

Berichte aus dem Institut

## Mitochondrien - Dynamische Kraftwerke der Zelle

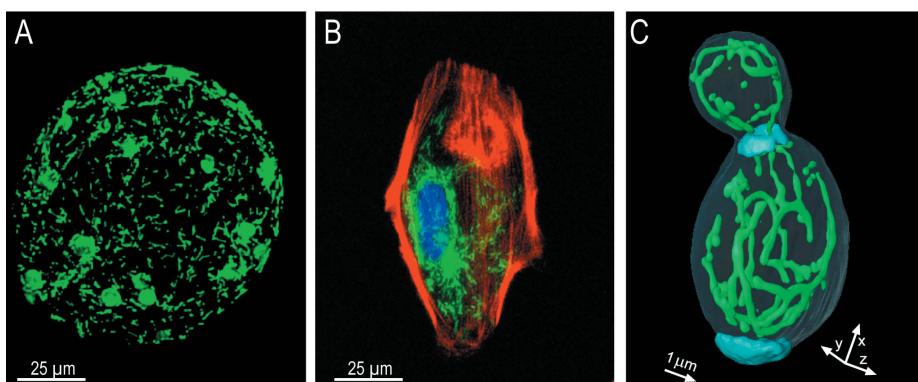
Stefan Jakobs, Abt. NanoBiophotonik (200)

### Zelluläre Kraftwerke

Nahezu alle eukaryotischen Zellen besitzen Mitochondrien. Das Hauptprodukt dieser Organellen ist der universelle zelluläre Energiespeicher Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Die Mitochondrien eines erwachsenen Menschen produzieren am Tag etwa 40 kg ATP! Zusätzlich haben sie zahlreiche weitere ebenso essentielle, aber oft weniger beachtete Stoffwechselfunktionen. Fehlfunktionen in Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen ebenso wie bei neurodegenerativen Krankheiten wie etwa Alzheimer oder Parkinson.

In vielen Lehrbüchern werden Mitochondrien noch immer als kleine, eiförmige,

passiv im Cytoplasma schwimmende Organellen dargestellt. Tatsächlich sind Mitochondrien außerordentlich dynamisch und vielgestaltig. In den meisten Zelltypen und Organismen bilden sie mehr oder weniger zusammenhängende, oft sogar sehr ausgedehnte Netzwerke. Das trifft auf Mitochondrien von Säugerzellen ebenso zu wie auf die von Pflanzen oder Pilzen (Abb. 1). Die molekularen Mechanismen, die die mitochondriale Struktur und Dynamik bestimmen, sind bisher kaum verstanden. Nichtsdestoweniger wird es zunehmend klar, dass ein Einblick in diese Prozesse unverzichtbar sein wird, um etwa mit Mitochondrien assoziierte Krankheiten zu verstehen.



**Abb. 1:** Mitochondrienmorphologien in verschiedenen Zellen. (A) GFP-markierte Mitochondrien in einem Tabak-Protoplast (*Nicotiana tabacum L.*). Die Tubuli sind Mitochondrien, die flächigen Strukturen durchscheinende Chloroplasten (Van Gerstel et al., 2002, J. Exp. Bot. 53, 659-667). (B) Mitochondrien (grün), Aktinzytoskelett (rot) und Kern (blau) in Beutelratten-(PtK2)-Zellen. (C) Mitochondriales Netzwerk (grün) sowie Zellwand und Teilungsnarben (blau) einer lebenden, sich gerade teilenden Hefezelle (*Saccharomyces cerevisiae*) (Egner et al., 2002).

**Fig. 1.** Mitochondrial morphologies in different cell types. (A) GFP-labeled mitochondria in a tobacco protoplast (*Nicotiana tabacum L.*) (Van Gerstel et al., 2002, J. Exp. Bot. 53, 659-667). The tubuli are mitochondria, the larger structures are chloroplasts (B) Mitochondria (green), actin cytoskeleton (red) and nucleus (blue) in rat kangaroo PtK2 cells. (C) Mitochondrial network (green) as well as cell wall and bud scars (blue) in a dividing budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (Egner et al., 2002).

