

Membrandynamik

Die Rolle von OPA1 bei der Fusion von Mitochondrien

ALEXANDER VON DER MALSBURG
MEDIZINISCHE BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG

Mitochondria form extensive networks that rapidly adapt to cellular demands. The formation and disassembly of these structures result from a balance between fission and fusion of the two mitochondrial membranes that are decisively controlled by Dynamin-like GTPases such as OPA1. This protein forms oligomers which mediate the fusion of the inner mitochondrial membrane by a unique mechanism that involves the generation of curvature and the extraction of cardiolipin from the lipid bilayer.

DOI: 10.1007/s12268-024-2220-z
© Der Autor 2024

■ Mitochondrien haben sich nach der Endosymbiontentheorie von α -Proteobakterien zu dynamischen Netzwerken entwickelt, welche die gesamte Zelle durchspannen. Vor allem bekannt für ihre Rolle als Energielieferanten, sind Mitochondrien nach ca. 1,6 Milliarden Jahren Ko-Evolution essenzielle Knotenpunkte des Stoffwechsels und spielen eine zentrale Rolle bei der Synthese von vielen lebenswichtigen Molekülen. Obwohl Mitochondrien im Laufe dieser Entwicklung viele bakterielle Eigenschaften verloren haben, lassen sich bis heute noch einige Relikte ihrer Herkunft nachweisen. So verfügen sie über ein eigenes

Genom sowie Ribosomen und enthalten mit Cardiolipin ein Lipid, das sich ansonsten nur in Prokaryoten nachweisen lässt.

Mitochondriale Membransysteme sind komplex und dynamisch

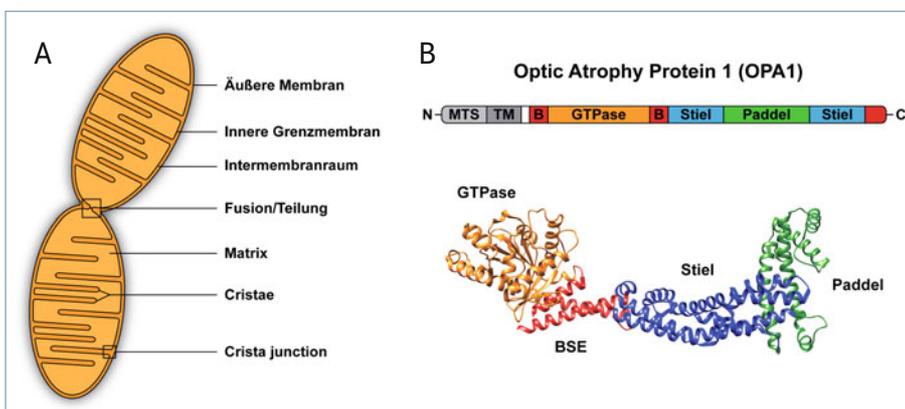
Mitochondrien verfügen über zwei Membranen, die sich in Komposition, Organisation und Funktion stark unterscheiden (**Abb. 1A**). Die poröse äußere Membran ist für kleinere Moleküle durchlässig und begrenzt das Organell. Die hoch organisierte Innenmembran umschließt die mitochondriale Matrix und bildet eine undurchlässige Diffusionsbarriere.

re. Sie lässt sich in zwei Unterbereiche einteilen: Die innere Grenzmembran verläuft parallel zur äußeren Membran und enthält Proteintranslokasen und Metabolit-Transporter, die den kontinuierlichen Austausch mit dem Zytosol orchestrieren. Demgegenüber stehen Einstülpungen der inneren Membran, die Cristae, die z. B. in Muskelzellen einen Großteil der Oberfläche der Innenmembran ausmachen und die Komplexe der Atmungskette enthalten. Die stark gekrümmten Übergänge zwischen den beiden Bereichen bezeichnet man als *crista junctions*.

