



Doctoral Thesis

Functional analysis of the mitochondrial and peroxisomal dynamics factor GDAP1 in neuronal cells

Author(s):

Huber, Nina

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007602802> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 20880

Functional analysis of the mitochondrial and peroxisomal
dynamics factor GDAP1 in neuronal cells

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Nina Huber

MSc ETH in Biology
ETH Zurich, Switzerland

born 27.10.1983
Ebikon, Luzern

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ueli Suter, examiner
PD. Dr. Dr. Konstanze Winklhofer, co-examiner
Dr. Axel Niemann, supervisor
Dr. Werner Kovacs, co-examiner

2012

Summary

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is an inherited motor and sensory neuropathy of the peripheral nervous system (PNS). With a prevalence of approximately 1 in 2500 people, CMT is the most commonly inherited neurologic disorder. The clinical hallmarks of CMT include distal muscle weakness and atrophy, distal sensory loss, and limb deformities. Up to now, more than 30 different disease-causing genes were identified affecting neurons, Schwann cells, or both cell types.

Among them, mutations in the gene *ganglioside-induced differentiation associated protein 1 (GDAP1)* are associated with axonal (axonal loss, no demyelination), demyelinating (demyelination, onion bulb formation), and intermediate (comprising both phenotypes) forms of CMT. More than 40 disease-causing mutations in *GDAP1* were described, including missense mutations and frameshift or nonsense mutations leading to a C-terminally truncated protein.

GDAP1 is expressed in neurons and Schwann cells of the PNS. There, GDAP1 localises as a tail-anchored (TA) protein to the mitochondrial outer membrane influencing mitochondrial dynamics by promoting mitochondrial fragmentation. Furthermore, in line with structure predictions based on its primary amino acid sequence, *in vitro* assays with recombinant protein determined GDAP1 to be an active glutathione *S*-transferase (GST). In the course of this study, the function of GDAP1 as a regulator of mitochondrial and peroxisomal dynamics and as GST enzyme was further analysed.

Mutations in the mitochondrial fusion factor *MFN2* lead to the axonal form of CMT and were shown to interfere with proper axonal mitochondrial transport and distribution. Using a live-cell imaging approach of labelled mitochondria in sensory dorsal-root ganglion neurons originating from GDAP1 knockout mice revealed a mild impairment of the mitochondrial retrograde transport. We suggest that the mitochondrial transport deficit in neurons might contribute to the progressive disease development of CMT patients.

Mitochondria and peroxisomes share a common fission apparatus. In this study we show that GDAP1 gets also targeted to peroxisomes in a Pex19-dependent manner. Depending on the integrity of its hydrophobic domain 1 (HD1) and on the presence of the other fission factors Drp1 and Mff, GDAP1 induces peroxisomal fragmentation. This was also described for GDAP1-induced mitochondrial fragmentation, confirming GDAP1 as fission factor influencing the fission process dependent on the fission proteins conserved from yeast to human. In contrast to mitochondria, disease-mutated forms of GDAP1 induce peroxisomal fragmentation with comparable efficiency as wildtype GDAP1, unless they interfere with peroxisomal targeting via its TA. We conclude that GDAP1 induces fission at the MOM and at the peroxisomes by an overlapping mechanism but mutations in the N-terminal domains differently affect the regulation of the GDAP1-mediated activity at both organelles.

Next to the analysis of GDAP1 as mitochondrial and peroxisomal dynamics factor, *in vitro* studies of GDAP1 wildtype and disease mutations as GST were performed. The measurement of specific GST-activity for recombinant wildtype GDAP1 lacking the HD1 and transmembrane domain, and the lack of GST-activity for GDAP1 containing the HD1, was confirmed. Purification of disease-mutated

SUMMARY

forms of GDAP1 revealed that these proteins are not soluble, suggesting that they might have a folding problem. Throughout this study we additionally established a method to detect different GDAP1 protein conformations. This approach will be helpful to identify differences in the conformation of the GST-inactive and active GDAP1 and of different disease-mutated forms of GDAP1.

For both GDAP1-mediated activities – mitochondrial and peroxisomal fission as well as GSH-conjugation – we propose the hydrophobic domain 1 to play a crucial regulatory function.

Zusammenfassung

Charcot-Marie-Tooth (CMT) Krankheit ist eine vererbare motorische und sensorische Neuropathie. Mit einer Prävalenz von 1:2500 gehört CMT zu der häufigsten erblichen Nervenkrankheit. Zu den klinischen Symptomen von CMT zählt das Auftreten distaler Muskelschwächen und Muskelschwund, der distale Verlust sensorischer Funktionen und pathologische Veränderungen der Extremitäten. Mittlerweile sind über 30 Gene bekannt deren Mutationen mit dieser Krankheit assoziiert sind. Diese genetischen Mutationen betreffen Neuronen, Schwann Zellen oder beide Zelltypen des peripheren Nervensystems (PNS).