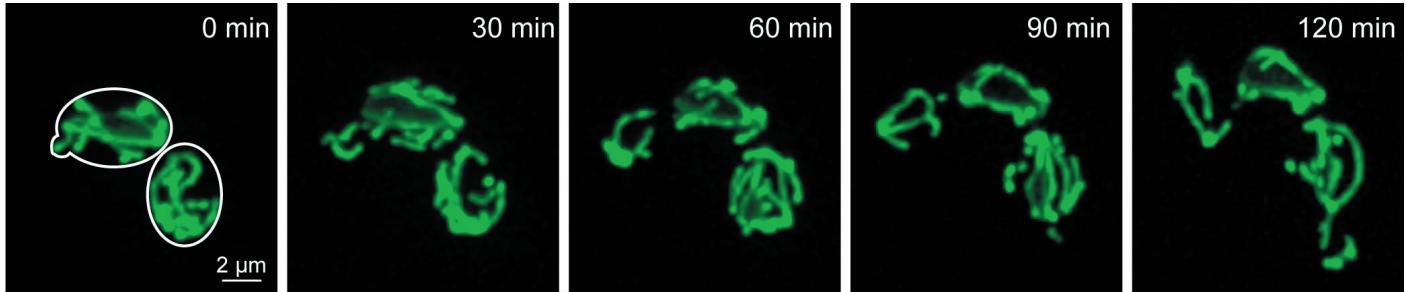
### Summary

Mitochondria are ubiquitous cellular power plants in eukaryotic cells. These organelles often form highly dynamic networks. The mitochondrial tubules frequently fuse and divide. By these processes the sizes and the shapes of the mitochondrial networks adapt to changing environmental or cellular conditions. However, little is known about structural dynamics within mitochondria. This is partly due to the small diameter of mitochondrial tubules, which are too thin to be clearly resolved by conventional light microscopy. In addition, it proved difficult to functionally label target proteins in living mitochondria with fluorescent protein-tags like the green fluorescent protein (GFP). We have recently implemented the so-called biarsenical-tetracycline system in budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Here a short sequence of only six specific amino acids is genetically fused to a target protein. This tag can be fluorescently labelled inside live cells by adding an organic fluorophore (FlAsH) to the growth medium. The short tag is 40 times smaller

Cont. on page 3

### Inhalt

Abt. Neurobiologie	1-5
ENI-Vertrag	6-7
Neueinstellungen	8,9
Abgänge; Gäste	9
Promotionen	9
Jubiläen	9
Publikationen	9-10
GWDG-Info	10
Sportler am Fassberg	11
Doktorandenseminar	12
JAV und Betriebsrat	12
Impressum	12



**Abb. 2:** Mitochondrien-Dynamik in Hefezellen. Die Mitochondrien sind mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert. Die gezeigten Abbildungen wurden an lebenden Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten aufgenommen. Gezeigt sind Projektionen einzelner konfokaler Schnitte. Die Projektionen stammen aus einer umfassenden Zeitserie, die insgesamt 165 3D-Bildstapel mit etwa 4000 Einzelaufnahmen umfasst. In der ersten Abbildung sind die Zellwände angedeutet.

**Fig. 2.** Mitochondrial dynamics in budding yeast. The mitochondrial network has been labeled with the green fluorescent protein (GFP). 3D stacks were taken with a confocal microscope at the indicated time points. Displayed are maximum intensity projections from optical sections. The underlying data stack comprises 165 three-dimensional stacks with ~4000 single optical sections. In the first image the cell walls are indicated.