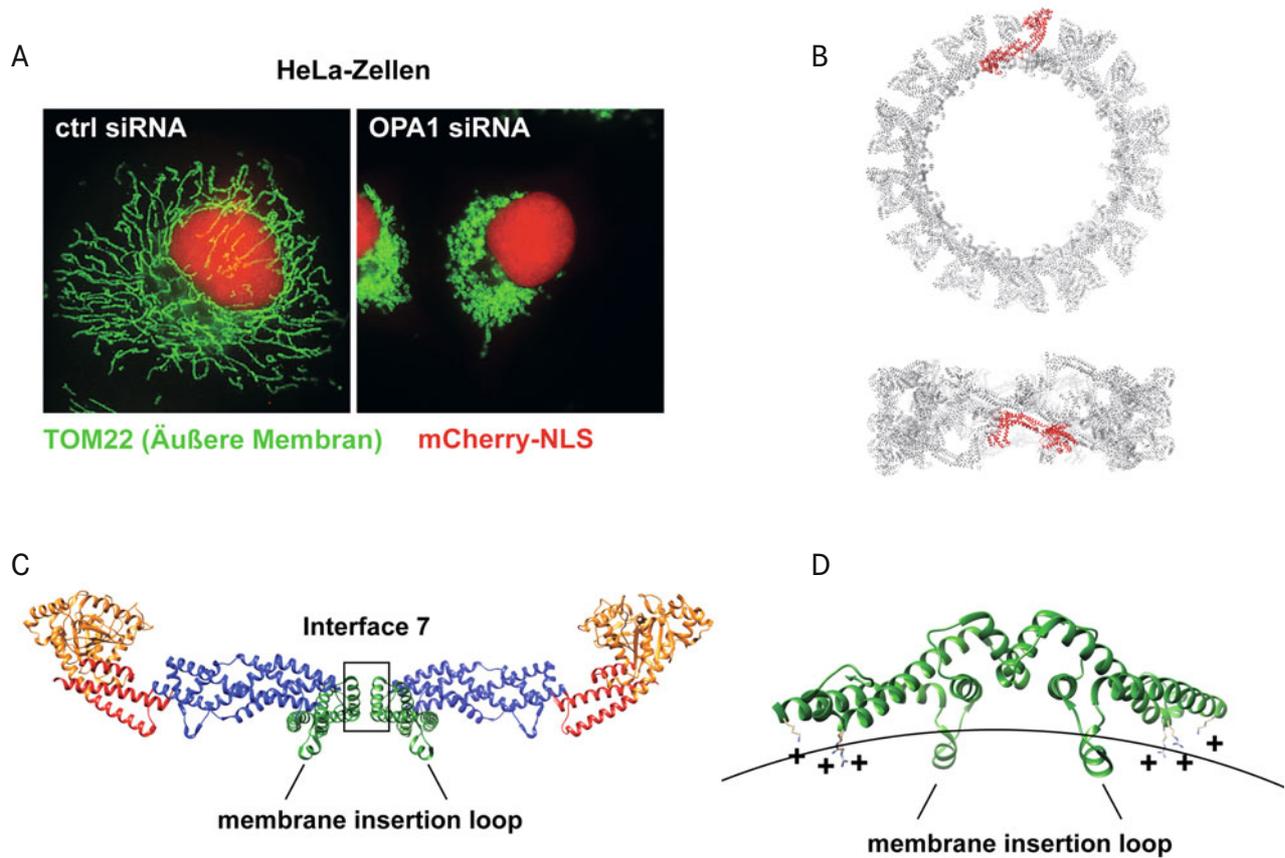
Wie ihre prokaryotischen Vorfahren vermehren sich Mitochondrien durch Teilung. In Anbetracht der komplexen Membranarchitektur ist dieser Prozess eine beachtliche Herausforderung und wird von einer Vielzahl von – teilweise noch unbekannt – Proteinen koordiniert und vermittelt. Zusätzlich haben die Organellen jedoch auch die faszinierende Fähigkeit entwickelt, bei Bedarf zu fusionieren und können so komplexe Netzwerke bilden, die sich flexibel dem Energiebedarf der Zelle anpassen können. Störungen des Gleichgewichts zwischen Fusion und Teilung, z. B. durch genetische Defekte, können im Menschen zu einer Reihe von Krankheiten führen, die sich jedoch nicht immer eindeutig einer beeinträchtigten ATP-Synthese zuordnen lassen [1].