Mutationen in einem dieser Gene, dem *ganglioside-induced differentiation associated protein 1* (*GDAP1*), können eine axonale (Verlust von Axonen, keine Demyelinisierung), demyelinisierende (Demyelinisierung, "Zwiebelschalenbildung"), oder intermediäre (Eigenschaften von beiden Phänotypen) Form von CMT verursachen. Insgesamt wurden bisher über 40 verschiedene Mutationen in *GDAP1* beschrieben, welche entweder zu Punktmutationen oder C-terminal verkürzten Proteinvarianten führen.

Im PNS wird *GDAP1* sowohl von Neuronen als auch von Schwann Zellen exprimiert. *GDAP1* ist ein C-terminal membranverankertes Protein der äusseren mitochondrialen Membran und reguliert dort mitochondriale Dynamik indem es mitochondriale Fragmentierung hervorruft. Basierend auf *in silico* Analysen der Primärstruktur haben mit *in vitro* Versuchen mit rekombinantem Protein gezeigt, dass *GDAP1* eine aktive Glutathione *S*-Transferase (*GST*) ist. Im Verlauf dieser Studie wurde die regulatorische Funktion von *GDAP1* in mitochondrialer und peroxisomaler Fragmentierung sowie seine *GST* Aktivität analysiert.

Mutationen im mitochondrialen Fusionsfaktor *MFN2* resultieren in einer axonalen Form von CMT, und führen in kultivierten Neuronen zu einer Störung der mitochondrialen Verteilung und des Transports innerhalb des Axons. Mittels "live-cell imaging" Technik wurden fluoreszenz-markierte Mitochondrien in murinen Spinalganglion-Neuronen (DRG) aus *GDAP1* Knockout-Mäusen untersucht, die einen verminderten retrograden axonalen Transport aufwiesen. Daraus schliessen wir, dass diese Veränderung im axonalen Transport von Mitochondrien zum progressiven Verlauf der Nervenkrankheit im Menschen beitragen könnte.

Mitochondriale und peroxisomale Fragmentierung wird von einer ähnlichen Proteinmaschinerie katalysiert. Wir konnten zeigen, dass *GDAP1* durch einen Pex19-abhängigen Mechanismus auch zu den Peroxisomen transportiert wird. Dort induziert es peroxisomale Fragmentierung, vorausgesetzt, dass die Primärsequenz der hydrophoben Domäne 1 (HD1) intakt und die Fragmentierungsproteine *Drp1* und *Mff* in den Zellen vorhanden sind. Gleiches wurde zuvor schon für die *GDAP1*-induzierte mitochondriale Fragmentierung beschrieben. Dies bestätigt, dass *GDAP1* den Fragmentierungsprozess in Abhängigkeit von der konservierten Fragmentierungsmaschinerie beeinflusst. Anders als in Mitochondrien bewirken Krankheitsmutationen von *GDAP1* an Peroxisomen eine mit dem Wildtyp *GDAP1* vergleichbare Effizienz der Fragmentierung, vorausgesetzt, dass hierbei die peroxisomale

Lokalisierung nicht gestört ist. Daraus schlussfolgern wir, dass die GDAP1-induzierte Fragmentierung an den Mitochondrien und Peroxisomen einen ähnlichen Mechanismus aufweist, jedoch Mutationen in den N-terminalen Domänen die GDAP1 Aktivität in beiden Organellen unterschiedlich beeinflussen.

Neben der Analyse von GDAP1 als mitochondrialer und peroxisomaler Dynamikfaktor wurde mittels *in vitro* Experimenten die GST-Aktivität von Wildtyp GDAP1 und Krankheitsmutationen getestet. Für rekombinantes GDAP1 ohne HD1 und Transmembrandomäne wurde eine spezifische GST-Aktivität gemessen, wohingegen für GDAP1 mit HD1 keine Aktivität detektiert wurde. Damit werden vorherige Aktivitätsmessungen bestätigt. Mutierte rekombinante GDAP1 Proteinvarianten konnten jedoch nicht aufgereinigt werden, da diese Proteine nicht löslich waren. Daher vermuten wir, dass diese Proteine ein Problem in der Faltung aufweisen. Im Rahmen dieser Studie haben wir zusätzlich eine Methode entwickelt, um verschiedene Proteinkonformationen von GDAP1 detektieren zu können. Diese Technik wird uns künftig helfen, die Proteinkonformationen von GST-inaktiven und aktiven Varianten von GDAP1 sowie von den verschiedenen Krankheitsmutationen zu detektieren.

Für beide Aktivitäten von GDAP1 – sowohl die mitochondriale und peroxisomale Fragmentierung als auch die Glutathion-Konjugation – schreiben wir der hydrophoben Domäne 1 eine wichtige regulatorische Funktion zu.