### Dynamische Mitochondrien-Netzwerke

Das mitochondriale Netzwerk der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist fast immer ein Kontinuum (Abb. 1c). Frei bewegliche Proteine können ungehindert innerhalb dieses Netzwerkes diffundieren (Jakobs et al., 2003a). Aber nicht nur ein großer Teil der Proteine innerhalb der Mitochondrien, auch die Netzwerke selbst sind hochbeweglich (Abb. 2). Innerhalb einer Hefezelle finden pro Minute etwa zwei Mitochondrienteilungen und -fusionen statt (Jakobs et al., 2003b). Dies scheint ein Mechanismus zu sein, mit dem sich die Mitochondrien dem aktuellen Energiebedarf der Zelle sowie den zellulären Umweltbedingungen anpassen. Wir haben kürzlich gezeigt, dass dabei auch der Durchmesser der Mitochondrien genau angepasst wird (Egner et al., 2002). Die Anpassung der Mitochondrien beschränkt sich jedoch nicht nur auf ihre äußere Morphologie. Mitochondrien besitzen eine äußere und eine innere Membran. Seit langem ist bekannt, dass sich Form und Zahl der Cristae, also die Einfaltungen der inneren Membran, unter verschiedenen Bedingungen verändern. So kommt es nicht zuletzt während der Apoptose zu dramatischen Veränderungen der inneren Struktur der Mitochondrien (Scorrano et al., 2002).

### Innere Struktur des Organells

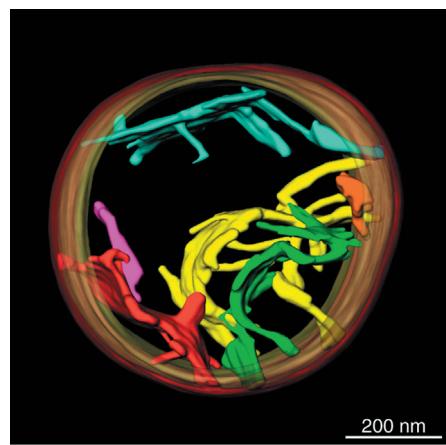
Erst in jüngster Zeit ist gezeigt worden, dass Cristae keineswegs einfache Einstülpungen der inneren Membran sind (Frey and Mannella, 2000). Vielmehr sind die eigentlichen Cristae über kurze Tubuli (*cristae junctions*) mit dem Teil der inneren Membran, der direkt an der äußeren Membran anliegt,

verbunden (Abb. 3). Möglicherweise stellen *cristae junctions* eine (Diffusions-)Barriere für Proteine der inneren Membran oder des Intermembranraums dar. Träfe diese Hypothese zu, würde das eine zusätzliche Sub-Kompartimentierung des Organells mit weitreichenden funktionellen Konsequenzen bedeuten. Um dies zu überprüfen, müssen Proteinverteilungen und -dynamiken in lebenden Mitochondrien untersucht werden. Die Lichtmikroskopie scheint für diese Fragestellung die vielversprechendste Methode zu sein. Dennoch haben lichtmikroskopische Untersuchungen bisher wenig zum Verständnis der innermitochondrialen Struktur beigetragen. Zwei Gründe sind dafür wohl ausschlaggebend. Zum einen hat es sich in vielen Fällen als schwierig erwiesen, mitochondriale Proteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) zu markieren, ohne ihre Funktion zu stören. Zum anderen sind Mitochondrien zu klein für detaillierte lichtmikroskopische Untersuchungen. Genauer gesagt, mitochondriale Tubuli

sind mit einem Durchmesser von etwa 300-600 nm so dünn, dass Strukturen in ihrem Inneren mit herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie (etwa konfokaler oder 2-Photonen-Mikroskopie) kaum aufgelöst werden können.

### Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Die Erforschung und Entwicklung mikroskopischer Verfahren mit höherer optischer Auflösung ist eines der Hauptziele der Abteilung NanoBiophotonik. Hier sind, unter anderem mit der 4Pi- und der STED-Mikroskopie, mehrere mikroskopische Verfahren entwickelt worden, die eine erheblich höhere optische Auflösung als herkömmliche Fluoreszenzmikroskope ermöglichen (Hell, 2003). Die STED-Mikroskopie ist das erste erfolgreich eingesetzte Mitglied einer ganzen Familie von mikroskopischen Verfahren, die alle auf sogenannten reversiblen sättigbaren optischen Transitionen beruhen (Hell et al., 2004). Im Prinzip ist mit diesen Verfahren



**Abb. 3:** Dreidimensionale Darstellung der Membranen eines isolierten Rattenlebermitochondriums. Die Daten für die Rekonstruktion wurden mit Hilfe der Elektronentomographie gewonnen. Die äußere Membran ist rot dargestellt, die Cristae (Einfaltungen der inneren Membran) in verschiedenen Farben. (Mit freundlicher Genehmigung von Carmen Mannella, Resource for the Visualization of Biological Complexity, Wadsworth Center, Albany, NY.)

**Fig. 3.** Three-dimensional reconstruction of the membranes in an isolated, frozen-hydrated rat-liver mitochondrion, determined by cryo-electron tomography. The outer membrane is displayed in red, the cristae (infoldings of the inner membrane) in various colours. (Figure provided by Carmen Mannella, Resource for the Visualization of Biological Complexity, Wadsworth Center, Albany, NY.)



Fluoreszenzmikroskopie mit unbeschränkter optischer Auflösung möglich. So wurde beispielsweise an immunomarkierten Zellen mit einem STED-4Pi-Mikroskop eine Auflösung von etwa 50 nm entlang der optischen Achse erreicht (Abb. 4) (Dyba et al., 2003). Zum Vergleich, ein konventionelles konfokales Mikroskop erreicht bestenfalls eine axiale Auflösung von etwa 500 nm. Trotz einer Reihe noch bestehender technischer Hürden könnte dieses oder eines der verwandten mikroskopischen Verfahren es erlauben, zum ersten Mal in das Innere lebender Mitochondrien zu blicken. Doch natürlich sind solche Untersuchungen nur dann sinnvoll, wenn die Struktur der Mitochondrien durch die Fluoreszenzmarkierung nicht maßgeblich beeinflusst wird.

### In vivo Markierungen mit GFP und FIAsH

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) hat sich in einer schier unüberschaubaren Fülle von zellbiologischen Studien als ein außerordentlich wertvolles molekulares Werkzeug erwiesen, um Proteine in lebenden Zellen zu markieren. Dazu wird ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Marker, hier GFP, und dem ‚Gastgeber‘-Protein hergestellt. Idealerweise stört der Marker die Lokalisation und die Funktion des ‚Gastgeber‘-Proteins nicht. GFP ist mit seiner Masse von etwa 27 kDa jedoch selbst ein Protein mittlerer Größe. Daher ist es leicht nachvollziehbar, dass ein solch relativ großes Markerprotein die Funktionalität des ‚Gastgeber‘-Proteins erheblich einschränken kann. Tatsächlich haben wir zahlreiche mitochondriale Proteine gefunden, die zwar als GFP-Fusionsproteine exprimiert werden können, aber nicht mehr voll funktionsfähig sind; in vielen Fällen führt die Expression von mitochondrialen GFP-Fusionsproteinen zu strukturellen Veränderungen des Organells. Die Erklärung für die Empfindlichkeit mitochondrialer Proteine gegenüber dem GFP-Marker liegt wahrscheinlich in der Besonderheit der inneren Membran. Diese Membran ist nicht nur hochgefaltet, sie ist auch die am dichtesten mit Proteinen besetzte Zellmembran überhaupt. Möglicherweise ist hier in vielen Fällen einfach kein Platz für zusätzliche GFPs.

