carroll, N.D. Ebenezer, A.G. Morris, M. Krawczak, D.L. Thiselton, C. Alexander, M. Votruba, G. Brice, A.H. Child, P.J. Francis, R.A. Hitchings, O.J. Lehmann, and S.S. Bhattacharya. 2002b. A major marker for normal tension glaucoma: association with polymorphisms in the OPA1 gene. *Hum Genet.* 110:52-6.
- Aung, T., K. Okada, D. Poinoosawmy, L. Membrey, G. Brice, A.H. Child, S.S. Bhattacharya, O.J. Lehmann, D.F. Garway-Heath, and R.A. Hitchings. 2003. The phenotype of normal tension glaucoma patients with and without OPA1 polymorphisms. *Br J Ophthalmol.* 87:149-52.
- Barbet, F., S. Hakiki, C. Orssaud, S. Gerber, I. Perrault, S. Hanein, D. Ducroq, J.L. Dufier, A. Munnich, J. Kaplan, and J.M. Rozet. 2005. A third locus for dominant optic atrophy on chromosome 22q. *J Med Genet.* 42:e1.
- Bauer, M.F., S. Hofmann, W. Neupert, and M. Brunner. 2000. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* 10:25-31.
- Benz, R. 1994. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta.* 1197:167-96.
- Bereiter-Hahn, J., and M. Voth. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech.* 27:198-219.
- Berthold, J., M.F. Bauer, H.C. Schneider, C. Klaus, K. Dietmeier, W. Neupert, and M. Brunner. 1995. The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell.* 81:1085-93.
- Bette, S., H. Schlaszus, B. Wissinger, R. Meyermann, and M. Mittelbronn. 2005. OPA1, associated with autosomal dominant optic atrophy, is widely expressed in the human brain. *Acta Neuropathol (Berl).* 109:393-9.
- Bleazard, W., J.M. McCaffery, E.J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol.* 1:298-304.
- Boeke, J.D., J. Trueheart, G. Natsoulis, and G.R. Fink. 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154:164-75.
- Bonneau, D., E. Souied, S. Gerber, J.M. Rozet, E. D'Haens, H. Journal, G. Plessis, J. Weissenbach, A. Munnich, and J. Kaplan. 1995. No evidence of genetic heterogeneity in dominant optic atrophy. *J Med Genet.* 32:951-3.
- Bornhövd, C. 2006. Rolle der F1FO-ATP Synthase und der Rhomboidprotease Pcp1 für die Struktur und Funktion von Mitochondrien. In Fakultät für Chemie und Pharmazie. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Borst, P., and L.A. Grivell. 1978. The mitochondrial genome of yeast. *Cell.* 15:705-23.
- Brown, J., Jr., J.H. Fingert, C.M. Taylor, M. Lake, V.C. Sheffield, and E.M. Stone. 1997. Clinical and genetic analysis of a family affected with dominant optic atrophy (OPA1). *Arch Ophthalmol.* 115:95-9.
- Burger, G., M.W. Gray, and B.F. Lang. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 19:709-16.
- Casari, G., M. De Fusco, S. Ciarmatori, M. Zeviani, M. Mora, P. Fernandez, G. De Michele, A. Filla, S. Coccozza, R. Marconi, A. Durr, B. Fontaine, and A. Ballabio. 1998. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell.* 93:973-83.

- Catlett, N.L., and L.S. Weisman. 2000. Divide and multiply: organelle partitioning in yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 12:509-16.
- Cervený, K.L., and R.E. Jensen. 2003. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell.* 14:4126-39.
- Chacinska, A., M. Lind, A.E. Frazier, J. Dudek, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H.E. Meyer, K.N. Truscott, B. Guiard, N. Pfanner, and P. Rehling. 2005. Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell.* 120:817-29.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L.K. Sanjuan Szklarz, A. Schulze-Specking, K.N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J.* 23:3735-46.
- Chan, D.C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 125:1241-52.
- Chen, H., and D.C. Chan. 2006. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 18:453-9.
- Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 280:26185-92.
- Chen, H., S.A. Detmer, A.J. Ewald, E.E. Griffin, S.E. Fraser, and D.C. Chan. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 160:189-200.
- Chen, X.J., and R.A. Butow. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet.* 6:815-25.
- Cherry, J.M., C. Ball, S. Weng, G. Juvik, R. Schmidt, C. Adler, B. Dunn, S. Dwight, L. Riles, R.K. Mortimer, and D. Botstein. 1997. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 387:67-73.
- Cipolat, S., O. Martins de Brito, B. Dal Zilio, and L. Scorrano. 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:15927-32.
- Cipolat, S., T. Rudka, D. Hartmann, V. Costa, L. Serneels, K. Craessaerts, K. Metzger, C. Frezza, W. Annaert, L. D'Adamio, C. Derks, T. Dejaegere, L. Pellegrini, R. D'Hooge, L. Scorrano, and B. De Strooper. 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell.* 126:163-75.
- Claros, M.G., and P. Vincens. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem.* 241:779-86.
- Craig, E.A., C. Voisine, and B. Schilke. 1999. Mitochondrial iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem.* 380:1167-73.
- D'Aurelio, M., C.D. Gajewski, M.T. Lin, W.M. Mauck, L.Z. Shao, G. Lenaz, C.T. Moraes, and G. Manfredi. 2004. Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Hum Mol Genet.* 13:3171-9.
- D'Silva, P.D., B. Schilke, W. Walter, A. Andrew, and E.A. Craig. 2003. J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13839-44.
- D'Silva, P.R., B. Schilke, W. Walter, and E.A. Craig. 2005. Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12419-24.
- Daniel, N.N., and S.J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell.* 116:205-19.
- De Vos, K.J., V.J. Allan, A.J. Grierson, and M.P. Sheetz. 2005. Mitochondrial function