Teilung und Fusion von Membranen durch Dynamin-ähnliche GTPasen

Für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion ist es von entscheidender Bedeutung, dass Membranen nicht spontan fusionieren, da dies die Funktion von Organellen als abgeschlossene Reaktionsräume kompromittieren würde. Tatsächlich tendieren Membranen unter physiologischen Bedingungen nicht dazu, miteinander zu verschmelzen und es bedarf einer erheblichen Menge Energie und einer drastischen Verformung der Lipiddoppelschicht, um die Fusion einzuleiten [2]. Im Falle von Mitochondrien kann beides von Proteinen aus der Familie der Dynamin-ähnlichen GTPasen bereitgestellt werden. Diese Enzyme oligomerisieren in



▲ **Abb. 1:** Die Dynamin-ähnliche GTPase OPA1 vermittelt in Mitochondrien die Fusion der inneren Membranen. **A,** Schematische Darstellung von fusionierenden Mitochondrien. **B,** Domänenstruktur von Dynamin-ähnlichen GTPasen am Beispiel von OPA1.



▲ **Abb. 2:** Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von OPA1 geben Einblicke in die molekularen Grundlagen von Oligomerisierung und Membranbindung. **A,** Knock-down von OPA1 führt zu einer Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks. **B,** helikale OPA1-Oligomere (Monomer in rot). **C,** Dimerisierung über Interface 7. **D,** Vergrößerung eines Paddel-Domänen-Dimers.

einer helikalen Anordnung an ihren Zielmembranen und erzeugen dadurch die notwendige Deformation, die für eine Fusion notwendig ist.

Die verschiedenen Eigenschaften, die für diesen Prozess benötigt werden, lassen sich dabei den verschiedenen Domänen der Proteine zuordnen. Dynamin-ähnliche GTPasen verfügen über eine Membran-bindende Domäne, die innerhalb der Familie am wenigsten konserviert ist und die Affinität für die Zielmembran bestimmt. Eine Stieldomäne ermöglicht die Formierung von meist helikalen Oligomeren, welche die Membran von allen Seiten umschließen und so in Form halten. Die N-terminale GTPase-Domäne wird über eine Interaktion mit ihrem Gegenpart in einer benachbarten Windung innerhalb der Helix aktiviert und erzeugt Energie, die über ein *bundle-signalling element* (BSE) und die Stieldomäne auf die Membrane übertragen wird (**Abb. 1B**). Dieser „Kraftschlag“ nach GTP-Hydrolyse führt zu einer koordinierten Konformationsänderung, bei der sowohl BSE als auch die GTPase-Domänen eine Gleitbewegung auslösen, die sich auf die gesamte helikale Struktur überträgt, wodurch diese sich streckt und sowohl der innere als auch der äußere Durchmesser

abnimmt und so die umschlossene Membran einschnürt [3]. Nur wenn alle diese Mechanismen reibungslos ineinandergreifen, kann eine Fusion oder auch Teilung von Organellen ablaufen und schon einzelne Punktmutationen können diesen Prozess nachhaltig stören.

Da Mitochondrien über zwei Membranen verfügen, bedarf es mehrerer Dynamin-ähnlicher GTPasen, um die Fusion des Organells zu erreichen. Die Fusion der äußeren Membran wird im Zytoplasma durch Mitofusin 1 und 2 vermittelt. Die Verschmelzung der inneren Membran hingegen wird im Intermembranraum von dem *optic atrophy protein 1* (OPA1) ermöglicht, das auch an der Entstehung der *crista junctions* beteiligt ist und diese stabilisiert. Die genauen molekularen Abläufe bei diesen Prozessen werden trotz intensiver Forschung bis jetzt nur teilweise verstanden.

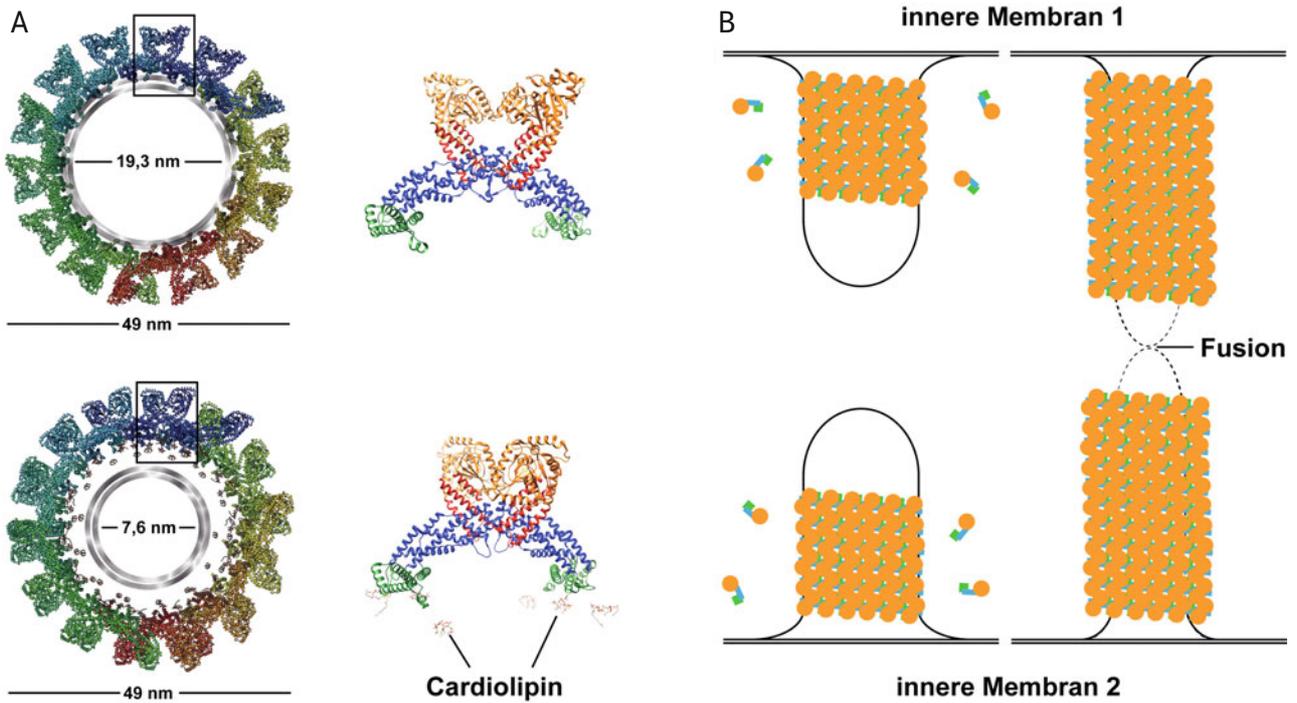
Die zentrale Rolle von OPA1 für die mitochondriale Membranarchitektur

Das Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung bestimmt die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks und wird u. a. von der Aktivität der OPA1-GTPase bestimmt (**Abb. 2A**). Insgesamt acht Isoformen können

in menschlichen Zellen transkribiert werden, die sich vor allem in einem Bereich N-terminal der GTPase-Domäne unterscheiden. Die translatierten Varianten werden in den Intermembranraum der Mitochondrien transportiert, wo sie entweder in die Innenmembran inseriert werden (L-OPA1) oder proteolytisch prozessiert werden und dann als freie Moleküle vorliegen können (S-OPA1). Sowohl die langen als auch die kurzen Isoformen, die sich zu Oligomeren zusammenfügen und gemeinsam Membranen umgestalten, sind für die ausgewogene Organisation des mitochondrialen Netzwerks erforderlich [4]. OPA1 bindet mit seiner Paddel-Domäne an Cardiolipin in der inneren Membrane und kann durch seine Flexibilität sowohl positive als auch negative Membrankrümmungen erzeugen und stabilisieren [5]. Positive Membrankrümmung ist eine essenzielle Voraussetzung für die Fusion, da die resultierende Spannung in der äußeren Lipidschicht die benötigte Energie für die Verschmelzung von Membranen erheblich senkt.