Ein Ansatz, der auf fluoreszierende Proteine als Marker verzichtet, aber dennoch erlaubt, die Lokalisation und Dynamik von

Proteinen *in vivo* mit dem Fluoreszenzmikroskop zu verfolgen, ist das *biarsenical-tetracysteine system*, das wir kürzlich in der Bäckerhefe etabliert haben (Andresen et al., 2004). Diese von Roger Tsien und Mitarbeitern vor einigen Jahren vorgestellte Methode (Griffin et al., 1998) beruht auf der hohen Affinität eines kleinen organischen fluoreszierenden Moleküls (FIAsH) zu einer Abfolge von sechs Aminosäuren (TetCys Motiv: Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys) (Abb. 5). Diese kurze Sequenz kann prinzipiell ebenso als Marker eingesetzt werden wie das etwa 40 Mal größere GFP. Wir haben Plasmide hergestellt, die es erlauben, mittels homologer Rekombination praktisch jedes beliebige Gen in der Bäckerhefe um die kodierende Sequenz für das TetCys Motiv zu verlängern. Auf diese Weise kann man das endogene Protein durch die markierten Variante ersetzen und stellt zudem sicher, dass die Expressionshöhe unverändert bleibt.

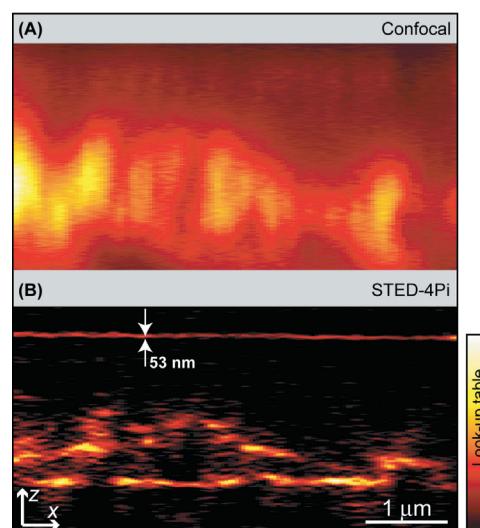
In lebenden Zellen bindet FIAsH hochselektiv an das mit dem TetCys Motiv markierte Protein. Dabei gibt es erfreulicherweise in *S. cerevisiae* keinen nennenswerten störenden unspezifisch gefärbten Hintergrund. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass, wie wir aufgrund des vollständig sequenzierten Genoms wissen, die Bäckerhefe kaum endogene Proteine besitzt, die typische FIAsH-Bindemotive enthalten.

Am Beispiel des  $\beta$ -Tubulins (Tub2) haben wir gezeigt, dass der Größenunterschied zwischen dem TetCys Motiv (6 aa) und GFP (244 aa) den Unterschied zwischen einem funktionellen und einem nicht funktionellen Fusionsprotein ausmachen kann: Haploide Zellen, die Tub2-GFP exprimieren, sind nicht lebensfähig. Dagegen kann in Zellen, die Tub2-TetCys exprimieren, die Dynamik der Mikrotubuli nach Färbung mit FIAsH-EDT<sub>2</sub> untersucht werden. Inzwischen haben wir eine Reihe mitochondrialer Proteine mit dem TetCys Motiv markiert und anschließend mit FIAsH gefärbt. Auch hier hat sich in vielen Fällen das kleine TetCys Motiv als weniger störend erwiesen als GFP.

Aufgrund des Größenvorteils des Markers ist das *biarsenical-tetracysteine system* eine vielversprechende Ergänzung zu fluoreszierenden Proteinen. Daher werden wir dieses Verfahren in Zukunft neben den verschiedenen fluoreszierenden Proteinen einsetzen, um in Verbindung mit

*Continued ...*

than GFP. The approach to tag genes at their native loci with very small tags and the subsequent visualization of the tagged proteins *in vivo* can be extended in principle to any gene in *S. cerevisiae*. Currently we use this system as well as GFP-tagged proteins in combination with high-resolution fluorescence microscopy to explore the dynamics of live mitochondria.



