

Role of Mammalian Prohibitins in the Regulation of Apoptosis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sascha Dargazanli

aus Würselen

Köln, 2010

Abstract

The prohibitins are ubiquitous, evolutionary conserved membrane proteins that have been localized to different compartments within the cell and associated to various distinct functions. However, prohibitins are mainly localized to mitochondria and form large assemblies comprised of PHB1 and PHB2 subunits that are anchored to the mitochondrial inner membrane. The ubiquitous and brain-restricted deletion of *Phb2 in vivo* has been demonstrated to cause embryonic lethality, indicating a fundamental role of prohibitins in mammalian development.

Here, we investigated the role of mitochondrial localized prohibitins in the regulation of apoptosis in mammalian cells. Deletion of *Phb2* in mouse embryonic fibroblasts by cre-mediated recombination resulted in mitochondrial fragmentation and disturbed mitochondrial ultrastructure. This morphological change was accompanied by an increased susceptibility towards apoptosis initiated by either intrinsic or extrinsic apoptotic induction. *Phb2*^{-/-} cells exhibited an accelerated release of cytochrome *c* and rapid activation of caspases upon exposure to diverse apoptotic stimuli. This effect was attributed to alterations in the proteolytic processing of OPA1, a dynamin-like GTPase of the mitochondrial inner membrane which is essential for fusion and the maintenance of cristae morphogenesis. Depletion of PHB2 resulted in the selective loss of long OPA1 isoforms and simultaneous accumulation of short OPA1 isoforms. Stable expression of long OPA1 isoforms in *Phb2*^{-/-} cells restored both, mitochondrial morphology and apoptotic susceptibility. Downregulation of OMA1 had a similar effect. The metalloprotease OMA1, which is located at the mitochondrial inner membrane, has been shown to proteolytically cleave long OPA1 isoforms under cellular stress conditions. Indeed, downregulation of OMA1 in *Phb2*^{-/-} cells resulted in the stabilization of long OPA1 isoforms and concomitantly in the reduction of apoptotic sensitivity and restoration of the mitochondrial network. Additionally, downregulation of OMA1 in wild-type cells and *NEMO*^{-/-} cells exerted a strong anti-apoptotic effect in both cell types. These results showed that prohibitins and the downregulation of OMA1 has an anti-apoptotic effect that correlates with the stabilization of OPA1 isoforms.

Beside their role in the regulation of apoptosis, prohibitins are thought to possess a scaffolding function at the mitochondrial inner membrane. This function implies a possible role of the prohibitin complex as interaction platform for other proteins. Therefore, affinity chromatography was performed to identify possible interaction partners of PHB2. Altogether, over a hundred proteins were identified to presumably interact with PHB2. These results imply that the scaffolding function of prohibitins may contribute to a structural and functional compartmentalization of the inner mitochondrial membrane. Further analysis of these interactions will contribute to the identification of cellular processes where prohibitins are involved and help to precisely define the functions of prohibitins in mammalian cells.

Zusammenfassung

Prohibitine bilden eine ubiquitär exprimierte, hochkonservierte Familie von Membranproteinen, die in verschiedenen Kompartimenten innerhalb der Zelle identifiziert wurden. Sie wurden mit den verschiedensten Funktionen innerhalb der Zelle in Verbindung gebracht, allerdings ist mehrfach gezeigt worden, dass Prohibitine hauptsächlich in Mitochondrien lokalisiert sind und dort an essentiellen Prozessen beteiligt sind. In Mitochondrien liegen Prohibitine als Komplex vor, der aus den Untereinheiten PHB1 und PHB2 zusammengesetzt ist und in der inneren mitochondrialen Membran verankert ist.

In der vorliegenden Studie wurde die Beteiligung von mitochondrialen Prohibitinen an der Regulation der Apoptose in Säugerzellen analysiert. Die Cre-Protein vermittelte Inaktivierung des *Phb2* Gens in embryonalen Mausfibroblasten führte zu einer Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes und einer gestörten Ultrastruktur. Dieser Morphologiedefekt führte gleichzeitig zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber apoptose-induzierenden Substanzen. Verglichen mit Wildtyp Zellen führte die Stimulation mit Substanzen die sowohl den externen, als auch den internen Pfad der apoptotischen Kaskade auslösen, zu einer beschleunigten Cytochrome *c* Freisetzung bei PHB2 depletierten Zellen. Dies führte letztendlich zu einem beschleunigten Zelltod von *Phb2*^{-/-} Zellen. Dieser Effekt konnte auf eine gestörte Prozessierung der dynaminverwandten GTPase OPA1 zurückgeführt werden die an der Fusion von Mitochondrien beteiligt ist. In Abwesenheit von Prohibitinen kam es zu einem vermehrten Abbau von langen OPA1 Isoformen und einer Akkumulation von kurzen Isoformen. Die gezielte Expression einer langen OPA1 Isoform in prohibitin-defizienten Zellen konnte sowohl die mitochondriale Struktur, als auch die Apoptoresistenz wieder herstellen. Die Runterregulation der Metallprotease OMA1, die ebenfalls an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, führte ebenfalls zu einer Stabilisierung der langen OPA1 Isoformen und verhinderte die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes und die Apoptosesensibilität in prohibitin-defizienten Zellen. Auch in NEMO-defizienten Zellen, die eine erhöhte Apoptosesensibilität aufweisen, hat die Runterregulation von OMA1 einen anti-apoptotischen Effekt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Prohibitine, als auch die Runterregulation von OMA1 vor Apoptose schützen.

Außerdem wurden mögliche Interaktionspartner von Prohibitinen in Säugerzellen gesucht. Über hundert Kandidaten wurden identifiziert, die eine Interaktion mit Prohibitinen aufwiesen. Die Analyse dieser Proteine und die Charakterisierung der jeweiligen Zellprozesse sind ein entscheidender Faktor, um die genaue Funktion von Prohibitinen in Säugerzellen bestimmen zu können.