Der strukturelle Aufbau von OPA1

Um die genauen Abläufe bei diesem Prozess besser zu verstehen, haben wir rekombinantes S-OPA1 aufgereinigt und mit Liposomen,



▲ **Abb. 3:** Die Struktur eines Übergangszustandes gibt Hinweise auf den Fusionsmechanismus. **A,** Vergleich der beiden beobachteten Konformationen. **B,** Modell der OPA1-vermittelten Fusion. OPA1 oligomerisiert auf der inneren Membran und erzeugt so einen Membrantubus. GTP-Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung in der gesamten Quartärstruktur, wodurch der innere Durchmesser des Oligomers abnimmt und Cardiolipin aus der Membran extrahiert wird. Die höhere Membrankrümmung an der Spitze des Tubulus sowie die Perturbation der Lipidschicht resultieren in einer Membranknospe, die mit der benachbarten Membran leichter fusionieren kann.

deren Lipidzusammensetzung der inneren mitochondrialen Membran entspricht, inkubiert und die resultierenden tubulären Strukturen mittels Kryoelektronenmikroskopie analysiert (**Abb. 2B**, [6]). OPA1 formte wie erwartet auf der Membran dicht gepackte, helikale Oligomere, die durch eine Vielzahl an Interaktionen zwischen Stiel-, BSE- und GTPase-Domäne stabilisiert werden. Diese Assemblierung ist typisch für Dynamin-ähnliche GTPasen und bildet das Grundgerüst für die Funktion dieser Proteine. Auffällig war in der Anordnung jedoch ein zusätzlicher Kontakt der membranbindenden Paddel-Domänen (Interface 7), die innerhalb dieser Familie einzigartig ist (**Abb. 2C**). Diese Domäne hat eine hammerförmige Struktur und interagiert stabil mit der Lipidschicht über eine Schleifenstruktur (*membrane insertion loop*, MIL), die tief in die Membran inseriert und sie so fest verankert (**Abb. 2D**). In Experimenten mit rekombinanten Proteinen waren entsprechende Mutanten (MIL mutiert zu Polyalanin und K819E) nicht mehr in der Lage, auf Modellmembranen (Liposomen) zu oligomerisieren, was darauf hindeutet, dass sowohl Paddel-Dimerisierung als auch die MIL-vermittelte Membranbindung eine zentrale Rolle für die Aktivität von OPA1 spielen. Um zu verstehen welchen Beitrag der MIL und Interface 7 für den

Fusionsmechanismus spielen, wurde ein Expressionssystem in HeLa-Zellen etabliert, mit dem wir in der Lage waren, das endogene Protein mit den entsprechenden siRNA-resistenten OPA1-Mutanten zu ersetzen. In diesem Kontext konnten wir zeigen, dass Veränderungen dieser strukturellen Eigenschaften in der Paddel-Domäne zu einem deutlichen Verlust der Fusionsaktivität von OPA1 führen.

Mechanismus der OPA1 vermittelten Fusion der inneren Membran

Neben der beschriebenen Struktur der OPA1-Oligomere mit einem Gesamtdurchmesser von 49 nm und einem inneren Durchmesser von 19,3 nm konnte in den Aufnahmen noch eine zweite Konformation identifiziert werden, die vermutlich einen Übergangszustand darstellt, der während der Fusion der mitochondrialen Innenmembranen auftritt (**Abb. 3A**). In dieser Anordnung sind die Positionen der BSE- und GTPase-Domänen im Verhältnis zu den Stielen nahezu unverändert, während die Paddel-Domäne eine deutliche Umorientierung zeigt. Die Domäne entfernt sich von den Kopfgruppen der Lipide und der MIL ist nicht mehr in der Membran inseriert, sodass die umschlossene Membran eingeschnürt und dadurch stark gekrümmt wird (Durchmesser 7,6 nm). Gleichzeitig