- and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol.* 15:678-83.
- Dekker, P.J., F. Martin, A.C. Maarse, U. Bomer, H. Muller, B. Guiard, M. Meijer, J. Rassow, and N. Pfanner. 1997. The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *Embo J.* 16:5408-19.
- Delettre, C., J.M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, and C.P. Hamel. 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet.* 109:584-91.
- Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelles, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C.P. Hamel. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 26:207-10.
- Delettre, C., G. Lenaers, L. Pelloquin, P. Belenguer, and C.P. Hamel. 2002. OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol Genet Metab.* 75:97-107.
- Dimauro, S., and G. Davidzon. 2005. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med.* 37:222-32.
- DiMauro, S., and E.A. Schon. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med.* 348:2656-68.
- Dimmer, K.S., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 13:847-53.
- Dimmer, K.S., and L. Scorrano. 2006. (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda).* 21:233-41.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-45.
- Duvezin-Caubet, S., R. Jagasia, J. Wagener, S. Hofmann, A. Trifunovic, A. Hansson, A. Chomyn, M.F. Bauer, G. Attardi, N.G. Larsson, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2006. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem.*
- Duvezin-Caubet, S., M. Koppen, J. Wagener, M. Zick, L. Israel, A. Bernacchia, R. Jagasia, E.I. Rugarli, A. Imhof, W. Neupert, T. Langer, and A.S. Reichert. 2007. OPA1 Processing Reconstituted in Yeast Depends on the Subunit Composition of the m-AAA Protease in Mitochondria. *Mol Biol Cell.*
- Eiberg, H., B. Kjer, P. Kjer, and T. Rosenberg. 1994. Dominant optic atrophy (OPA1) mapped to chromosome 3q region. I. Linkage analysis. *Hum Mol Genet.* 3:977-80.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak, and G. von Heijne. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 300:1005-16.
- Endo, T., H. Yamamoto, and M. Esaki. 2003. Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci.* 116:3259-67.
- Escobar-Henriques, M., and T. Langer. 2006. Mitochondrial shaping cuts. *Biochim Biophys Acta.* 1763:422-9.
- Esser, K., B. Tursun, M. Ingenhoven, G. Michaelis, and E. Pratje. 2002. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J Mol Biol.* 323:835-43.

- Fekkes, P., K.A. Shepard, and M.P. Yaffe. 2000. Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J Cell Biol.* 151:333-40.
- Ferre, M., P. Amati-Bonneau, Y. Tourmen, Y. Malthiery, and P. Reynier. 2005. eOPA1: an online database for OPA1 mutations. *Hum Mutat.* 25:423-8.
- Ferreirinha, F., A. Quattrini, M. Pirozzi, V. Valsecchi, G. Dina, V. Broccoli, A. Auricchio, F. Piemonte, G. Tozzi, L. Gaeta, G. Casari, A. Ballabio, and E.I. Rugarli. 2004. Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest.* 113:231-42.
- Finsterer, J. 2004. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol.* 11:163-86.
- Foury, F., and M. Kucej. 2002. Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol.* 6:106-11.
- Foury, F., T. Roganti, N. Lecrenier, and B. Purnelle. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440:325-31.
- Frazier, A.E., J. Dudek, B. Guiard, W. Voos, Y. Li, M. Lind, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H.E. Meyer, V. Bilanchone, M.G. Cumsky, K.N. Truscott, N. Pfanner, and P. Rehling. 2004. Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol.* 11:226-33.
- Frey, T.G., and C.A. Mannella. 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25:319-24.
- Frezza, C., S. Cipolat, O. Martins de Brito, M. Micaroni, G.V. Beznoussenko, T. Rudka, D. Bartoli, R.S. Polishuck, N.N. Danial, B. De Strooper, and L. Scorrano. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 126:177-89.
- Fritz, S., D. Rapaport, E. Klanner, W. Neupert, and B. Westermann. 2001. Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol.* 152:683-92.
- Fukushima, N.H., E. Brisch, B.R. Keegan, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 2001. The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell.* 12:2756-66.
- Geissler, A., A. Chacinska, K.N. Truscott, N. Wiedemann, K. Brandner, A. Sickmann, H.E. Meyer, C. Meisinger, N. Pfanner, and P. Rehling. 2002. The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell.* 111:507-18.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, and R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 11:355-60.
- Gilkerson, R.W., J.M. Selker, and R.A. Capaldi. 2003. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 546:355-8.
- Gillis, L., and E. Kaye. 2002. Diagnosis and management of mitochondrial diseases. *Pediatr Clin North Am.* 49:203-19.
- Glick, B.S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R.L. Hallberg, and G. Schatz. 1992. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell.* 69:809-22.
- Gottlieb, E. 2006. OPA1 and PARL keep a lid on apoptosis. *Cell.* 126:27-9.
- Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science.* 283:1476-81.
- Griffin, E.E., and D.C. Chan. 2006. Domain interactions within Fzo1 oligomers are