**Abb. 4:** STED-4Pi Mikroskopie mit einer Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze. XZ-Bilder des immunomarkierten Mikrotubulizytoskeletts einer HEK-Zelle, aufgenommen mit einem konfokalen (A) und einem STED-4Pi-Mikroskop (B). Beide Bilder sind an derselben Stelle innerhalb der Zelle aufgenommen worden. Um 4Pi-Seitenmaxima zu entfernen, ist das STED-4Pi-Bild linear entfaltet worden. Die horizontale Linie in (B) führt von Farbstoff auf dem Deckglas her. Anhand dieser Schicht kann eine Auflösung von 53 nm bestimmt werden (Dyba et al., 2003).

**Fig. 4.** Subdiffraction immunofluorescence imaging with STED-4Pi microscopy. XZ-images from the immunolabeled microtubular network of a human embryonic kidney (HEK)-cell as recorded with a confocal (A) and a STED-4Pi-microscope (B). Both images have been recorded at the same site of the cell. The STED-4Pi image was linearly deconvolved to remove the effect of the 4Pi-sidelobes. Note the straight horizontal line, which stems from precipitated dye on the cover slip. At this layer, the resolution in the STED-4Pi image is determined as 53 nm (Dyba et al., 2003).



hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie die Struktur der Mitochondrien und ihre Dynamik zu untersuchen.

**Veröffentlichungen der Abteilung Nano-Biophotonik mit Bezug zu diesem Artikel:**

**Andresen, M., Schmitz-Salue, R., und Jakobs, S.** (2004). Short tetracysteine tags to  $\beta$ -tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging. *Mol. Biol. Cell.* DOI 10.1091/mbc.E04-06-0454

**Dyba, M., Jakobs, S., und Hell, S.W.** (2003). Immunofluorescence stimulated mission depletion microscopy. *Nature Biotech.* **21**, 1303-1304.

**Egner, A., Jakobs, S., und Hell, S.W.** (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3370-3375.

**Hell, S.W.** (2003). Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotech.* **21**, 1347-1355.

**Hell, S.W., Dyba, M., und Jakobs, S.** (2004). Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 599-609.

**Jakobs, S., Schauss, A.C., und Hell, S.W.** (2003a). Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen. *FEBS Lett.* **554**, 194-200.

**Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B., und Hell, S.W.** (2003b). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Sci.* **116**, 2005-2014.