lässt sich beobachten, dass Cardiolipin aus der Lipidschicht extrahiert wird. Vermittelt wird dieser Prozess durch die stabile Ausbildung von ionischen Bindungen zwischen den positiv geladenen Aminosäuren (K738, R857 und R858) der Paddel-Domäne mit der negativ geladenen Kopfgruppe von Cardiolipin. Dies führt wahrscheinlich zu einer Perturbation der Membranorganisation, welche die Lipidschicht weiter destabilisiert und dadurch eher dazu neigt, zu fusionieren. Punktmutationen dieser basischen Aminosäuren führen *in vitro* zu einem Verlust der Membranbindung und resultieren in Zellen zu einer starken Reduktion der Fusionsaktivität, was die Bedeutung dieser Interaktion für die Funktion von OPA1 unterstreicht. Durch diese koordinierte Konformationsänderung wird der umschlossene Membranbereich verlängert und in die Nähe der zweiten, gegenüberliegenden Membran gebracht. Die starke Krümmung an der Spitze des elongierten Tubulus ist energetisch instabil und senkt so die Aktivierungsenergie, die für die Fusion benötigt wird (**Abb. 3B**). Im Vergleich zu dem klassischen Kraftschlag, der für Dynamin beschrieben wurde, lassen sich hier also deutliche Unterschiede im Reaktionsmechanismus ausmachen. Zwar bilden auch OPA1-Oligomere helikale Strukturen, die ihre gebundenen Membranen einschnü-

ren, bei GTP-Hydrolyse bleibt jedoch der äußere Durchmesser konstant (49 nm) und es kommt zu einer Umorientierung der Paddel-Domänen, sodass diese an Cardiolipin binden und es aus der Membran extrahieren. Dies könnte zu einer instabilen Membranknospe führen, die leicht mit anderen Membranen fusioniert. Insbesondere die Beobachtung der Extraktion von Cardiolipin bei Fusionsprozessen der inneren Membran ist ein neues Konzept und kann in Zukunft genauer untersucht werden, was unser Verständnis von diesem komplexen Prozess deutlich vertiefen wird.

Danksagung

Ich danke Halil Aydin, Adam Frost und Martin van der Laan für die konstruktive Zusammenarbeit. Besonderer Dank auch an Karina von der Malsburg und Katja Fälber für ihre Unterstützung.

Die molekularen Grafiken wurden mit UCSF Chimera erstellt, das von der Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics an der University of California, San Francisco, mit Unterstützung des NIH P41-GM103311 [7] entwickelt wurde. ■

Literatur

- [1] Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C et al. (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 204–224
- [2] Chernomordik LV, Kozlov MM (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 675–683
- [3] Faelber K, Held M, Gao S et al. (2012) Structural insights into dynamin-mediated membrane fission. *Structure* 20: 1621–1628
- [4] Ge Y, Shi X, Boopathy S et al. (2020) Two forms of Opa1 cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner membrane. *Elife* 9: e50973
- [5] Faelber K, Dietrich L, Noel JK et al. (2019) Structure and assembly of the mitochondrial membrane remodelling GTPase Mgm1. *Nature* 571: 429–433
- [6] von der Malsburg A, Sapp GM, Zuccaro KE et al. (2023) Structural mechanism of mitochondrial membrane remodeling by human OPA1. *Nature* 620: 1101–1108
- [7] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC et al. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Alexander von der Malsburg
 Med. Biochemie & Molekularbiologie
 Center for Molecular Signaling (PZMS)
 Universität des Saarlandes
 Kirrberger Straße/Geb. 45.2
 D-66421 Homburg
 alvo004@uni-saarland.de

AUTOR



Alexander von der Malsburg

2000–2007 Biologiestudium an den Universitäten Heidelberg und Freiburg.
 2007–2010 Promotion, Universität Freiburg. 2010–2016 PostDoc am Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK. Seit 2017 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Medizinische Biochemie, Universität des Saarlandes, Homburg.