- essential for mitochondrial fusion. *J Biol Chem.* 281:16599-606.
- Griffin, E.E., J. Graumann, and D.C. Chan. 2005. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol.* 170:237-48.
- Griparic, L., T. Kanazawa, and A.M. van der Bliek. 2007. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol.* 178:757-64.
- Griparic, L., N.N. van der Wel, I.J. Orozco, P.J. Peters, and A.M. van der Bliek. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem.* 279:18792-8.
- Guan, K., L. Farh, T.K. Marshall, and R.J. Deschenes. 1993. Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Curr Genet.* 24:141-8.
- Guda, C., E. Fahy, and S. Subramaniam. 2004a. MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins. *Bioinformatics.* 20:1785-94.
- Guda, C., P. Guda, E. Fahy, and S. Subramaniam. 2004b. MITOPRED: a web server for the prediction of mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 32:W372-4.
- Guo, X., G.T. Macleod, A. Wellington, F. Hu, S. Panchumarthi, M. Schoenfield, L. Marin, M.P. Charlton, H.L. Atwood, and K.E. Zinsmaier. 2005. The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses. *Neuron.* 47:379-93.
- Guthrie, C., and G.R. Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* 194:1-270.
- Harder, Z., R. Zunino, and H. McBride. 2004. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol.* 14:340-5.
- Hayashi, J., S. Ohta, A. Kikuchi, M. Takemitsu, Y. Goto, and I. Nonaka. 1991. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10614-8.
- Heim, R., and R.Y. Tsien. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol.* 6:178-82.
- Herlan, M., C. Bornhovd, K. Hell, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol.* 165:167-73.
- Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 278:27781-8.
- Hermann, G.J., J.W. Thatcher, J.P. Mills, K.G. Hales, M.T. Fuller, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol.* 143:359-73.
- Herrmann, J.M., and K. Hell. 2005. Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 30:205-11.
- Herrmann, J.M., and W. Neupert. 2000. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol.* 3:210-4.
- Hoogenraad, N.J., L.A. Ward, and M.T. Ryan. 2002. Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1592:97-105.
- Horst, M., S. Hilfiker-Rothenfluh, W. Oppliger, and G. Schatz. 1995. Dynamic

- interaction of the protein translocation systems in the inner and outer membranes of yeast mitochondria. *Embo J.* 14:2293-7.
- Isaya, G., D. Miklos, and R.A. Rollins. 1994. MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 14:5603-16.
- Ishihara, N., Y. Eura, and K. Mihara. 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 117:6535-46.
- Ishihara, N., Y. Fujita, T. Oka, and K. Mihara. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *Embo J.* 25:2966-77.
- Jacobs, E.E., and D.R. Sanadi. 1960. The reversible removal of cytochrome c from mitochondria. *J Biol Chem.* 235:531-4.
- James, D.I., P.A. Parone, Y. Mattenberger, and J.C. Martinou. 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem.* 278:36373-9.
- Jansen, R.P., and K. de Boer. 1998. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol.* 145:81-8.
- Jensen, R.E., and C.D. Dunn. 2002. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta.* 1592:25-34.
- Johnson, D.C., D.R. Dean, A.D. Smith, and M.K. Johnson. 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem.* 74:247-81.
- Johnston, R.L., M.A. Burdon, D.J. Spalton, S.P. Bryant, J.T. Behnam, and M.J. Seller. 1997. Dominant optic atrophy, Kjer type. Linkage analysis and clinical features in a large British pedigree. *Arch Ophthalmol.* 115:100-3.
- Jones, B.A., and W.L. Fangman. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6:380-9.
- Ju, W.K., T. Misaka, Y. Kushnareva, S. Nakagomi, N. Agarwal, Y. Kubo, S.A. Lipton, and E. Bossy-Wetzel. 2005. OPA1 expression in the normal rat retina and optic nerve. *J Comp Neurol.* 488:1-10.
- Kamei, S., M. Chen-Kuo-Chang, C. Cazevieille, G. Lenaers, A. Olichon, P. Belenguer, G. Roussignol, N. Renard, M. Eybalin, A. Michelin, C. Delettre, P. Brabet, and C.P. Hamel. 2005. Expression of the Opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:4288-94.
- Karren, M.A., E.M. Coonrod, T.K. Anderson, and J.M. Shaw. 2005. The role of Fis1p-Mdv1p interactions in mitochondrial fission complex assembly. *J Cell Biol.* 171:291-301.
- Ke, T., S.W. Nie, Q.B. Yang, J.P. Liu, L.N. Zhou, X. Ren, J.Y. Liu, Q. Wang, and M.G. Liu. 2006. The G401D mutation of OPA1 causes autosomal dominant optic atrophy and hearing loss in a Chinese family. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 23:481-5.
- Kerrison, J.B., V.J. Arnould, J.M. Ferraz Sallum, M.R. Vagefi, M.M. Barmada, Y. Li, D. Zhu, and I.H. Maumenee. 1999. Genetic heterogeneity of dominant optic atrophy, Kjer type: Identification of a second locus on chromosome 18q12.2-12.3. *Arch Ophthalmol.* 117:805-10.
- Kjer, B., H. Eiberg, P. Kjer, and T. Rosenberg. 1996. Dominant optic atrophy mapped to chromosome 3q region. II. Clinical and epidemiological aspects. *Acta Ophthalmol Scand.* 74:3-7.
- Kjer, P. 1959. Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmol Suppl.* 164:1-147.

- Koehler, C.M. 2004. New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:309-35.
- Koehler, C.M., E. Jarosch, K. Tokatlidis, K. Schmid, R.J. Schweyen, and G. Schatz. 1998. Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science.* 279:369-73.
- Koonin, E.V., K.S. Makarova, I.B. Rogozin, L. Davidovic, M.C. Letellier, and L. Pellegrini. 2003. The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol.* 4:R19.
- Koppen, M., M.D. Metodiev, G. Casari, E.I. Rugarli, and T. Langer. 2006. Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Biol.*
- Koshiba, T., S.A. Detmer, J.T. Kaiser, H. Chen, J.M. McCaffery, and D.C. Chan. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science.* 305:858-62.
- Kozany, C., D. Mokranjac, M. Sichting, W. Neupert, and K. Hell. 2004. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol.* 11:234-41.
- Kraytsberg, Y., M. Schwartz, T.A. Brown, K. Ebralidse, W.S. Kunz, D.A. Clayton, J. Vissing, and K. Khrapko. 2004. Recombination of human mitochondrial DNA. *Science.* 304:981.
- Kremmidiotis, G., A.E. Gardner, C. Settasatian, A. Savoia, G.R. Sutherland, and D.F. Callen. 2001. Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein. *Genomics.* 76:58-65.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E.L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305:567-80.
- Kurland, C.G., and S.G. Andersson. 2000. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:786-820.
- Labrousse, A.M., M.D. Zappaterra, D.A. Rube, and A.M. van der Blik. 1999. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell.* 4:815-26.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E.

- Uberbacher, M. Frazier, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Legros, F., A. Lombes, P. Frachon, and M. Rojo. 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*. 13:4343-54.
- Lenaers, G., L. Pelloquin, A. Olichon, L.J. Emorine, E. Guillou, C. Delettre, C.P. Hamel, B. Ducommun, and P. Belenguer. 2002. What similarity between human and fission yeast proteins is required for orthology? *Yeast*. 19:1125-6.
- Leonhard, K., J.M. Herrmann, R.A. Stuart, G. Mannhaupt, W. Neupert, and T. Langer. 1996. AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *Embo J*. 15:4218-29.
- Lerman-Sagie, T., P. Rustin, D. Lev, M. Yanoov, E. Leshinsky-Silver, A. Sagie, T. Ben-Gal, and A. Munnich. 2001. Dramatic improvement in mitochondrial cardiomyopathy following treatment with idebenone. *J Inherit Metab Dis*. 24:28-34.
- Li, C., G. Kosmorsky, K. Zhang, B.J. Katz, J. Ge, and E.I. Traboulsi. 2005. Optic atrophy and sensorineural hearing loss in a family caused by an R445H OPA1 mutation. *Am J Med Genet A*. 138:208-11.
- Li, Z., K. Okamoto, Y. Hayashi, and M. Sheng. 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*. 119:873-87.
- Lill, R., and U. Muhlenhoff. 2005. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*. 30:133-41.
- Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86:147-57.
- Lunkes, A., U. Hartung, C. Magarino, M. Rodriguez, A. Palmero, L. Rodriguez, L. Heredero, J. Weissenbach, J. Weber, and G. Auburger. 1995. Refinement of the OPA1 gene locus on chromosome 3q28-q29 to a region of 2-8 cM, in one Cuban pedigree with autosomal dominant optic atrophy type Kjer. *Am J Hum Genet*. 57:968-70.
- Lyle, W. 1990. Genetic risks. *Waterloo, Ontario: University of Waterloo Press*.
- Mabuchi, F., S. Tang, K. Kashiwagi, Z. Yamagata, H. Iijima, and S. Tsukahara. 2007. The OPA1 gene polymorphism is associated with normal tension and high tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 143:125-130.
- Mannella, C.A., D.R. Pfeiffer, P.C. Bradshaw, Moraru, II, B. Slepchenko, L.M. Loew, C.E. Hsieh, K. Buttle, and M. Marko. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*. 52:93-100.
- McFarland, R., R.W. Taylor, and D.M. Turnbull. 2002. The neurology of mitochondrial DNA disease. *Lancet Neurol*. 1:343-51.
- McQuibban, G.A., J.R. Lee, L. Zheng, M. Juusola, and M. Freeman. 2006. Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects Drosophila lifespan and neuronal function. *Curr Biol*. 16:982-9.
- McQuibban, G.A., S. Saurya, and M. Freeman. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*. 423:537-41.
- Meeusen, S., R. DeVay, J. Block, A. Cassidy-Stone, S. Wayson, J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2006. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*. 127:383-95.
- Meeusen, S., J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2004. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*. 305:1747-52.

- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*. 121:1059-69.
- Messerschmitt, M., S. Jakobs, F. Vogel, S. Fritz, K.S. Dimmer, W. Neupert, and B. Westermann. 2003. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*. 160:553-64.
- Michaelis, G., K. Esser, B. Tursun, J.P. Stohn, S. Hanson, and E. Pratje. 2005. Mitochondrial signal peptidases of yeast: the rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome C peroxidase. *Gene*. 354:58-63.
- Miller, J.F., W.J. Dower, and L.S. Tompkins. 1988. High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:856-60.
- Misaka, T., T. Miyashita, and Y. Kubo. 2002. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J Biol Chem*. 277:15834-42.
- Misaka, T., M. Murate, K. Fujimoto, and Y. Kubo. 2006. The dynamin-related mouse mitochondrial GTPase OPA1 alters the structure of the mitochondrial inner membrane when exogenously introduced into COS-7 cells. *Neurosci Res*. 55:123-33.
- Mokranjac, D., S.A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S.C. Hoppins, F.E. Nargang, W. Neupert, and K. Hell. 2003a. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J*. 22:816-25.
- Mokranjac, D., D. Popov-Celeketic, K. Hell, and W. Neupert. 2005. Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem*. 280:23437-40.
- Mokranjac, D., M. Sichting, W. Neupert, and K. Hell. 2003b. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J*. 22:4945-56.
- Morris, R.L., and P.J. Hollenbeck. 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol*. 131:1315-26.
- Mozdy, A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol*. 151:367-80.
- Nakada, K., K. Inoue, T. Ono, K. Isobe, A. Ogura, Y.I. Goto, I. Nonaka, and J.I. Hayashi. 2001. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med*. 7:934-40.
- Nakai, K., and P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*. 24:34-6.
- Nakamura, N., Y. Kimura, M. Tokuda, S. Honda, and S. Hirose. 2006. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep*. 7:1019-22.
- Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:555-65.
- Newman, N.J. 2005. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *Am J Ophthalmol*. 140:517-23.
- Nolden, M., S. Ehses, M. Koppen, A. Bernacchia, E.I. Rugarli, and T. Langer. 2005. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*. 123:277-89.
- Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997.

- Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*. 8:1233-42.
- Nunnari, J., E.D. Wong, S. Meeusen, and J.A. Wagner. 2002. Studying the behavior of mitochondria. *Methods Enzymol*. 351:381-93.
- Oka, T., and K. Mihara. 2005. A railroad switch in mitochondrial protein import. *Mol Cell*. 18:145-6.
- Okamoto, K., and J.M. Shaw. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 39:503-36.
- Olichon, A., L. Baricault, N. Gas, E. Guillou, A. Valette, P. Belenguer, and G. Lenaers. 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 278:7743-6.
- Olichon, A., G. Elachouri, L. Baricault, C. Delettre, P. Belenguer, and G. Lenaers. 2006. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ*.
- Olichon, A., L.J. Emorine, E. Descoins, L. Pelloquin, L. Bricchese, N. Gas, E. Guillou, C. Delettre, A. Valette, C.P. Hamel, B. Ducommun, G. Lenaers, and P. Belenguer. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*. 523:171-6.
- Ono, T., K. Isobe, K. Nakada, and J.I. Hayashi. 2001. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet*. 28:272-5.
- Otsuga, D., B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*. 143:333-49.
- Paschen, S.A., W. Neupert, and D. Rapaport. 2005. Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 30:575-82.
- Paschen, S.A., U. Rothbauer, K. Kaldi, M.F. Bauer, W. Neupert, and M. Brunner. 2000. The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo J*. 19:6392-400.
- Payne, M., Z. Yang, B.J. Katz, J.E. Warner, C.J. Weight, Y. Zhao, E.D. Pearson, R.L. Treft, T. Hillman, R.J. Kennedy, F.M. Meire, and K. Zhang. 2004. Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in OPA1. *Am J Ophthalmol*. 138:749-55.
- Pelloquin, L., P. Belenguer, Y. Menon, and B. Ducommun. 1998. Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem Biophys Res Commun*. 251:720-6.
- Perkins, G.A., and T.G. Frey. 2000. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*. 31:97-111.
- Perkins, G.A., J.Y. Song, L. Tarsa, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, and T.G. Frey. 1998. Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr*. 30:431-42.
- Pesch, U.E., J.E. Fries, S. Bette, H. Kalbacher, B. Wissinger, C. Alexander, and K. Kohler. 2004. 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*. 45:4217-25.
- Pfanner, N., N. Wiedemann, C. Meisinger, and T. Lithgow. 2004. Assembling the

- mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol.* 11:1044-8.
- Powell, B.L., C. Toomes, S. Scott, A. Yeung, N.J. Marchbank, P.G. Spry, R. Lumb, C.F. Inglehearn, and A.J. Churchill. 2003. Polymorphisms in OPA1 are associated with normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 9:460-4.
- Praefcke, G.J., and H.T. McMahon. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:133-47.
- Prince, F.P. 2002. Lamellar and tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae present in steroid-producing cells. *Mitochondrion.* 1:381-9.
- Rapaport, D., M. Brunner, W. Neupert, and B. Westermann. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 273:20150-5.
- Rehling, P., K. Brandner, and N. Pfanner. 2004. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:519-30.
- Reichert, A.S., and W. Neupert. 2004. Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet.* 20:555-62.
- Rojo, M., F. Legros, D. Chateau, and A. Lombes. 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci.* 115:1663-74.
- Rothstein, R.J., and F. Sherman. 1980. Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics.* 94:871-89.
- Rugarli, E.I., and T. Langer. 2006. Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia. *Trends Mol Med.* 12:262-9.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-4.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.
- Santel, A., and M.T. Fuller. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 114:867-74.
- Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* 283:1488-93.
- Satoh, M., T. Hamamoto, N. Seo, Y. Kagawa, and H. Endo. 2003. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:482-93.
- Schapira, A.H. 2006. Mitochondrial disease. *Lancet.* 368:70-82.
- Schapira, A.H., and H.R. Cock. 1999. Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Eur J Clin Invest.* 29:886-98.
- Scheffler, I.E. 2001. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev.* 49:3-26.
- Seller, M.J., J.T. Behnam, C.M. Lewis, R.L. Johnston, M.A. Burdon, and D.J. Spalton. 1997. Linkage studies in dominant optic atrophy, Kjer type: possible evidence for heterogeneity. *J Med Genet.* 34:967-72.
- Sesaki, H., C.D. Dunn, M. Iijima, K.A. Shepard, M.P. Yaffe, C.E. Machamer, and R.E. Jensen. 2006. Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J Cell Biol.*

173:651-8.

- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol.* 147:699-706.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2001. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 152:1123-34.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2004. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem.* 279:28298-303.
- Sesaki, H., S.M. Southard, A.E. Hobbs, and R.E. Jensen. 2003a. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:276-83.
- Sesaki, H., S.M. Southard, M.P. Yaffe, and R.E. Jensen. 2003b. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell.* 14:2342-56.
- Shepard, K.A., and M.P. Yaffe. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol.* 144:711-20.
- Shoubridge, E.A. 2000. Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum Reprod.* 15 Suppl 2:229-34.
- Sikorski, R.S., and J.D. Boeke. 1991. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.* 194:302-18.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Small, I., N. Peeters, F. Legeai, and C. Lurin. 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics.* 4:1581-90.
- Smirnova, E., L. Griparic, D.L. Shurland, and A.M. van der Bliek. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 12:2245-56.
- Song, Z., H. Chen, M. Fiket, C. Alexander, and D.C. Chan. 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol.* 178:749-55.
- Sonnhammer, E.L., G. von Heijne, and A. Krogh. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 6:175-82.
- St John, J., D. Sakkas, K. Dimitriadi, A. Barnes, V. Maclin, J. Ramey, C. Barratt, and C. De Jonge. 2000. Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet.* 355:200.
- Steglich, G., W. Neupert, and T. Langer. 1999. Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol.* 19:3435-42.
- Stojanovski, D., O.S. Koutsopoulos, K. Okamoto, and M.T. Ryan. 2004. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci.* 117:1201-10.
- Stowers, R.S., L.J. Megeath, J. Gorska-Andrzejak, I.A. Meinertzhagen, and T.L. Schwarz. 2002. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron.* 36:1063-77.
- Sutovsky, P., R.D. Moreno, J. Ramalho-Santos, T. Dominko, C. Simerly, and G. Schatten. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature.* 402:371-2.

- Sutovsky, P., K. Van Leyen, T. McCauley, B.N. Day, and M. Sutovsky. 2004. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online*. 8:24-33.
- Suzuki, M., S.Y. Jeong, M. Karbowski, R.J. Youle, and N. Tjandra. 2003. The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol*. 334:445-58.
- Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2005. Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett*. 579:179-84.
- Tieu, Q., and J. Nunnari. 2000. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol*. 151:353-66.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 24:145-9.
- Truscott, K.N., W. Voos, A.E. Frazier, M. Lind, Y. Li, A. Geissler, J. Dudek, H. Muller, A. Sickmann, H.E. Meyer, C. Meisinger, B. Guiard, P. Rehling, and N. Pfanner. 2003. A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*. 163:707-13.
- Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T.A. Mansfield, R.S. Judson, J.R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, and J.M. Rothberg. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 403:623-7.
- van der Bliek, A.M., and C.M. Koehler. 2003. A mitochondrial rhomboid protease. *Dev Cell*. 4:769-70.
- van der Laan, M., A. Chacinska, M. Lind, I. Perschil, A. Sickmann, H.E. Meyer, B. Guiard, C. Meisinger, N. Pfanner, and P. Rehling. 2005. Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Mol Cell Biol*. 25:7449-58.
- van der Laan, M., M. Rissler, and P. Rehling. 2006. Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS Yeast Res*. 6:849-61.
- Varadi, A., L.I. Johnson-Cadwell, V. Cirulli, Y. Yoon, V.J. Allan, and G.A. Rutter. 2004. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci*. 117:4389-400.
- Verstreken, P., C.V. Ly, K.J. Venken, T.W. Koh, Y. Zhou, and H.J. Bellen. 2005. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*. 47:365-78.
- Votruba, M., F.W. Fitzke, G.E. Holder, A. Carter, S.S. Bhattacharya, and A.T. Moore. 1998a. Clinical features in affected individuals from 21 pedigrees with dominant optic atrophy. *Arch Ophthalmol*. 116:351-8.
- Votruba, M., A.T. Moore, and S.S. Bhattacharya. 1997. Genetic refinement of dominant optic atrophy (OPA1) locus to within a 2 cM interval of chromosome 3q. *J Med Genet*. 34:117-21.
- Votruba, M., A.T. Moore, and S.S. Bhattacharya. 1998b. Demonstration of a founder effect and fine mapping of dominant optic atrophy locus on 3q28-qter by linkage disequilibrium method: a study of 38 British Isles pedigrees. *Hum*

- Genet.* 102:79-86.
- Votruba, M., D. Thiselton, and S.S. Bhattacharya. 2003. Optic disc morphology of patients with OPA1 autosomal dominant optic atrophy. *Br J Ophthalmol.* 87:48-53.
- Wallace, D.C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 39:359-407.
- Wang, A.G., M.J. Fann, H.Y. Yu, and M.Y. Yen. 2006. OPA1 expression in the human retina and optic nerve. *Exp Eye Res.* 83:1171-8.
- Webb, C.T., M.A. Gorman, M. Lazarou, M.T. Ryan, and J.M. Gulbis. 2006. Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell.* 21:123-33.
- Westermann, B., and W. Neupert. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16:1421-7.
- Wiedemann, N., A.E. Frazier, and N. Pfanner. 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem.* 279:14473-6.
- Wiedemann, N., N. Pfanner, and A. Chacinska. 2006. Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Mol Cell.* 21:145-8.
- Williamson, D. 2002. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet.* 3:475-81.
- Wong, E.D., J.A. Wagner, S.W. Gorsich, J.M. McCaffery, J.M. Shaw, and J. Nunnari. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol.* 151:341-52.
- Wong, E.D., J.A. Wagner, S.V. Scott, V. Okreglak, T.J. Holewinski, A. Cassidy-Stone, and J. Nunnari. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 160:303-11.
- Woo, S.J., D.M. Kim, J.Y. Kim, S.S. Park, H.S. Ko, and T. Yoo. 2004. Investigation of the association between OPA1 polymorphisms and normal-tension glaucoma in Korea. *J Glaucoma.* 13:492-5.
- Yaffe, M.P. 2003. The cutting edge of mitochondrial fusion. *Nat Cell Biol.* 5:497-9.
- Yaffe, M.P., and G. Schatz. 1984. Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:4819-23.
- Yamamoto, H., M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo. 2002. Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell.* 111:519-28.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones, and X. Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275:1129-32.
- Yang, M., R.E. Jensen, M.P. Yaffe, W. Oppliger, and G. Schatz. 1988. Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. *Embo J.* 7:3857-62.
- Yao, W., X. Jiao, J.F. Hejtmancik, M.C. Leske, A. Hennis, and B. Nemesure. 2006. Evaluation of the association between OPA1 polymorphisms and primary open-angle glaucoma in Barbados families. *Mol Vis.* 12:649-54.
- Yoneda, M., T. Miyatake, and G. Attardi. 1994. Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct

- organelles. *Mol Cell Biol.* 14:2699-712.
- Yoon, Y., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol.* 23:5409-20.
- Zuchner, S., I.V. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E.L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P.D. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M.A. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battaloglu, A.V. Polyakov, V. Timmerman, J.M. Schroder, and J.M. Vance. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 36:449-51.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Patente und Veröffentlichungen:

- Reichert, A.S., S. Duvezin-Caubet, J. Wagener, S. Hofmann, and W. Neupert. Erfindung wurde von der LMU München in Anspruch genommen und wird durch Bayern Patent GmbH und Vossius & Partner, Patentanwälte, München, zur Patentanmeldung eingereicht. Internationales Publikationsdatum ist der 29.11.2007 (WO/2007/134818). Erteiltes Prioritätsdatum durch die Behörden in den USA ist der 18.5.2006. Method for diagnosing mitochondrial dysfunction.
- Reichert, A.S., S. Duvezin-Caubet, J. Wagener, M. Zick, T. Langer, M. Koppen, and W. Neupert. Erfindung wurde zur Patentanmeldung eingereicht. Prioritätsdatum erteilt durch die Behörden in den USA ist der 3.7.2007. Method for treating diseases related to mitochondrial dysfunction.
- Duvezin-Caubet, S., R. Jagasia, J. Wagener, S. Hofmann, A. Trifunovic, A. Hansson, A. Chomyn, M.F. Bauer, G. Attardi, N.G. Larsson, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2006. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem.*
- Duvezin-Caubet, S.*, M. Koppen*, J. Wagener*, M. Zick, L. Israel, A. Bernacchia, R. Jagasia, E.I. Rugarli, A. Imhof, W. Neupert, T. Langer, and A.S. Reichert. 2007. OPA1 Processing Reconstituted in Yeast Depends on the Subunit Composition of the m-AAA Protease in Mitochondria. *Mol Biol Cell.*

*geteilte Erstautorschaft in alphabetischer Reihenfolge

7 Abkürzungen

AAA	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
AFG3L	<i>ATPase family gene 3-like</i>
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon
Ccp1	Cytochrom <i>c</i> -Peroxidase
GFP	Grün fluoreszierende Protein
HeLa-Zellen	Immortalisierte humane Zelllinie der Spenderin Henrietta Lacks
<i>i</i> -AAA-Protease	AAA-Protease des Intermembranraums
kbp	Kilo-Basenpaare
Leu	Leucin
<i>m</i> -AAA-Protease	AAA-Protease der Matrix
Mgm1	<i>Mitochondrial genome maintenance 1</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i>
o-Phe	1,10-Phenanthrolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARL	<i>Presenilins-Associated Rhomboid-Like Protein</i>
Pcp1	<i>Processing of Cytochrome c peroxidase 1</i>
RefSeq	Referenz Sequenz von NCBI
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SPG7	Paraplegin-Gen
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	<u><i>Translocase of the inner Membrane</i></u>
TOM	<u><i>Translocase of the outer Membrane</i></u>
Trp	Tryptophan
Ura	Uracil
WT	Wildtyp

8 Danksagung

Mein Dank geht an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Übernahme und Betreuung der vorliegenden Arbeit. Die Zeit, die ich neben meinem Studium und auch danach in seinem Institut verbringen durfte, wird mit stets in positiver Erinnerung bleiben.

Herrn Dr. Andreas Reichert danke ich ebenfalls für die Betreuung dieser Arbeit und für das Verständnis, das er als Naturwissenschaftler einem Medizindoktoranden entgegenbrachte. Er begeisterte mich in zahllosen interessanten Diskussionen in hervorragender Weise für die grundlegenden wissenschaftlichen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Organisation und Betreuung des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ (FöFoLe), durch dessen Unterstützung und in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstand.

Special thanks go to Dr. Stéphane Duvezin-Caubet with whom I teamed up in friendship during and after this work. I always enjoyed working with him.

Dies gilt auch für Michael Zick, der ebenfalls als Teilnehmer des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ Teil unserer Arbeitsgruppe wurde und mich in meiner Arbeit sehr unterstützte.

Weiterhin möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für das exzellente Arbeitsklima, die wissenschaftlichen Diskussionen und die gegenseitige Unterstützung danken, darunter besonders Christiane Kotthoff, Anja Schäfer, Nadine Rehn, Regina Rabel sowie Dr. Mark Herlan, Dr. Carsten Bornhövd und Dr. Vincent Soubannier.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die äußerst kollegiale Zusammenarbeit, die eindeutig ein „Wir-Gefühl“ aufkommen ließ. Besonders danke ich hierunter Dr. Soledad Funes und Dr. Martin Sichtung für ihre über die wissenschaftliche Arbeit hinausgegangene Unterstützung und Freundschaft.

Zuletzt möchte ich den Personen danken, die es mir durch ihre langjährige Geduld, Unterstützung und ihr Verständnis erst möglich gemacht haben, diese Arbeit zu beginnen, durchzuführen und zu beenden: meinen Eltern, meinen Geschwistern Pia und Martina sowie Nikola Mesecke.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johannes Nikolaus Wagener
Geburtsdatum: 30.11.1978
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1987 – 1991 Besuch der Grundschule Südliche Auffahrtsallee in München
1991 – 1992 Besuch der Hauptschule Winthirschule in München
1992 – 1999 Besuch des Nymphenburger Gymnasiums in München
1999 Abitur am Nymphenburger Gymnasiums in München

Wehrdienst:

07/1999 – 08/1999 Grundausbildung zum Sanitätssoldaten in Kempten im Allgäu
09/1999 Sanitätslehrgang in Ulm
10/1999 – 04/2000 Stabsdienst im Lazarettregiment 76 in Ulm und München

Hochschulausbildung:

04/2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
04/2002 Ärztliche Vorprüfung
11/2002 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität in München
04/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005 – 08/2005 Erstes PJ-Trimester im Institut für Klinische Radiologie, in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin und in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München

- 08/2005 – 11/2005 Zweites PJ-Trimester in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II und III des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 11/2005 – 03/2006 Drittes PJ-Trimester in der Chirurgischen Klinik - Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 05/2006 Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 08/2006 – 12/2006 Gastwissenschaftler am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 01/2007 Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Stipendien:

Teilnehmer des zweiten Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München im Jahre 2002

Weitere Veröffentlichungen:

Spjuth O., T. Helmus, E.L. Willighagen, S. Kuhn, M. Eklund, J. Wagener, P. Murray-Rust, C. Steinbeck, J.W. Wikberg. 2007. Bioclipse: an open source workbench for chemo- and bioinformatics. *BMC Bioinformatics*. 8:59.