**Zitierte Hintergrundliteratur:**

**Frey, T.G., und Mannella, C.A.** (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 319-324.

**Griffin, B.A., Adams, S.R., und Tsien, R.Y.** (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269-272.

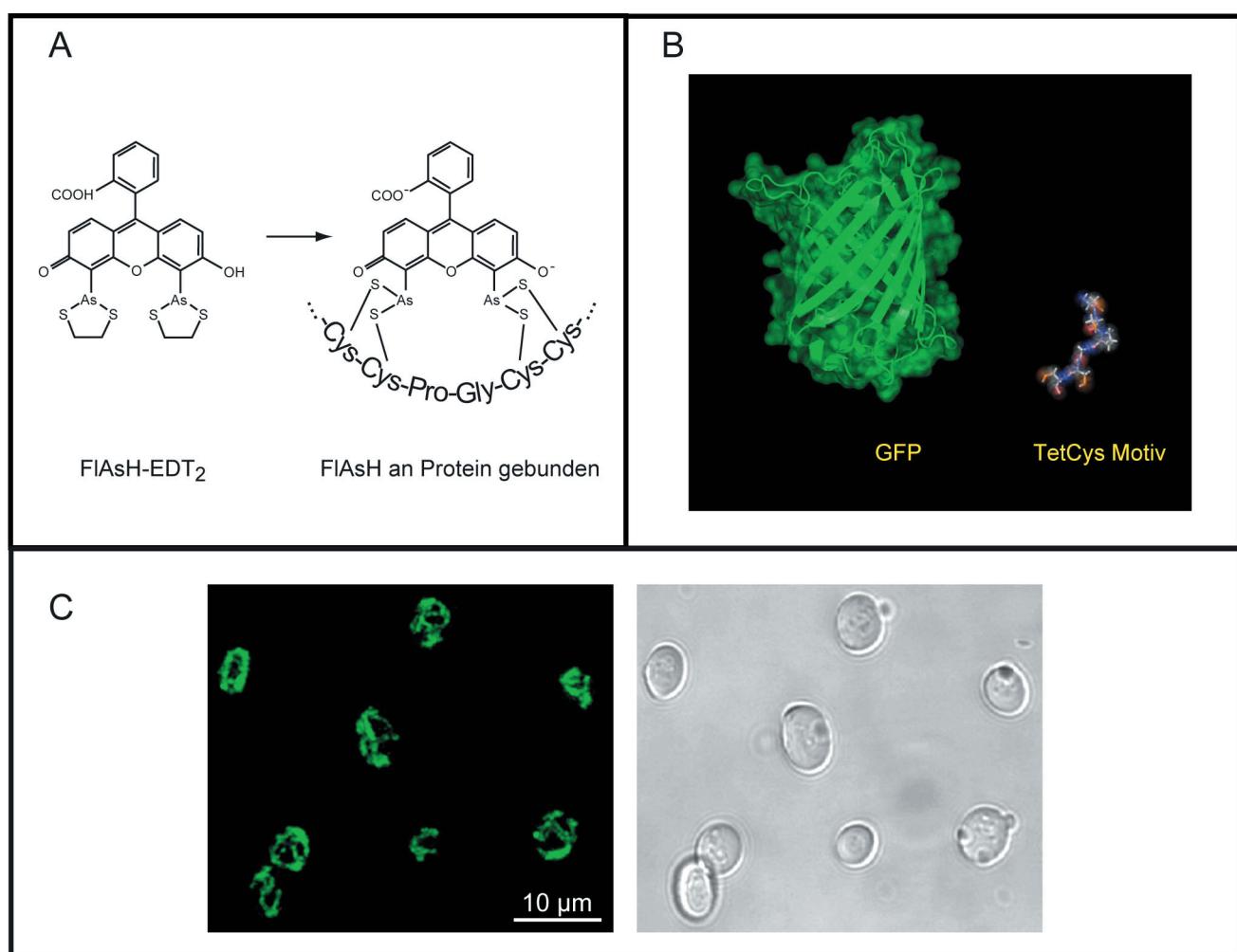
**Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., und Korsmeyer, S.J.** (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Develop. Cell* **2**, 55-67.



**Stefan Jakobs**

hat in Kaiserslautern und Manchester (UK) Biologie studiert. Nach der Promotion am Kölner Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung und Forschungsarbeiten am

John Innes Centre in Norwich (UK) arbeitet er seit 1999 in der Abteilung NanoBiophotonik.



**Abb. 5:** Das biarsenical-tetracysteine system als eine Methode, um Proteine in lebenden Zellen mit Fluorophoren zu markieren. (A) Links das freie, kaum fluoreszierende FlAsH-EDT<sub>2</sub>. Rechts das über ein TetCys-Motiv an ein Protein gebundene, fluoreszierende FlAsH. (B) Größenvergleich zwischen dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem TetCys-Motiv. (C) Färbung mit FlAsH. Links Färbung mit FlAsH, rechts das entsprechende Hellfeldbild. Abgebildet sind FlAsH-gefärbte Hefezellen, bei denen die Alpha-Untereinheit der mitochondrialen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP-Synthase mit dem TetCys-Motiv markiert ist.

**Fig. 5.** The biarsenical-tetracysteine system, a method to label proteins in living cells employing very small tags. (A) The hardly fluorescent FlAsH-EDT<sub>2</sub> (left) and fluorescent FlAsH bound to a TetCys motif protein tag (right). (B) Size differences between the green fluorescent protein (GFP) and the TetCys motif. (C) FlAsH labeling. FlAsH labeled cells (left) and the corresponding bright field image (right). Displayed are FlAsH labeled budding yeast cells expressing a TetCys tagged alpha subunit of the F<sub>1</sub> sector of the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase.