

**M. Sc. Anastasia Galvita**

**Titel: Mitochondrial localization of two brain proteins, p42<sup>IP4</sup>/centaurin- $\alpha$ 1/ADAP1 and CNP, and their involvement in regulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>**

**Zusammenfassung:**

Verschiedene in der Literatur beschriebene Befunde deuten auf die Bedeutung des gehirnspezifischen Proteins p42<sup>IP4</sup> bei neurodegenerativen/neuroprotektiven Prozessen hin. p42<sup>IP4</sup> wird auch als Centaurin  $\alpha$ -1, und nach einem neueren Vorschlag als ADAP1 bezeichnet. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war aufzuklären, ob p42<sup>IP4</sup> eine Rolle bei Neuroprotektion oder Zelltod spielt.

In einem ersten Ansatz wurden die Auswirkungen der Überexpression von p42<sup>IP4</sup> auf die induzierte Apoptose untersucht. Dazu wurde die Mäuse-Neuroblastoma-Zelllinie N2a eingesetzt. Der Nachweis der Apoptose in den N2a-Zellen erfolgte mittels Caspase-3-Assay, DNA-Fragmentierung und Durchflusszytometrie. Hierbei ergaben sich keine Hinweise auf eine direkte Beteiligung von p42<sup>IP4</sup> an der Apoptose. Wir konnten aber feststellen, dass die Überexpression von p42<sup>IP4</sup> einen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus hat. In den p42<sup>IP4</sup> überexprimierenden Zellen kam es zu einer Verschiebung des Anteils der Zellen von der G2-Phase zur S-Phase.

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase und beim Ca<sup>2+</sup>-Signalling. Bei der Überladung von Zellen mit Ca<sup>2+</sup> können Mitochondrien große Menge an Ca<sup>2+</sup> aufnehmen, was in der Folge zur Öffnung der Permeabilitätstransitions-pore (PTP) führen kann. Die Beteiligung einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PTP an vielen zu Zelltod und Gewebsschädigungen führenden Vorgängen konnte gezeigt werden. Aber der genaue Mechanismus der PTP ist noch weitgehend unbekannt. Daher ist die Suche nach neuen Proteinen und Molekülen, die an der Kontrolle der Ca<sup>2+</sup>-induzierten PTP beteiligt sind äußerst wichtig.

p42<sup>IP4</sup> wurde ursprünglich in Membranfraktionen aus Gehirn identifiziert, die auch Mitochondrien enthielten. Das Hefeprotein Gsc1p, das strukturell und funktionell mit p42<sup>IP4</sup> eng verwandt ist, ist an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie beteiligt. p42<sup>IP4</sup> interagiert mit Proteinkinase C Isoformen, für die ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation beschrieben wurde. Eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation von p42<sup>IP4</sup> wurde durch das Programm PSORTII vorhergesagt. Diese Befunde deuteten auf eine mögliche mitochondriale Lokalisation und Funktion von p42<sup>IP4</sup> hin. Daher wurde diese wichtige Fragestellung in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Wir konnten mit verschiedenen Methoden erstmals eine mitochondriale Lokalisation von p42<sup>IP4</sup> in Mitochondrien aus Rattenhirn, sowie aus N2A- und CHO-Zellen zeigen. Darüberhinaus fanden wir mittels Glutathion-S-Transferase Pull-Down-Versuchen und Koimmunopräzipitation eine Interaktion von p42<sup>IP4</sup> mit den Proteinen 2',3'-cyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP) und  $\alpha$ -Tubulin.

Wir untersuchten die Verteilung von p42<sup>IP4</sup> und CNP in den mitochondrialen Kompartimenten durch Subfraktionierung von Mitochondrien. Die Lokalisation von p42<sup>IP4</sup> und CNP in der inneren Membranfraktion und in Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Membran deuteten auf eine funktionelle Rolle beider Proteine in Mitochondrien hin. Daher wurden im Folgenden Studien zur möglichen Beteiligung von p42<sup>IP4</sup> und CNP an der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>- induzierten PTP durchgeführt. Wir etablierten eine Methode zur Isolierung von funktionell aktiven Mitochondrien aus Zellkulturen und untersuchten mitochondriale Funktionen während der Ca<sup>2+</sup>- induzierten PTP. Eine simultane Messung der Atmungsrate, des Ca<sup>2+</sup>-Transports und des mitochondrialen Membranpotenzials in Mitochondriensuspensionen erfolgte in einer offenen Messkammer. Dabei wurden selektive Elektroden für O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup> und Tetraphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>) eingesetzt. Letztere diente zur Membranpotentialmessung. Damit wurden die Geschwindigkeit des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms, die Ca<sup>2+</sup>-Kapazität und die Verzögerungszeit für die Ca<sup>2+</sup>-induzierte PTP bestimmt. Es wurden Messungen für Mitochondrien aus p42<sup>IP4</sup>-transfizierten und nichttransfizierten N2a-Zellen durchgeführt. Die Überexpression von p42<sup>IP4</sup> führte zu einer signifikanten Forcierung der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Öffnung der PTP. Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat und Inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphat, beides spezifische Liganden für p42<sup>IP4</sup>, beschleunigten die Öffnung der PTP in Mitochondrien aus N2a-Zellen. Erstaunlicherweise war dieser Einfluss der p42<sup>IP4</sup>-Liganden auf die PTP-Öffnung unabhängig von der Überexpression von p42<sup>IP4</sup>.

In Rattenhirnmitochondrien fanden wir mittels Koimmunopräzipitation eine Proteinwechselwirkung von CNP mit Modulatoren der PTP, dem Adeninnukleotid-Transporter (ANT) und dem spannungsabhängigen Anionen-Kanal (VDAC). Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass die Enzymaktivität von CNP bei der PTP-Öffnung reduziert war, während der CNP-Proteingehalt gleich blieb. Eine Beteiligung von CNP an der PTP-Regulation wurde in weiteren Experimenten bestätigt, bei denen Mitochondrien aus OLN93-Zellen, einer Oligodendrozyten-Zelllinie, verwendet wurden, bei denen CNP durch Transfektion mit siRNA herunterreguliert wurde. In den Mitochondrien aus diesen Zellen korrelierte die Reduktion der CNP-Expression mit einer Erniedrigung der Schwelle für eine

Ca<sup>2+</sup>-induzierte PTP Bildung. Des Weiteren erhöhten 2',3'-cAMP und 2',3'-cyklisches NADP, beides Substrate der CNP, die PTP Bildung in Mitochondrien aus Rattenhirn.

Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass p42<sup>IP4</sup> und CNP in Mitochondrien eine wichtige Funktion bei der Regulation mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Transportvorgänge im Gehirn ausüben. Da die Ca<sup>2+</sup>-induzierte PTP-Bildung einen wichtigen Schritt bei der Einleitung des Zelltods darstellt, könnten p42<sup>IP4</sup> und CNP an Prozessen beteiligt sein, die zu neurodegenerativen Krankheiten führen.