

**ANALYSE DER ROLLE DES UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEMS
UND DES LYSOSOMALEN SYSTEMS IN DER PTEN-INDUZIERTER
PUTATIVER KINASE 1/PARKIN-VERMITTELTER MITOPHAGIE**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

eingereicht
an der SEKTION MEDIZIN der
UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
aus dem Institut für Neurogenetik
(Direktorin: Prof. Dr. Christine Klein)

von

Jonathan Sebastian Hugo Ziegler
geboren in Wuppertal

LÜBECK 2019

Erste Berichterstatterin

Prof. Dr. med. Christine Klein

Zweiter Berichterstatter

Priv.-Doz. Dr. med. Heinz-Wolfram Bernd

Tag der mündlichen Prüfung:

24.07.2020

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 24.07.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT	III
ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Parkinson-Erkrankung.....	1
1.2 Der Weg zur Pathogenese-Forschung.....	5
1.3 Neurogenetik in der Parkinson-Forschung	6
1.4 Mitochondriale Qualitätskontrolle.....	9
1.5 PTEN-induzierte Kinase 1- und Parkin-vermittelte Mitophagie.....	11
2 FRAGESTELLUNG	15
3 MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1 Material.....	16
3.2 Methoden	19
4 ERGEBNISSE	28
4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System ist notwendig für Mitophagie	28
4.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System reichert sich an depolarisierten Mitochondrien an.....	36
4.3 Valinomycin und Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon führen zu unterschiedlichen Konversionen von Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1A/1B-Leichtkette 3.....	39
5 DISKUSSION.....	44
AUSBLICK.....	49
ZUSAMMENFASSUNG	LI
SUMMARY	LII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	LIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	LIII
REFERENZEN.....	LIV
CURRICULUM VITAE.....	LXIV
PUBLIKATIONEN	LXV
DANKSAGUNG	LXVI

VORWORT

„Die Wissenschaft ist nur eines der Hilfsmittel.
Es muss noch viel hinzukommen.“

(Jaspers 1986, S. 103)

Die Datenerhebung entstand von Februar bis Dezember 2013 in den Laboren des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck.

Das Thema der Dissertation ist in den größeren Kontext der Arbeitsgruppe „*Molecular Mechanisms of Parkinson Disease*“ von Dr. Aleksandar Rakovic eingebettet und die Daten der vorliegenden Arbeit wurden unter Co-Autorenschaft am 30.10.2018 unter dem Titel „*PINK1-dependent mitophagy is driven by the UPS and can occur independently of LC3 conversion*“ in der Zeitschrift „*Cell Death & Differentiation*“ veröffentlicht. Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen von Poster-Präsentationen veröffentlicht.

HINWEIS

Soweit es sich nicht anders aus dem Kontext ableiten lässt, sind bei der Verwendung der männlichen Form eines Begriffs stets beide Geschlechter gemeint und aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eigens benannt.

In der vorliegenden Arbeit sind eingetragene Warenzeichen nicht gesondert hervorgehoben. Daher deutet das Fehlen eines entsprechenden Hinweises auch nicht darauf hin, dass es sich dabei um einen freien Warennamen handelt.

ABKÜRZUNGEN

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
°C	Grad Celsius
=	(ist/sind) gleich, entspricht/entsprechen
%	Prozent
∅	Durchmesser
10x	zehnfach, -fach
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BafA1	Bafilomycin A1
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i> (etwa)
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
cm	Zentimeter
Cyt	Zytosol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (Nährlösung nach Dulbecco und Eagle)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase-Enzym
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacid</i> (Ethylenediaminetetraessigsäure)
EPMS	Extrapyramidalmotorisches System
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
ext.	extern
F	Fraktion
f./ff.	folgende
FCCP	Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon
F ₁ F ₀ ATPase	Komplex V der Atmungskette, F ₁ F ₀ Adenosintriphosphat-Synthase
Fp	Flavoprotein
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRP75	<i>glucose related protein 75</i> (mitochondriales 70 Kilodalton-Hitzeschockprotein 9, Mortalin)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/-n
H ⁺	Proton(en), Wasserstoffion(en)
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (humane embryonale Nieren-Zellen)
homozyg.	homozygote/-r
Hsp60	<i>heat shock protein 60</i> (60 Kilodalton-Hitzeschockprotein)
Hz	Hertz
IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i> (innere Mitochondrienmembran)
incl.	inclusive
int.	intern
J.	Jahr(e)
K	Symbol für Lysin
K ⁺	Kaliumion(en)
Kap.	Kapitel

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
kd	<i>knock-down</i> (Knock-down, Suppression)
kDa	Kilodalton
ko	<i>knock-out</i> (Knock-out, vollständige Suppression)
Komplex I	Nicotinamidadenindinukleotid-Ubichinon-10-Oxidoreduktase
Komplex II	Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase
Komplex III	Koenzym-Q-Zytochrom-C-Oxidoreduktase
l	Liter
LC3	Mikrotubulus-assoziierte Proteine 1A/1B Leichtkette 3A
log.	logarithmisch(e)
MDa	Megadalton
MDS	<i>Movement Disorder Society</i>
Mfn2	Mitofusin 2
MG132	N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal
min	Minute(n)
Mit	Mitochondrien, Mitochondrion
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MTCO2	<i>mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II</i> (Zytochrom-C-Oxidase = Komplex IV der Atmungskette, Untereinheit 2)
mut	Mutation, mutiert
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBR1	<i>neighbor of breast cancer 1 gene 1 protein</i> (Protein des Nachbar-Gens 1 des Brustkrebs-Gens 1)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	nicht signifikant
NT	<i>non treated</i> (nicht behandelt)
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i> (äußere Mitochondrienmembran)
p	p-Wert, Signifikanzwert
P	Druck
p62	<i>nucleoporin 62</i> (Nukleoporin 62 Kilodalton)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PD	<i>Parkinson Disease</i> (Parkinson-Erkrankung, -Krankheit)
PINK1	Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN)-induzierte Kinase 1
PINK1mut	homozygote PTEN-induzierte Kinase 1-Mutation
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
R0/1/2	<i>really interesting new gene</i> -Domäne mit Nummerierung
RING	<i>really interesting new gene</i> (sehr interessantes neues Gen)
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde/-n
S1/2	Sicherheitsstufe 1/2 nach Anhang III Teil A Gentechnik-Sicherheitsverordnung
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SH-SY5Y	humane Neuroblastom-Zellen (kommerziell erhältlich)
shRNA	<i>small hairpin</i> Ribonukleinsäure
Skal.	Skala, Skalen, Skalierung(en)

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
SmP	<i>synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding</i> -Domäne (Zielstruktur der mitochondrialen Peptidase)
SOD2	Superoxid-Dismutase 2
TBS	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline</i> (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung)
TBST	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline tween 20</i> (mit Tween 20 versetzte Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung)
TH	Transmembranhelix
TIM	<i>translocase of the inner mitochondrial membrane</i> (Translokase der inneren Mitochondrienmembran)
TOM	<i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i> (Translokase der äußeren Mitochondrienmembran)
Tom20/40/70	Untereinheiten der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran; mit Gewichtsangabe in kDa
Tris	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
Ub	Ubiquitin
Ubl	<i>ubiquitin like</i> (Ubiquitin-ähnlich)
UE	Untereinheit
ÜE	Überexpression
UK	<i>United Kingdom</i> (Vereinigtes Königreich)
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USA	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
V	Volt
V-ATPase	vakuoläre Form der H ⁺ -Adenosintriphosphatase
v. a.	vor allem
Val	Valinomycin
VDAC1	<i>voltage dependent anion channel 1</i> (spannungsabhängiger Anionenkanal)
Veränd.	Veränderung(en)
Vergl.	Vergleich
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel
$\Delta\psi_m$	elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ZD	Zwischen-RING-Domäne

1 | EINLEITUNG

Die Thematik der vorliegenden Arbeit lässt sich im Forschungsfeld der molekularen Mechanismen der Parkinson-Erkrankung (PD) ansiedeln. Die Techniken stammen aus der molekularbiologischen Forschung und der Forschungsgegenstand sind Mitochondrien und deren Abbau. Dieses erste Kapitel leitet von der Erkrankung zum aktuellen Stand der Forschung.

1.1 | PARKINSON-ERKRANKUNG

James Parkinson (1755 - 1824) beschrieb im Jahr 1817 in "An essay on the shaking palsy" (Parkinson 1817) anhand von sechs Patienten einen Symptomenkomplex, der fast 60 Jahre später (1884) von Jean-Martin Charcot als *maladie de Parkinson* (Donaldson 2015) bezeichnet wurde. Da die Terminologie heute uneindeutig ist und der Begriff "Morbus Parkinson" ein deutsches Phänomen¹ zu sein scheint, wird im Folgenden dieser Terminus vermieden und die Krankheit stattdessen als PD bezeichnet.

PD ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Erkrankung und bei steigender Prävalenz waren im Jahr 2016 weltweit etwa 6,1 Millionen Menschen von ihr betroffen (Dorsey et al. 2018). Vor dem 50. Lebensjahr zu erkranken ist selten und nach dem 60. Lebensjahr steigt die Inzidenz steil an (de Lau und Breteler 2006), wobei Männer etwas häufiger betroffen sind (Dorsey et al. 2018). Die Bezeichnung "PD" ist als Sammelbegriff für ätiologisch verschiedene Krankheitsbilder zu verstehen. So fielen bislang das idiopathische Parkinson-Syndrom (etwa 75 %), familiäre/genetische Parkinson-Syndrome (etwa 10 %), symptomatische/sekundäre Parkinson-Syndrome und andere Erkrankungen

¹ 11 Treffer in der Titel-Suche nach „morbus parkinson“ in der PubMed Datenbank des NCBI am 26.05.2019, alle deutschsprachig.

mit Parkinson-Symptomen (Mattle et al. 2013, S. 188; Spatola und Wider 2014) unter diese Bezeichnung.

Als Goldstandard zur klinischen Diagnostik der PD galten lange die *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria* (Hughes et al. 1992) auf Basis der von W. R. G. Gibb beschriebenen Kriterien (Gibb 1988). Zur klinischen Diagnosefindung und Verlaufsbeobachtung (Martinez-Martin et al. 2013) wurde lange Zeit die *Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)* verwendet (Goetz et al. 2008). Deren Fortführung bzw. Revision stellen aktuell die *Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease* (Postuma et al. 2015) dar: Kernbestandteil der klinischen Diagnose der PD bleibt das Parkinson-Syndrom, das durch die Kombination aus Bradykinese, Rigor und Ruhetremor (4 – 6 Hz) gekennzeichnet ist. Ein Entscheidungspfad unter Berücksichtigung von unterstützenden und absoluten Ausschluss-Kriterien sowie *red flags* (Warnzeichen) macht die Unterscheidung in eine "klinisch mögliche" und eine "klinisch etablierte" Erkrankung möglich. Besonders der diagnostische Fehler in der Abgrenzung der PD von anderen Erkrankungen mit Parkinson-Syndrom soll nun minimiert werden (ebenda).

Pathologisch und radiologisch zeichnet sich die PD durch einen fortschreitenden Verlust von Dopamin-produzierenden (dopaminergen) Neuronen in der pigmentierten *substantia nigra pars compacta* im Mittelhirn aus (Forno 1996), der sich klinisch in einem chronisch-progredienten Verlauf der Erkrankung zeigt, wobei erste motorische Symptome ab einem dopaminergen Zellverlust von etwa 50 - 60 % auftreten (Lang und Lozano 1998a; Lang und Lozano 1998b). Gegenstand umfangreicher Forschung sind Risikofaktoren (v. a. Umweltfaktoren und genetische Faktoren), die zur Entstehung von PD beitragen oder führen (Abbas et al. 2018).

Insbesondere im Bezug auf die Gruppe der familiären, also genetischen PD

(etwa 10 % der PD), hat in den letzten Jahren besonders durch die Verfügbarkeit von technischen Hilfsmitteln und entsprechenden Genom-weiten Assoziationsstudien ein rasanter Wissensgewinn stattgefunden (Hardy et al. 2009; Karimi-Moghadam et al. 2018). Nicht zuletzt die jeweils revidierten Nomenklaturen (PARK-Klassifikation, Locus-Symbole für chromosomale Regionen) sind Ausdruck dieses Prozesses. In dieser Arbeit wird nun die Nomenklatur der *International Parkinson and Movement Disorder Society (MDS) Task Force Nomenclature of Genetic Movement Disorders* für genetisch determinierte Bewegungsstörungen verwendet (Marras et al. 2016).

Die Gruppe der hereditären Erkrankungen mit dem Kernelement eines Parkinson-Syndroms/Parkinsonismus und bekannter genetischer Mutation (mit autosomal dominantem, autosomal rezessivem und X-chromosomalem Erbgang) wurde bisher insgesamt der Gruppe der familiären PD zugeordnet. Diese Zuordnung wird in der neuen Nomenklatur verlassen und so lässt sich diese heterogene Gruppe anhand der klinischen Präsentation in vier Untergruppen einteilen (nach Marras et al. 2016): Präsentation wie eine (typische) idiopathische PD (PARK-SNCA, PARK-LRRK2, PARK-VPS35); früh beginnende Erkrankung (PARK-Parkin, PARK-PINK1, PARK-DJ1); mit atypischer Präsentation (PARK-ATP13A2, NBIA/DYT/PARK-PLA2G6, PARK-FBXO7, PARK-DNAJC6, PARK-SYNJ1, DYT/PARK/ATP1A3, DYT/PARK/GCH1, DYT/PARK-QDPR, DYT/PARK-SLC6A3, DYT/PARK-SLC30A10, DYT/PARK-GLB1, NBIA/PARK-WDR45, NBIA/DYT/PARK-CP); mit möglichem vorherrschenden Parkinsonsyndrom, normalerweise jedoch mit anderem Phänotyp (PARK-GBA, SCA-ATXN2, HSP-KIAA1840, HSP-ZFYVE26, POLG, NBIA/CHOREA-FTL, HSP/NBIA-FA2H, NBIA/DYT-PANK2, HSP/NBIA-C19orf12). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die für diese Arbeit wichtige Gruppe der früh beginnenden hereditären PD.

MDS-NAME	GEN	LOCUS	GENPRODUKT	ERBGANG (PENETRANZ)
FRÜH BEGINNENDER PD-PHÄNOTYP				
PARK-Parkin	PRKN	PARK2	Parkin, E3-Ubiquitin-Ligase	AR
PARK-PINK1	PINK1	PARK6	PTEN-induzierte Kinase 1	AR
PARK-DJ1	DJ-1	PARK7	Daisuke-Junko 1	AR

TABELLE 1 | MONOGENE URSACHEN VON FRÜH BEGINNENDER PARKINSON-ERKRANKUNG.

In Anlehnung an Marras und Kollegen, ergänzt durch die Bezeichnung des Genproduktes (Marras et al. 2016). Autosomal rezessiv (AR).

Neben den bekannten Genen, deren Mutationen für die Erkrankungen mit dominierendem Parkinsonismus direkt verantwortlich sind, finden sich insbesondere durch Genom-weite Assoziationsstudien Gene (u. a. MCCC1, COQ7, ALAS1, CTSD, SLC17A5, ASAH1), deren Variationen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Erkrankungen mit Parkinsonismus bergen (Billingsley et al. 2018). Auch die Desoxyribonucleinsäure (DNA) von Mitochondrien kann Mutationen aufweisen, die mit der Entstehung von PD assoziiert sind (Giannoccaro et al. 2017).

Die Erkrankung ist nach wie vor unheilbar, doch existiert heute eine große Bandbreite an multimodalen Therapiemöglichkeiten: von Dopamin-Agonisten, über die Dopamin-Substitution, bis hin zur tiefen Hirnstimulation. (Oertel und Schulz 2016). Andere Therapieansätze, wie die Behandlung mit Coenzym Q10, Kreatin-Monohydrat, Pioglitazon, Stammzelltherapie oder eine Gen-Therapie mit Neurturin konnten lange keine überzeugenden Ergebnisse vorweisen (ebenda) obgleich aktuell im Forschungsfeld der Gen-Therapie (Xhima et al. 2018) und der Immuntherapie (Braczynski et al. 2017) Fortschritte zu verzeichnen sind. PD ist progredient und die Prognose ist vor allem abhängig vom Erkrankungsalter, wobei männliches Geschlecht und die Abwesenheit eines Ruhetremors bei Symptombeginn prognostisch ungünstig sind (Pinter et al. 2015). In der längsten verfügbaren Langzeit-Studie von Patienten mit PD zeigte sich nach 38 Jahren eine etwa doppelt erhöhte Mortalität (ebenda).

1.2 | DER WEG ZUR PATHOGENESE-FORSCHUNG

Im Wesentlichen waren es zwei Meilensteine, die die Grundlage der heutigen Parkinson-Forschung maßgeblich prägten: zum einen die oben erwähnte Beschreibung der ersten monogenetischen Form von Parkinsonismus im Jahr 1997 (Polymeropoulos et al. 1997), zum anderen die Beschreibung von vier Heroin-Abhängigen im Kalifornien (USA) von 1982 durch Dr. J. W. Langston, die nach dem Konsum eines "neuen Heroins" einen eindrucksvollen Parkinsonismus ausbildeten. Das als "neues synthetisches Heroin" verkaufte Heroin war eine Mischung aus dem Pethidin-Derivat 1-Methyl-4-Phenyl-Propionoxy-Piperidin und 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) (Langston et al. 1983), dessen Oxidationsprodukt selektiv über den Dopamin-Transporter in dopaminerge Zellen aufgenommen wird (Javitch et al. 1985) und dort die Nicotinamidadenindinukleotid-Ubichinon-10-Oxidoreduktase (Komplex I) der Atmungskette in Mitochondrien irreversibel inhibiert (Nicklas et al. 1985). Diese Erkenntnisse führten zur "Umwelthypothese" und bei fehlendem Nachweis eines Zusammenhanges von MPTP-ähnlichen Substanzen mit der sporadischen PD zur Therapie des "Doppelschlags", nach der eine genetische Suszeptibilität erst zusammen mit einem toxischen Umgebungsfaktor zur Entstehung von PD führt (Kasper et al. 2016, S. 3206).

Der Weg in Richtung der heute noch favorisierten "Mitochondrien-Theorie" (Hang et al. 2015) zur Erklärung der Pathogenese der PD war endgültig eingeschlagen, als gezeigt wurde, dass bei Parkinson-Patienten die Aktivität von Komplex I (Mizuno et al. 1989; Schapira et al. 1989; Schapira et al. 1990) und Coenzym Q (Shults et al. 1997) in der *substantia nigra* und von Komplex I in Thrombozyten (Parker et al. 1989) erniedrigt ist. Sie wurde wiederum ein Jahrzehnt später durch Tiermodell-Versuche (incl. Primaten) gestützt, in denen die Intoxikation mit Komplex I-Inhibitoren, wie MPTP und Rotenon (ein Insektizid), alle augenfälligen Eigenschaften der PD verursachte (Betarbet et al. 2000; Dauer und

Przedborski 2003; Tanner et al. 2011). Aus den Versuchen mit Rotenon stammte auch die Hypothese, dass besonders dopaminerge Neurone eine außergewöhnliche Prädisposition für die Komplex I-Inhibition aufweisen (Hang et al. 2015), wobei neuronale Zellen generell empfindlicher auf mitochondriale Dysfunktion zu reagieren scheinen als bspw. Astrozyten (Almeida und Medina 1997). In den Neuronen der *substantia nigra* bei PD-Patienten findet sich dann auch ein besonders hoher Anteil an mutierter mitochondrialer DNA (Bender et al. 2006; Kraytsberg et al. 2006), was wiederum Ausdruck dieser speziellen Vulnerabilität in der PD sein könnte.

Mitochondrien sind hunderte bis tausende Organellen in fast jeder Körperzelle und eine essenzielle Quelle von Reduktionsäquivalenten und des universalen Energieträgers Adenosin-Tri-Phosphat (ATP). Sie bilden unter normalen Bedingungen ein hochdynamisches Netzwerk mit ständigen Teilungen (Fission), Fusionen und Transporten entlang der Mikrotubuli des Zytoskeletts aus (Guo et al. 2005; Roy et al. 2015). Geschädigte Mitochondrien generieren eine Vielfalt an Stress-Signalen, die wiederum zu zellulären Fehlfunktionen und schließlich zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen können. Demzufolge ist das Erkennen und Beseitigen von dysfunktionalen Mitochondrien ein integraler Bestandteil für die Aufrechterhaltung zellulärer Homöostase (Hamacher-Brady und Brady 2016).

1.3 | NEUROGENETIK IN DER PARKINSON-FORSCHUNG

Einige der Gene, deren Mutationen für die Entstehung von familiären Formen der PD verantwortlich sind, kodieren für Proteine, die wichtig für die Qualitätskontrolle von Mitochondrien sind (Singleton et al. 2013). Für das Verständnis der vorliegenden Arbeit sind vor allem die Genprodukte des PRKN- und PINK1-Gens von Interesse: Parkin und PTEN-induzierte putative Kinase 1 (PINK1).

1.3.1 | PARKIN

Im Jahr 1997 zeigten genetische Kopplungsanalysen, dass das Chromosom 6q25.2-27 ein bislang unidentifiziertes Gen enthielt, das bei 13 japanischen Familien für autosomal rezessiven, juvenilen Parkinsonismus verantwortlich ist (Matsumine et al. 1997). Ein Jahr später wurde dieses Gen (PRKN) kloniert und weitere Patienten mit Deletionen in diesem Gen gefunden (Kitada et al. 1998). Dies hatte einen Sturm an Beschreibungen von anderen Patienten unterschiedlicher Herkunft mit früh beginnender PD und einer Veränderung (verschiedene Deletionen und Punktmutationen) im PRKN-Gen zur Folge (Hattori et al. 1998a; Hattori et al. 1998b; Leroy et al. 1998; Lücking et al. 1998). Zum aktuellen Zeitpunkt gelten Mutationen im PRKN Gen als die häufigste Ursache für die autosomal-rezessiv vererbte, früh beginnende PD (Kumar et al. 2011). Am häufigsten finden sich homozygote und *compound*-heterozygote (verschiedene Veränderungen im selben Gen auf beiden Allelen) Mutationen (Mata et al. 2004). Die Klinik ähnelt stark der idiopathischen PD und unterscheidet sich praktisch nicht von derjenigen bei PINK1-assoziiierter PD (Kumar et al. 2011; Singleton et al. 2013). Bei aktuell 958 (Stand 12.04.2019), in der umfangreichsten Genotyp-Phänotyp-Datenbank "MDSgene" beschriebenen Patienten mit PRKN-Mutation lag das mediane Erkrankungsalter bei 31 Jahren (verfügbar unter <http://www.mdsgene.org>).

Das Genprodukt des 12 Exon langen PRKN-Gens ist das Protein "Parkin" (Kitada et al. 1998). Es handelt sich um eine zytosolische, ubiquitär vorkommende E3-Ubiquitin-Ligase. Es besitzt an seinem Amino-Ende (N-Terminus) einen Ubiquitin-ähnlichen Abschnitt und an seinem Carboxy-Ende (C-Terminus) einen Ubiquitin-Ligase Abschnitt (Abbildung 1 A) (Shimura et al. 2000; Hristova et al. 2009).

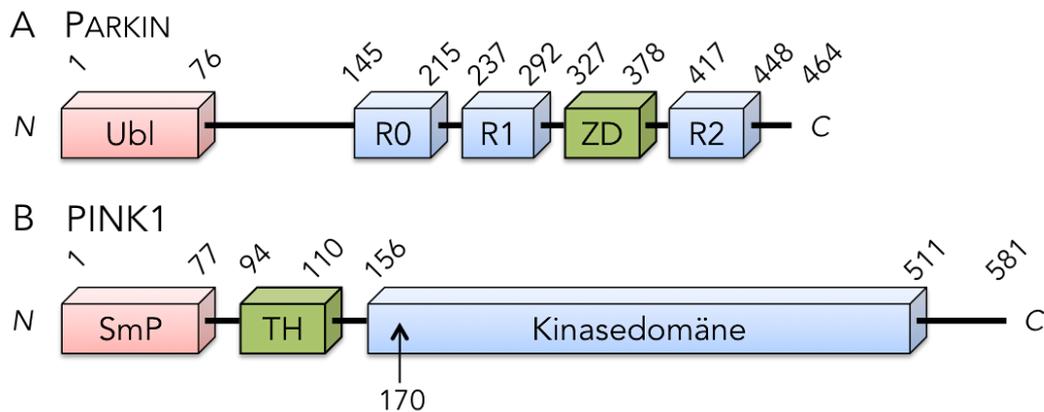


ABBILDUNG 1 | PROTEINSTRUKTUR VON PARKIN UND PTEN-INDUZIERTE PUTATIVE KINASE 1.

Über der schematischen Proteinstruktur findet sich jeweils die laufende Aminosäuren-Position in der Sequenz. Parkin (**A**) enthält eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (Ubl), drei *really interesting new gene* (RING)-Domänen (R0/1/2) und eine Zwischen-RING-Domäne (ZD). PTEN-induzierte putative Kinase 1 (PINK1) (**B**) enthält eine Zielstruktur der mitochondrialen Peptidase (SmP), eine Transmembranhelix (TH) sowie eine Kinasedomäne, in der die Aminosäure-Position 170 markiert ist (↑).

1.3.2 | PTEN-INDUZIERTE PUTATIVE KINASE 1

Das zweite Gen (PINK1), das ebenfalls früh beginnende und rezessiv vererbte Fälle der PD verursacht, wurde 2001 von Prof. E. M. Valente beschrieben und liegt auf Chromosom 1p35-p36 (Valente et al. 2001; Valente et al. 2002b). Die klinischen Symptome der erkrankten Patienten waren mit denen von Patienten mit sporadischer PD (bis auf eine höhere Rate psychiatrischer Symptome) nahezu identisch (Bentivoglio et al. 2001; Valente et al. 2002a) und bei aktuell (Stand 12.04.2019) 139 in der MDSgene Datenbank beschriebenen Patienten mit PINK1-Mutation lag das mediane Erkrankungsalter bei 32 Jahren (verfügbar unter <http://www.mdsgene.org>).

Das Genprodukt des 8 Exon langen PINK1-Gens ist das Protein "Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN)-induzierte Kinase 1" (PINK1) (Valente 2004). Das Protein ist 581 Aminosäuren lang und sein Name stammt aus der Erstbeschreibung in einem Screening nach Proteinen, die durch PTEN-Überexpression hochreguliert wurden (Unoki und Nakamura 2001). An seinem C-

Terminus besitzt das PINK1-Protein eine Kinase-Domäne und an seinem N-Terminus findet sich eine Sequenz, die von der Prozessierungs-Peptidase in der mitochondrialen Matrix erkannt wird (Abbildung 1 B), was darauf hinweist, dass es in Mitochondrien importiert wird (Pickrell und Youle 2015). PINK1 ist an Mitochondrien lokalisiert (Valente 2004) und übernimmt zudem eine wichtige Aufgabe in der Qualitätskontrolle von mitochondrialen Proteinen (Plun-Favreau et al. 2007; Pridgeon et al. 2007).

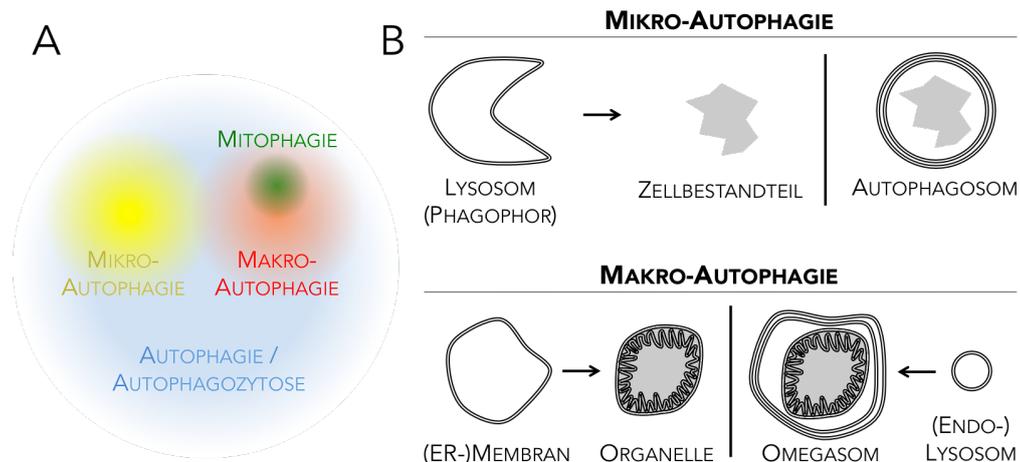
1.4 | MITOCHONDRIALE QUALITÄTSKONTROLLE

Da die Mitochondrien-Funktion für das Überleben der Zelle essentiell ist, gibt es verschiedene Mechanismen wie die Zelle auf exogenen und endogenen mitochondrialen Stress reagieren kann. Man kann sie grob unterscheiden in: Teilung (Fission) und Fusion von Mitochondrien, Mitophagie und Mitochondrien-assoziierte Proteindegradierung.

Ein kontinuierlicher Prozess der Fusion von leicht dysfunktionalen Mitochondrien mit gesunden Mitochondrien und Fission von funktionsfähigen Mitochondrien (Youle und van der Bliek 2012) stellt gewissermaßen den Grundbaustein der mitochondrialen Qualitätskontrolle dar. Bei kleinem Schadensausmaß wird zudem die Expression von mitochondrialen oder nukleären Genen reguliert, um schädigende Effekte zu kompensieren (Nargund et al. 2015).

Ist der Schaden aber zu groß, werden dysfunktionale Mitochondrien durch das lysosomale System im katabolen Prozess der Autophagie abgebaut (Rabinowitz und White 2010). Im Bezug auf Mitochondrien nennt man diesen Prozess, bei dem eine Doppelmembran Zellbestandteile aus dem Zytosol einhüllt, anschließend mit Endolysosomen fusioniert und dadurch dessen innere Membran und sein Inhalt abgebaut werden (Mizushima 2007), auch "Mitophagie" (Hamacher-Brady und Brady 2016). Abbildung 2 gibt einen Überblick über das Begriffsspektrum von

Autophagie.

**ABBILDUNG 2 | AUTOPHAGIE-FORMEN.**

Begriffsfeld von Autophagie (A) und grob schematischer Unterschied zwischen Mikro- und Makro-Autophagie (B). Während bei der Mikro-Autophagie Zellbestandteile von Lysosomen umschlossen und via Autophagosom abgebaut werden, umschließen bei der Makro-Autophagie u. a. vom endoplasmatischen Retikulum (ER) abgeleitete Membranen Zell-Organellen und fusionieren zur Degradierung anschließend mit Endolysosomen.

Bei der Mitophagie als Teil der Makroautophagie werden v. a. größere Zell-Bestandteile zuerst mit Membranen v. a. aus dem endoplasmatischen Retikulum umschlossen, die dann mit Lysosomen fusionieren (Hu et al. 2015), während hingegen bei der Mikro-Autophagie (und der Chaperon-assoziierten Autophagie) Zellpartikel mittels Vesikelbildung durch Lysosomen direkt abgebaut werden. Die Mitophagie wird vermittelt durch Ubiquitin-bindende Autophagie-Rezeptor-Proteine, wie das zytosolische *nucleoporin 62* (Pankiv et al. 2007), Optineurin (Wong und Holzbaur 2014) oder das Protein des Nachbar-Gens 1 des Brustkrebs-Gens 1 (NBR1) (Chan et al. 2011), die an das Mikrotubulus-assoziierte Protein 1A/1B-Leichtkette 3 (LC3) mit ihrer gemeinsamen LC3-interagierenden Region binden. LC3-II entsteht aus der zytosolischen Form LC3-I durch C-terminale Konjugation mit Phosphatidyl-Ethanolamin (McLelland et al. 2014), befindet sich auf der Oberfläche von Autophagosomen sowie isolierenden Membranen (Mizushima und Yoshimori 2007) und bindet an Ubiquitin und Polyubiquitin. Die

Konversion von LC3-I zu LC3-II lässt sich im zellulären Experiment deshalb als "Makroautophagie-Marker" verwenden.

Vom lysosomalen System unterscheidet man grundsätzlich das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Es dient vor allem dem Abbau von zuvor markierten zytosolischen Proteinen. Es besteht aus Enzymen, die Ubiquitin aktivieren (E1), konjugieren (E2) und an andere Proteine ligieren (E3), aus deubiquitylierenden Enzymen, aus vermittelnden Proteinen und schließlich aus dem degradierenden Proteasom. Ubiquitin ist ein ubiquitär vorkommendes, 76 Aminosäuren langes Protein. Durch die Verknüpfung an Lysin43 (K43) mittels Ubiquitin-Ligasen (E3) besteht die Möglichkeit der Bildung von Ubiquitin-Ketten, sogenannten Polyubiquitinierungen. In Säugetieren geschieht der Ubiquitin-getriggerte Abbau durch das etwa 2 MDa schwere 26 S-Proteasom. Dieses besteht wiederum im Inneren aus einem 20 S-Kernpartikel mit Protease-Aktivität und an jedem Ende aus einem regulativen 19 S-Partikel mit ATPase-Aktivität (Zwickl et al. 1999). Durch den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau (u. a. via Mitochondrien-assoziiierter Proteindegradierung; Heo und Rutter 2011) hat das UPS großen Einfluss auf die mitochondriale Funktionsfähigkeit, wobei die Trennung zwischen lysosomalem System und UPS dadurch zunehmend unscharf wird, dass immer mehr Komponenten des UPS identifiziert werden, die den Prozess der Mitophagie beeinflussen (Franz et al. 2015).

1.5 | PTEN-INDUZIERTE KINASE 1- UND PARKIN-VERMITTELTE MITOPHAGIE

Im Jahr 2006 erbrachten genetische Epistase-Untersuchungen an *Drosophila*-Fruchtfliegen, dass die Proteine PINK1 und Parkin in ein und demselben Stoffwechselweg zusammenhängen (Clark et al. 2006; Park et al. 2006). Hierbei vermittelt die Akkumulation von PINK1 auf geschädigten Mitochondrien die zunehmende Ubiquitinierung von Proteinen ihrer Oberfläche durch Parkin

(Abbildung 3).

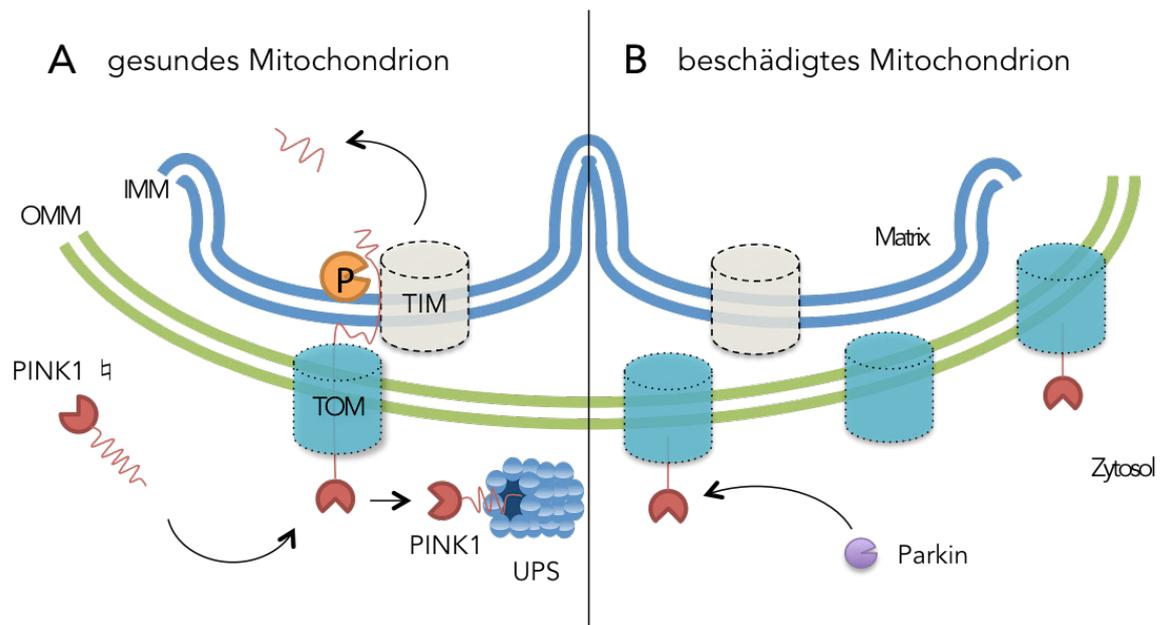


ABBILDUNG 3 | ABBAU UND AKKUMULATION VON PTEN-INDUZIERTER KINASE 1.

Unter Normalbedingungen (A) wird das Transkriptionsprodukt des PINK1-Gens (PINK1 \downarrow) mithilfe des Translokase-Komplexes (TOM/TIM), der an der inneren und äußeren Mitochondrienmembran (OMM/IMM) lokalisiert ist, prozessiert: Die mitochondriale Peptidase (P) spaltet den endomitochondrialen Anteil des PINK1 \downarrow , der übrige Teil (PTEN-induzierte putative Kinase 1 = PINK1) wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut. Unter mitochondrialen Stress (B) funktioniert dieser Prozess nicht suffizient, PINK1 akkumuliert auf der Oberfläche des Mitochondrions und aktiviert Parkin.

Unter Normalbedingungen (Abbildung 3 A) wird das Transkriptionsprodukt des PINK1-Gens durch den Translokase-Komplex der äußeren und inneren Mitochondrienmembran ins Mitochondrion transportiert, dort durch die mitochondriale Peptidase N-terminal gespalten und anschließend im Zytosol mithilfe des Proteasoms durch das UPS abgebaut (Yamano und Youle 2013). Durch diesen kontinuierlichen Import- und Abbau-Zyklus befinden sich sehr kleine bis nicht messbare Mengen von PINK1 auf der Oberfläche funktionsfähiger Mitochondrien (Pickrell und Youle 2015). Dieser Zyklus kann von mitochondrial depolarisierenden Substanzen, Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung, genetischen Stressoren, Umwelteinflüssen und sogar ungefalteten Proteinen

unterbrochen werden (Lazarou et al. 2012; Okatsu et al. 2013), sodass PINK1 im Verhältnis 2 : 1 an den Translokase-Komplex der äußeren Mitochondrienmembran gebunden, auf dysfunktionalen Mitochondrien akkumuliert und Parkin aktiviert (Abbildung 3 B). Die konsekutiven, PINK1-vermittelten Phosphorylierungen von Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran (OMM), wie z. B. Mitofusin 2 (Mfn2), stellen somit eine Art Schadenssignal beschädigter Mitochondrien dar (Chen und Dorn 2013).

PINK1 phosphoryliert Parkin mithilfe seiner C-terminalen Kinase (Geisler et al. 2010; Matsuda et al. 2010; Narendra et al. 2010; Vives-Bauza et al. 2010) direkt an Serin65 innerhalb der Ubiquitin-ähnlichen (Ubl) Domäne von Parkin, was die Ursache für dessen Verlagerung an Mitochondrien (Narendra et al. 2008) sowie die Aktivierung seiner E3-Ligase ist (Kondapalli et al. 2012; Shiba-Fukushima et al. 2012). Aber auch Ubiquitin wird von PINK1 an Serin65 phosphoryliert und dieses Phospho-Ubiquitin ist ebenfalls in der Lage, die E3-Ligase von Parkin zu aktivieren (Kane et al. 2014; Kazlauskaite et al. 2014; Koyano et al. 2014). Die Polyubiquitinierungen durch die E3-Ligase von Parkin sind atypisch über Lysin63 (K63) verknüpft. Während K48-verknüpfte Ubiquitinketten das klassische Signal für den Abbau durch das Proteasom darstellen (Chan et al. 2011), sind die K63-Verknüpfungen durch Parkin ein Signal für verschiedene regulierende zelluläre Prozesse (Hicke 2001), wie v. a. den Transport entlang von Mikrotubuli in die perinukleäre Region, wo sich Mitochondrien-Konglomerate bilden (Okatsu et al. 2010). Die so ubiquitinierten Proteine können darüberhinaus noch von deubiquitylierenden Enzymen, wie bspw. Ubiquitin-spezifische Peptidase 30 (Cunningham et al. 2015), modifiziert und somit deren Abbaurate beeinflusst werden.

Die aktivierte E3-Ubiquitin-Ligase von Parkin führt zur Ubiquitinierung einer Vielzahl von Proteinen (Sarraf et al. 2013). Bspw. werden wiederum Mitofusine, die

für die mitochondriale Teilung wichtig sind, von Parkin ubiquitiniert und (vermittelt durch das Protein Cdc48/p97; Xu et al. 2011) durch das Proteasom abgebaut (Tanaka et al. 2010).

Neben der Mitophagie, die durch PINK1-getriggerte, Parkin-abhängige Ubiquitinierungen induziert wird, existiert ein weiterer alternativer Mechanismus der Qualitätskontrolle: Beschädigte Mitochondrien-Komponenten können selektiv in sogenannten *mitochondria derived vesicles* (mitochondrial-abgeleiteten Vesikeln) durch Fusion mit Endosomen in Lysosomen abgebaut werden (Soubannier et al. 2012).

Die exakte Rolle der verschiedenen Abbau-Systeme in der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie und damit der Kern der Haupttheorie über die molekularen Ursachen der neuronalen Veränderungen bei der PD ist noch immer nicht abschließend geklärt und Gegenstand der Forschung.

2 | FRAGESTELLUNG

Aufbauend auf dem Forschungsstand von Anfang 2013 sollen durch die vorliegende Arbeit folgende Aspekte der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie in der Erforschung der molekularen Ursachen der Neurodegeneration in der PD untersucht werden:

1. Die Rolle des UPS und des lysosomalen Systems bzw. Autophagie in der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie.
2. Untersuchung der exakten subzellulären Lokalisation des UPS während der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie.
3. Vergleich zweier gebräuchlicher Induktoren von mitochondrialem Stress und ihrer Aktivierung von Autophagie: Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon (FCCP) und Valinomycin.

3 | MATERIAL UND METHODEN

3.1 | MATERIAL

3.1.1 | CHEMIKALIEN

CHEMISCHER STOFF	HERSTELLER
Accutase	Life Technologies
Agarose	Biozym
Blastizidin	Life Technologies
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
CompleteMini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT; C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Epoxomycin	Sigma-Aldrich
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	J.T. Baker
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetertraacetic Acid (EDTA)	Merck
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories
Fluoroshield Mounting Medium mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Abcam
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche
Methanol (CH ₃ OH)	Th. Geyer GmbH
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)	Sigma-Aldrich
Milchpulver, Blotting-Grade, fettarm	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (NP-40)	Affymetrix
Normal Goat Serum (NGS)	Life Technologies
NuPAGE antioxidant	Life Technologies
NuPAGE LDS sample buffer (4x)	Life Technologies
NuPAGE MES SDS running buffer (20x)	Life Technologies
NuPAGE transfer buffer (20x)	Life Technologies
Opti-MEM	Life Technologies
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Life Technologies
Phosphate Buffered Saline (PBS, 10x)	PAA Laboratories
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Polybren (hexadimethrine bromide)	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein Standards, All Blue	Biorad
Puromycin	Life Technologies
Salzsäure (HCl)	Merck
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma-Aldrich
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck
Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ ClNO ₃)	Merck
Tween-20	Biorad
Valinomycin (C ₅₄ H ₉₀ N ₆ O ₁₈)	Sigma-Aldrich

3.1.2 | LÖSUNGEN

NAME	ZUSAMMENSETZUNG
Blockierlösung	1 % Magermilchpulver, 1x TBST
Homogenisierungspuffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 250 mM Sucrose, pH 7.4
Immunpräzipitation Lysepuffer	150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 % NP-40
Immunpräzipitation Waschpuffer	150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 0,1 % NP-40
LDS Probenpuffer (1x)	1x NuPAGE LDS sample buffer (4x), 50mM DTT
Medium, Nährlösung	DMEM, high glucose (4,5 g/l), 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin
Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Puffer	25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % DOC, 0.1 % SDS
Transferpuffer	1x NuPAGE Transferpuffer (20x), 10 % Methanol
Tris-buffered saline (TBS, 10x)	9 % NaCl, 250 mM Urea, pH 7.5
Tris-buffered saline tween-20 (TBST, 1x)	1xTBS, 0.1 % Tween-20

3.1.3 | KITS UND FERTIGE VERBRAUCHSMATERIALIEN

NAME	HERSTELLER
DC Protein Assay Kit	Biorad
NOVEX Immunoprecipitation Kit – Dynabeads Protein A	Life Technologies
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris mini Gel	Life Technologies
Amersham Hyperfilm ECL (5 x 7'')	GE LifeSciences
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, ThermoScientific

3.1.4 | ANTIKÖRPER

NAME	TYPISCHE VERDÜNNUNG	HERSTELLER
(HRP) -conjugated Anti-mouse, horseradish peroxidase	1 : 10.000	Santa Cruz
(HRP) -conjugated Anti-rabbit, horseradish peroxidase	1 : 10.000	Santa-Cruz
AlexaFluor488 conjugated Goat Anti-mouse	1 : 1.000	Life Technologies
AlexaFluor488 conjugated Goat Anti-rabbit	1 : 1.000	Life Technologies
AlexaFluor594 conjugated Goat Anti-rabbit	1 : 1.000	Life Technologies
AlexaFluor594 conjugated Goat Anti-mouse	1 : 1.000	Life Technologies
Anti-ComplexII	1 : 100.000	Mitosciences
Anti-ComplexIII	1 : 1.000	Mitosciences
Anti-ComplexV	1 : 500.000	Mitosciences
Anti-FLAG M2	1 : 10.000	Sigma-Aldrich
Anti-GAPDH	1 : 15.000	Cell Signaling
Anti-GRP75	1 : 1.000.000	Abcam
Anti-Hexokinase1	1 : 2.000	Cell Signaling
Anti-Hsp60	1 : 4.000	Cell Signaling
Anti-LC3B	1 : 1.000	Abcam
Anti-Mitofusin 2	1 : 1.000	Abcam
Anti-MTCO2, subunit of complex IV	1 : 1.000	Mitosciences
Anti-Rhot1	1 : 2.000	Abcam
Anti-SOD2	1 : 2.000	Santa Cruz
Anti-Tom40	1 : 4.000	Santa Cruz
Anti-Tom70	1 : 500	Abcam
Anti-Tomm20	1 : 8.000	Santa Cruz

NAME	TYPISCHE VERDÜNNUNG	HERSTELLER
Anti-Ubiquitin	1 : 500	Cell Signaling
Anti-UPS α 2	1 : 4.000	Santa Cruz
Anti-UPS α 7	1 : 1.000	Santa Cruz
Anti-VDAC1	1 : 20.000	Abcam
Anti- β -actin	1 : 500.000	Sigma-Aldrich
Anti- β -tubulin	1 : 50.000	Sigma-Aldrich

3.1.5 | NUKLEOTIDE

NAME	HERSTELLER
Oligonukleotide (Primer)	MWG Biotech
pCMV-dR8.2 dvpr	B. Weinberg (Addgene plasmid #8455)
pCMV-VSV-G	B. Weinberg (Addgene plasmid #8454)
pLKO.1 puro	B. Weinberg (Addgene plasmid #8453)

3.1.6 | GERÄTE

GERÄT	HERSTELLER
Axiovert 200 M Inverted Microscope	Carl Zeiss
Brutschrank Hera Cell 150	Thermo Scientific
Confocal Laser Microscope LSM 710 T-PMT	Carl Zeiss
Countess Automated Cell Count	Invitrogen
DynaMag-2 Magnetic Particle Concentrator	Life Technologies
Electroporator 2510	Eppendorf
Homogenisator	Eurostar IKA Werke
pH-Meter InoLab	WTW
Photoentwicklung Curix 60	AGFA Healthcare
Steril-Bank HeraSafe	Thermo Scientific
Synergy HT Plate Reader	BioTek
XCell II Blot-Modul	Invitrogen
XCell Surelock Mini	Invitrogen
Zentrifuge Microfuge 22R	Beckman-Coulter
Zentrifuge Multifuge 1	Thermo Scientific
ZOOM Dual Power Supply	Invitrogen

3.1.7 | PROGRAMME

NAME	HERSTELLER
AxioVision	Carl Zeiss AG
Gen5 Data Analysis Software	BioTek Instruments, Inc.
Gimp on OSX 2.8.6	OpenSource, SKL, lisanet.de, 2013
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.
TL100 Image Processing Program	TotalLab
Office 365 University	Microsoft

3.2 | METHODEN

3.2.1 | ZELLKULTUR

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen und für die eigene Arbeitssicherheit an der Steril-Bank unter dem Abzug im Labor mit S1 Standard durchgeführt. Die verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293 und humanen Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y sind kommerziell erhältlich und die verwendeten primären humanen dermalen Fibroblasten (HUANG et al. 1994; Auburger et al. 2012) aus Hautproben (Villegas und McPhaul 2005) stammten aus dem Dachprojekt der Arbeitsgruppe Dr. Aleksandar Rakovic und waren bereits ein etabliertes Zellmodell (Rakovic et al. 2010). Die Mutation der verwendeten Zellen (PINK1mut) ist eine homozygote *missense* Mutation (c.509T>G; p.V170G) im PINK1-Gen (in Abbildung 1 B mit ↑ markiert), die zum Funktionsverlust von PINK1 führt (Kawajiri et al. 2011). Die Kontroll-Fibroblasten stammten von phänotypisch gesunden Familienmitgliedern der PINK1mut-Patienten, um einen isogenen Hintergrund zu garantieren. Für die Verwendung der Fibroblasten lag zu Beginn der Laborarbeit für diese Dissertation das schriftliche Einverständnis aller Spender sowie ein positives Ethikvotum der lokalen Ethikkommission vor.

3.2.1.1 | KULTIVIERUNG

Humane Neuroblastom-Zellen, HEK-Zellen und primäre, dermale, humane Fibroblasten wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, incl. 10 % fetalem bovinen Serum, 4,5 g/l Glukose und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung in Petrischalen von 10 bzw. 15 cm Durchmesser im Inkubator gelagert.

3.2.1.2 | KLONIERUNG UND TRANSFEKTION

Um die verschiedenen Zellreihen mit unterschiedlichen Expressionsvarianten herzustellen, wurde das Prinzip der RNA-Interferenz genutzt, bei der *small hairpin* Ribonukleinsäure (shRNA), die eine Haarnadelstruktur bildet, spezifisch an *messenger*-Ribonukleinsäure bindet und so die Expression des Translationsprodukts hemmt. Zur Herstellung bspw. eines PINK1-Knock-downs in Neuroblastom-Zellen und Fibroblasten wurde ein retroviraler Vektor konstruiert. Hierfür wurde PINK1-shRNA mithilfe der Restriktionsenzyme *AgeI* und *EcoRI* in einen pLKO.1 Vektor, der eine genetische Resistenz gegen Puromycin beinhaltet, kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden in lentivirale Partikel verpackt, die das Plasmid ins Genom der Zelle einbauen und so eine stabile Expression gewährleisten. Für den Reaktionsansatz zur Erzeugung der lentiviralen Partikel wurden in 300 µl Opti-MEM (serumfrei) gelöst:

- 2,5 µg pLKO.1-shRNA Plasmid (lentivirales Rückgrat, Puromycinresistenz)
- 2,5 µg pCMV-dR8.2 Plasmid (lentiviraler Verpackungsvektor)
- 300 ng pCMV-VSV-G Plasmid (lentiviraler Hüllenvektor)

Aus einem zuvor angesetzten *mastermix* (FuGENE Transfektionsreagenz & Opti-MEM, Verhältnis 3:37, 5 min, RT) wurden 80 µl pro Ansatz zugefügt, vermischt und ca. 25 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde zusammen mit HEK-Zellen (50 - 80 % Konfluenz) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (ohne Antibiose) in 10 cm Petrischalen inkubiert (12 - 15 h, 37°C, 5 Vol. - % CO₂). Um den Transfektionsansatz zu entfernen, wurde das alte Transfektionsreagenz in der Petrischale durch 10 ml neues Nährmedium ersetzt und die Zellen erneut inkubiert (24 h, 37°C, 5 Vol. - % CO₂). Dieses Medium, in dem sich nun die von den HEK-Zellen produzierten lentiviralen Partikel befanden, wurde von den Zellen abgenommen und bei 4°C gelagert. Erneut wurden 10 ml Nährmedium auf die Zellen gegeben, inkubiert (24 h, 37°C, 5 Vol. - % CO₂) und

abgenommen. Um sie zellfrei zu machen, wurde diese Fraktion zusammen mit der bei 4°C gelagerten Fraktion vom Vortag zentrifugiert (5 min, 1.000 g). Die lentiviralen Partikel wurden je nach beabsichtigtem Zeitraum bei 4°C, - 20°C oder - 80°C gelagert.

Um Neuroblastom-Zellen oder Fibroblasten zu transfizieren, wurden diese Zellen in Petrischalen (Ø 6 cm) bei etwa 70 % Konfluenz in Nährlösung (incl. 8 µg/ml Polybren zur Steigerung der Transfektionseffizienz) mit 50 - 100 µl virushaltiger Lösung beimpft und inkubiert (über Nacht, 37°C, 5 Vol. - % CO₂). Nun wurde der Nährlösung 2 µg/ml Puromycin zugesetzt, um erfolgreich transfizierte Zellen herauszuselektieren. Der Mediumwechsel erfolgte alle 24 h.

Analog wurden lentivirale, bicistronische Plasmide mit einer internen, ribosomalen Eintrittsstelle und einem Resistenzgen für Blastizidin zusammen mit dem Gen für Parkin in lentivirale Partikel untergebracht, die Zellen anschließend damit transfiziert und mit 7 µg/ml Blastizidin selektiert, um eine Überexpression für Parkin zu erzeugen.

Die Arbeitsschritte im S2-Labor wurden dankenswerterweise von Dr. Aleksandar Rakovic übernommen.

3.2.1.3 | ZELLPASSAGE

Sobald der Zellbesatz am Boden der Petrischale eine Dichte von 80 - 100 % aufwies oder der pH-Indikator im Medium anfang umzuschlagen, wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit *phosphate buffered saline* (PBS) (1x) gewaschen und mit 0,5 bzw. 1 ml Accutase (nach Ø der Petrischale, 10 bzw. 15 cm) enzymatisch vom Boden abgelöst. Nach einer beschleunigenden Inkubation (5 min, 37°C, 5 Vol. - % CO₂) wurde die Ablösung unter dem Mikroskop überprüft und die Wirkung von Accutase mit Medium (11,5 ml bei Ø 10 cm; 11 ml bei Ø 15 cm) neutralisiert. Je nach vorheriger Zelldichte wurden die Zellen nun im

Verhältnis 1 : 3 bis 1 : 6 in die Petrischale zurückgegeben, der Überschuss an Zellen verworfen und die Petrischalen mit frischer Nährlösung bis auf 10 ml (\varnothing 10 cm) bzw. 23 ml (\varnothing 15 cm) aufgefüllt. Je nach Zelllinie wurden noch 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin oder 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastizidin als Selektionsmarker hinzugefügt.

3.2.2 | ZELLEXPIMENTE

Zur Durchführung von Experimenten an der Zellkultur wurden bei der Zellpassage der gewünschten Zelllinie 2 ml vom Überschuss auf insgesamt 10 ml Medium resuspendiert und einige Minuten gut durchmischt. Die Zellen wurden mit der automatischen Zellzählung je zweimal gezählt und anschließend typischerweise je 1.500.000 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausplattiert. Nachdem die Zellen einige Stunden später fest am Boden hafteten, wurde das Experiment durchgeführt, indem die Zellen mit 2 ml/Well an Medium, in dem die entsprechenden Chemikalien gelöst waren, inkubiert wurden. Der Zellbesatz wurde zum Ende des Experiments mikroskopisch überprüft, 1 ml aus jedem Well abpipettiert, die Zellen nun nicht enzymatisch, sondern mechanisch vom Plattenboden abgelöst und mit den, im Well verbliebenen 1 ml Flüssigkeit, resuspendiert, abpipettiert, in 1,5 ml Eppendorf-Zentrifugen-Röhrchen zentrifugiert (5 min, 8.000 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet konnte zu diesem Zeitpunkt entweder direkt weiterverarbeitet werden oder bei - 80°C gelagert werden.

3.2.3 | MITOCHONDRIENEXTRAKTION

Für die Trennung von mitochondrialer und zytosolischer Fraktion der untersuchten Zellen wird wesentlich mehr Material als oben beschrieben benötigt. Daher sind für die Zellkulturexperimente mit anschließender Mitochondrienextraktion statt der 6-Well-Platten ganze Petrischalen verwendet worden. Die entstandenen Zellpellets wurden in 1 ml kaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert, mithilfe des Homogenisators bei etwa

1.000 rpm sowie jeweils 50 Zyklen homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 1.500 g, 4°C). Der Überstand (mit Zytosol und Mitochondrien) wurde abermals zentrifugiert, das Pellet mit den groben, zellulären Bestandteilen jeweils verworfen und der letzte Überstand wiederum zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4°C). Der so entstandene Überstand enthielt die zytosolische Fraktion und das Pellet die Mitochondrien. Dieses Mitochondrienpellet wurde nun in 500 µl kaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4°C). Das wiederum entstandene Pellet wurde, soweit möglich, getrocknet, um eine Kontamination mit Zytosol zu minimieren. Die zytosolische Fraktion wurde in Amicon Ultra 10K Zentrifugenfiltern von Merck Millipore nach Protokoll etwa im Verhältnis 5:1 aufkonzentriert. Beide Fraktionen konnten zu diesem Zeitpunkt bei -20°C oder -80°C aufbewahrt werden.

3.2.4 | IMMUNPRÄZIPITATION

Die Immunpräzipitation ermöglichte die Isolierung von Mfn2 aus Neuroblastom-Zellen. Hierfür wurden pro untersuchter Zellreihe zwei Petrischalen (Ø 15 cm) mit nahezu komplett konfluierendem Zellbesatz behandelt und die Zellen mechanisch vom Boden abgelöst. Aus den Zellen wurden die Mitochondrien extrahiert (siehe oben), die zytosolische Fraktion verworfen und die Mitochondrien-Pellets in 1 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert (30 min, 4°C). Nach dem Zentrifugieren (20 min, 16.000 g, 4°C) wurde in dem Überstand, der nur noch die kleineren mitochondrialen Proteine enthielt, eine Proteinkonzentrationsmessung (siehe Kap. 3.2.5.2) durchgeführt und die Gesamtkonzentrationen mithilfe von Lysepuffer auf 2 mg/ml normalisiert. Die eigentliche Präzipitation erfolgte mithilfe des NOVEX *Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein A*, dessen Prinzip auf der magnetischen Separierung von Proteinen, die an Eisenpartikel gebunden sind, beruht. Dazu wurden je 1 ml Probe

mit 5 µg primärem Antikörper vermischt (3 h, RT), dem Ansatz jeweils 100 µl *Dynabeads* zugesetzt, dieser Mix inkubiert (1 h, RT) und anschließend mit Waschpuffer (3 x 5 min, 1 ml) gewaschen. Um die gebundenen Proteine dann wieder von den *Dynabeads* zu lösen, wurde der Ansatz mit einer Lösung aus 80 µl *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer, 30 µl *NuPAGE LDS sample buffer* (4x) und 10 µl 500 mM Dithiothreitol inkubiert (10 min, 70°C). Nach der Denaturierung der Proteine (4 min, 95°C) wurden sie (analog Kap. 3.2.5.3 ff.) in der Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

3.2.5 | WESTERN BLOT

Um eine Immunoblot-Analyse von Proteinen nach dem Western Blot-Verfahren durchzuführen, mussten zuerst die zu untersuchenden Proteine aus dem größeren Organell (Zelle, Mitochondrion) extrahiert, dann die Konzentration bestimmt, schließlich die Proben auf ein *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*-Gel aufgetragen, der Transfer durchgeführt und die Proteine mithilfe von primären und sekundären Antikörpern in der Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

3.2.5.1 | PROTEINEXTRAKTION

Um Proteine aus einem Pellet mit verschiedenen Bestandteilen herauszulösen, wurden diese in Abhängigkeit von der Pellet-Größe in einem kleinen Volumen (ca. 70 - 100 µl) RIPA-Puffer (incl. Phosphatase- & Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Nach Inkubation (25 min, auf Eis) zur Lyse der Membranen wurde das Lysat zentrifugiert (20 min, 16.000 g, 4°C), um die großen Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand enthielt nun die zu untersuchenden Proteine und konnte bei - 80°C gelagert werden.

3.2.5.2 | MESSUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Proteinkonzentration von Zell- oder Mitochondrien-Lysaten wurde in 96-Well-Platten mithilfe des *DC Protein Assay Kit* von Biorad nach Protokoll durch photometrische Absorption (750 nm) bestimmt. Die Vergleichsstandards wurden mit bovinem Serum-Albumin (0,5 - 4 mg/ml) hergestellt.

3.2.5.3 | NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Nach der Proteinkonzentrations-Messung wurden jeweils 10 µg Protein vorgelegt, die Volumendifferenz zu 6,5 µl (bzw. 8 µl oder 10 µl, je nach Proteinkonzentration des Lysates) mit RIPA (incl. Phosphatase- & Protease-Inhibitoren) aufgefüllt, mit 1 µl (bzw. 1,2 µl oder 1,5 µl) 500 mM Dithiothreitol (10x) sowie 2,5 µl (bzw. 3,1 µl oder 3,8 µl) *NuPAGE LDS sample buffer* (4x) vermischt, denaturiert (4 min, 95°C) und kurz handzentrifugiert.

Die Proben wurden nun zusammen mit dem Marker *Precision Plus Protein Standards, All Blue* von Biorad auf *NuPAGE Novex 4 - 12 % Bis-Tris mini* Gele von Life Technologies aufgetragen. Als Laufpuffer wurde *NuPAGE MES SDS running buffer* (1x) verwendet. Die ersten vier Minuten der Gelelektrophorese wurden bei 100 V, danach ca. 91 Minuten bei 150 V durchgeführt. Die genaue Laufzeit wurde optisch anhand des Marker-Fortschritts auf dem Gel bestimmt.

3.2.5.4 | TRANSFER

Es wurde für alle Transfers das sogenannte *wet transfer*-Verfahren verwendet. Die Proteine wurden innerhalb eines *XCell Surelock Blot*-Moduls nach Protokoll zwischen Schwämmen und Filterpapieren sowie in *NuPAGE transfer buffer* (1x), incl. 10 % Methanol eingelegt und frei von Luftbläschen vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (1 h, 32 V).

3.2.5.5 | DETEKTION

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose-Membran gewaschen (5 min, TBST, 1x) und blockiert (1 h, TBST incl. 1 % Milch, RT), was Kreuzreaktionen des primären Antikörpers mit unspezifischen Proteinen verhindert. Nun wurde die Membran mit dem primären Antikörper unter ständiger Rotation inkubiert (über Nacht, TBST incl. 1 % Milch, 4°C). Am nächsten Tag wurde sie zunächst vom Primärantikörper frei gewaschen (3 x 5 min, TBST (1x)) und anschließend mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1 h, TBST incl. 1 % Milch, RT). Nach erneutem Waschen (3 x 5 min, TBST (1x)) wurde die Membran nach Protokoll mit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* behandelt, wobei die Meerrettich-Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, das enthaltene Luminol oxidierte. Das emittierte Lichtsignal wurde in der Photoentwicklung auf einem Photofilm sichtbar gemacht.

3.2.6 | IMMUNZYTOCHEMIE

Für die Immunzytofärbung wurden Neuroblastom-Zellen und Fibroblasten auf Deckgläschen in 12-Well-Platten ausplattiert und inkubiert (24 h, 37°C, 5 Vol. - % CO₂). Nach dem Waschen mit PBS (1x) wurden die Zellen mit einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd in PBS (1x) fixiert (15 min, RT). Das Paraformaldehyd wurde entfernt, die Zellen erneut mit PBS (1x) gewaschen, mit einer Lösung aus 0,1 % Nonidet P-40 in PBS (1x) permeabilisiert (10 min, RT) und schließlich mit einer Lösung aus 10 % *normal goat serum* in PBS (1x) blockiert (1 h, RT). Der primäre Antikörper wurde in hoher Konzentration in 1 % *normal goat serum* in PBS (1x) gelöst und mit den Zellen inkubiert (1 h, RT). Nach gründlichem Waschen (4 x 2,5 min, PBS (1x)) wurden die Zellen nun mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1 h, RT), der mit fluoreszierenden AlexaFluor-Farbstoffen konjugiert ist. Danach folgten erneutes Waschen (4 x 2,5 min, PBS (1x)) und

Fixieren der Zellen mit 6 - 8 μ l *Fluoroshield Mounting Medium* mit *4',6-diamidino-2-phenylindole* auf Objektträgern, um diese dann im Dunkeln trocknen zu lassen. Schließlich konnten die Zellen unter dem konfokalen (Laser-)Mikroskop analysiert werden.

3.2.7 | AUSWERTUNG UND ANALYSEN

Zur quantitativen Analyse der Mitochondrienfläche auf den Lasermikroskop-Bildern aus den Experimenten der Immunzytochemie wurden einzelne Pixel (getrennt nach RGB-Bildkanälen) mithilfe von Gimp on OSX gezählt. Die Proteinmengen auf den Western Blots wurden mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms TL100 von TotalLab quantifiziert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Prism 6 von GraphPad und die Graphen sind mit Microsoft Office 365 University Excel generiert. Als Signifikanzniveau wurden 5 % bzw. 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit in den *analysis of variance*-Analysen angenommen.

4 | ERGEBNISSE

Bisher konnten in depolarisierten Mitochondrien Polyubiquitinierungen und der Abbau von Proteinen der OMM beobachtet werden, die PINK1/Parkin-vermittelt waren (Geisler et al. 2010; Narendra et al. 2010; Vives-Bauza et al. 2010). Unter Inhibierung des UPS waren diese Beobachtungen nicht mehr zu machen (Chan et al. 2011). Daher lag die Vermutung nahe, dass dem UPS im Prozess der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie eine Rolle zukommt, die derjenigen des lysosomalen Systems gleichwertig ist.

In diesem Ergebnisteil wird nun zunächst anhand von Neuroblastom- und Fibroblasten-Zellmodellen gezeigt, dass die PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie durch die Inhibition des UPS in Zellen mit depolarisierten Mitochondrien in nicht mehr beobachtbaren Dimensionen abläuft. Hier findet sich auch ein kleiner methodischer Exkurs. Anschließend wird gezeigt, dass eine Translokation von UPS aus dem Zytosol hin zu depolarisierten Mitochondrien existiert. Als letztes findet sich ein Abschnitt zur unterschiedlichen Aktivierung von Makroautophagie durch die Behandlung mit Valinomycin bzw. FCCP.

4.1 | DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM IST NOTWENDIG FÜR MITOPHAGIE

Um den jeweiligen systematischen Nachteil zu kompensieren, wurden zwei verschiedene Zellmodelle zur Untersuchung der Rolle des UPS in der Mitophagie verwendet. Neuroblastom-Zellen der Reihe SH-SY5Y stellen zwar ein gutes und etabliertes neuronales Zellmodell dar (La Quaglia und Manchester 1996), haben aber keinen expliziten Bezug zur PD. Primäre, humane, dermale Fibroblasten von familiären Parkinson-Patienten besitzen den Bezug zur Erkrankung, sind aber kein neuronales Gewebe. Einen Überblick über die verschiedenen Kompartimente und untersuchten Proteine des Mitochondrions gibt Abbildung 4.

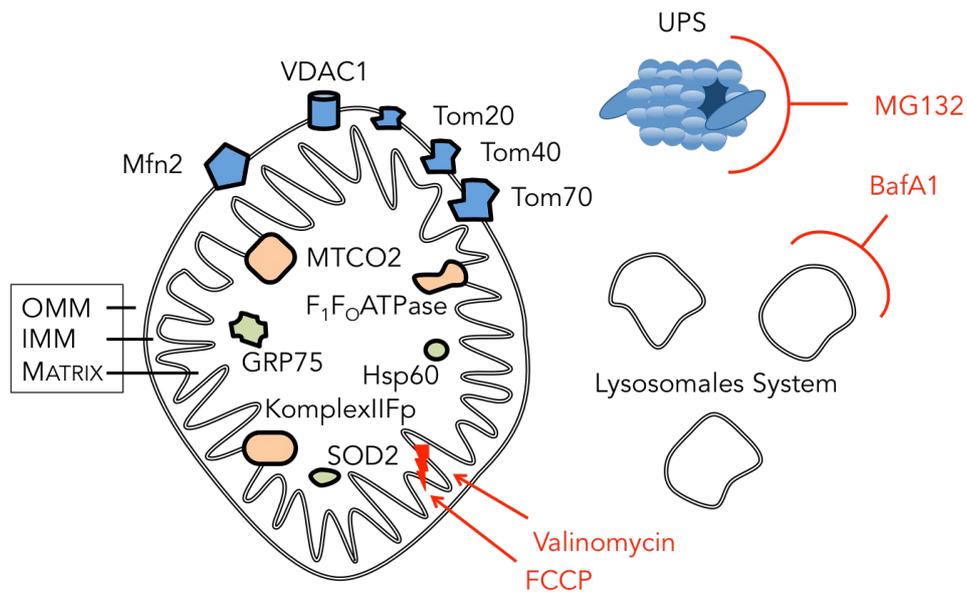


ABBILDUNG 4 | MITOCHONDRIALE PROTEINE, DEGRADIERUNGSWEGE UND INHIBITOREN.

Die Proteine der äußeren Mitochondrienmembran (OMM), spannungsabhängiger Anionenkanal 1 (VDAC1), Mitofusin 2 (Mfn2), Untereinheiten der Translokase der OMM (Tom20/40/70) sind blau eingefärbt. Orange gefärbt sind Proteine der inneren mitochondrialen Membran (IMM), Cytochrom-C-Oxidase (MTCO2) und Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase-Flavoprotein-Untereinheit (KomplexII Fp). Matrixproteine, wie mitochondriales 70 Kilodalton-Hitzeschockprotein 9 (GRP75), Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) und 60 Kilodalton-Hitzeschockprotein (Hsp60) sind grün gefärbt. Die Ionophoren Valinomycin und Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon (FCCP), die den elektrochemischen Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran aufheben (Pfeil) sowie N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal (MG132) als Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und Bafilomycin (BafA1) als Inhibitor des lysosomalen Systems sind rot geschrieben.

Der Prozess der Mitophagie wird im Zellmodell durch die Behandlung mit dem Ionophor Valinomycin induziert. Diese Chemikalie gleicht den elektrochemischen Protonengradienten über der inneren mitochondrialen Membran durch den Transport von Kalium-Ionen aus (Nelson und Cox 2009, S. 534) und inhibiert dadurch die ATP-Synthese. Die Funktion des UPS kann selektiv durch die Blockade seines 20 S-Kernpartikels durch das Peptid N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal (MG132) inhibiert werden (Tsubuki et al. 1996; Fernandez et al. 2006) und dadurch dessen Funktion im Zellmodell untersucht werden. Das lysosomale System (bzw. dessen saure Hydrolasen in den

Lysosomen) kann durch die Blockierung der vakuolären H⁺-ATPase mittels Bafilomycin A1 inhibiert werden (Mauvezin und Neufeld 2015). Da gezeigt werden konnte, dass der Prozess der Mitophagie in Zellen mit normal hoher Parkin-Expression nicht untersucht werden konnte (Geisler et al. 2010; Chan et al. 2011; Rakovic et al. 2013), waren stets künstlich hohe Parkin-Expressionen in allen verwendeten Zellmodellen notwendig.

Zur Untersuchung von Mitophagie wurde das Immunoblot-Verfahren verwendet, das es erlaubt, Proteinmengen aller Kompartimente des Mitochondrions zur selben Zeit zu analysieren und zudem zum verbreiteteren *MitoTracker dye labeling*-Verfahren gleichwertig ist (Rakovic et al. 2013).

Zunächst wurden Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y mit einer stabilen Überexpression für Parkin ausgestattet und mit denselben Zellen mit zusätzlichem PINK1-Knock-out verglichen (Abbildung 5). Diese Zellen sind im Institut für Neurogenetik Lübeck mittels CRISPR/Cas9-Technologie erzeugt und mir dankenswerterweise von Dr. A. Rakovic zur Verfügung gestellt worden.

In den Kontrollzellen (Abbildung 5 A, linke Spalte) ist unter der Behandlung mit Valinomycin eine deutliche Reduktion der Proteine aller Kompartimente des Mitochondrions (OMM, innere Mitochondrienmembran = IMM und Matrix) zu erkennen, was sich auch in den quantitativen Analysen (Abbildung 5 B) erkennen lässt. Die zusätzliche Inhibierung des UPS mittels MG132 konnte in den Kontrollen den Abbau von mitochondrialen Proteinen in allen Kompartimenten verhindern, wobei die größeren und schwereren Proteine der OMM (z. B. Mfn2 und Translokase der OMM Untereinheit 70 kDa (Tom70)) vor allem in ihren ubiquitinierten Formen (Mono-, Di- und Polyubiquitinierung) den Stress überstanden.

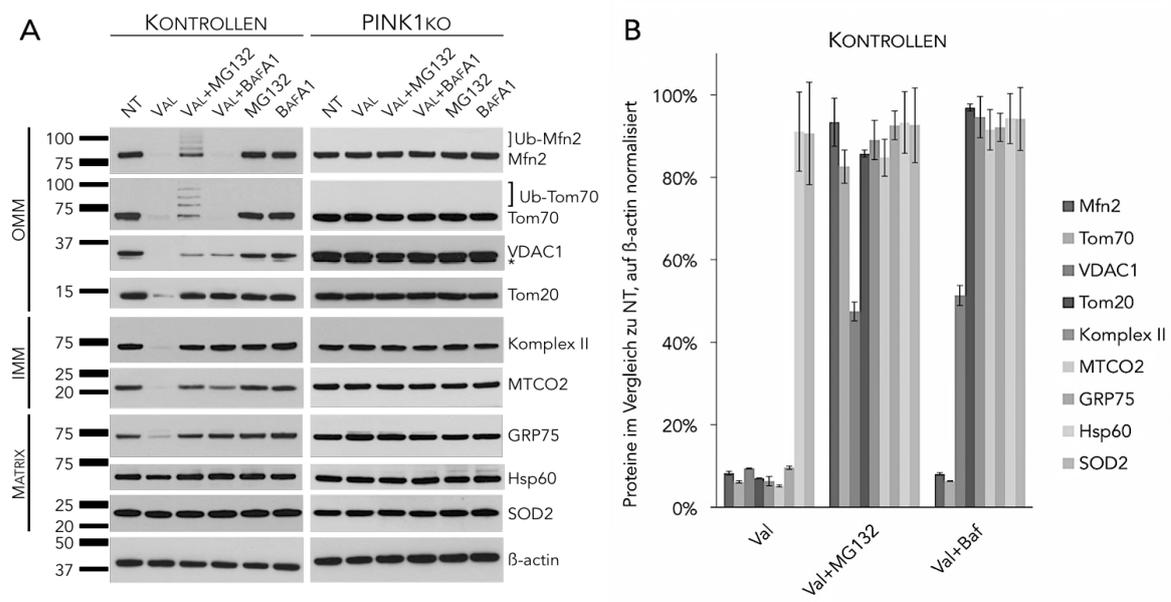


ABBILDUNG 5 | IN NEUROBLASTOM-ZELLEN VERHINDERT DIE INHIBITION DES UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEMS ODER DES LYSOSOMALEN SYSTEMS DEN ABBAU VON DEPOLARISIERTEN MITOCHONDRIEN.

A Kontrollen und PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1)-Knock-out (PINK1ko) Neuroblastom-Zellen mit stabiler Parkin-Überexpression wurden für 16 h mit 1 µM Valinomycin (Val), 10 µM N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyll-Leucinyll-Leucinal (MG132) und 10 nM Bafilomycin A1 behandelt, geerntet und mittels Western Blot und Antikörpern gegen mitochondriale Proteine der verschiedenen Kompartimente analysiert: äußere Mitochondrienmembran (OMM) (Mitofusin 2 = Mfn2, Untereinheiten der Translokase der OMM = Tom20/70, spannungsabhängiger Anionenkanal 1 = VDAC1), innere Mitochondrienmembran (IMM) (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase = Komplex II, Zytocrom-C-Oxidase = MTCO2) und Matrix (mitochondriales 70 Kilodalton-Hitzeschockprotein 9 = GRP75, 60 Kilodalton-Hitzeschockprotein = Hsp60, Superoxid-Dismutase 2 = SOD2). Nicht behandelte Zellen (NT). Gewichtsangabe des jeweils relevanten Biorad Protein-Standards in Kilodalton links. **B** Die Proteinmengen wurden quantifiziert und auf die Mengen von β-actin normalisiert. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. * unspezifische Bande.

Unter Inhibition des UPS durch MG132 ist es also in Kontrollen zu keinem relevanten Abbau von Mitochondrien (Mitophagie) gekommen, was dafür spricht, dass das UPS entscheidend an diesem Prozess beteiligt ist. Um nun den Anteil zu untersuchen, den das lysosomale System an der Mitophagie hat, wurde das lysosomale System mittels Bafilomycin A1 inhibiert. In den Kontroll-Zellen konnten hierdurch die Proteine der Matrix, der IMM und die kleineren Proteine der OMM

konserviert werden. Dies deutet darauf hin, dass das UPS seinen Einfluss auf den Prozess der Mitophagie vor allem über den Angriff an großen bzw. schweren Proteinen auf der Oberfläche von Mitochondrien ausübt.

In den Zellen mit einem PINK1-Knock-out hingegen, ist es wie erwartet unter keiner der verwendeten Behandlungen zu einer Veränderung in den Proteinmengen gekommen (Abbildung 5 A, rechte Spalte), was darauf verweist, dass ohne funktionierendes PINK1 keine relevante Mitophagie stattfinden kann. Alle bisherigen Ergebnisse sind konsistent mit denen von Chan und Yoshii (Chan et al. 2011; Yoshii et al. 2011).

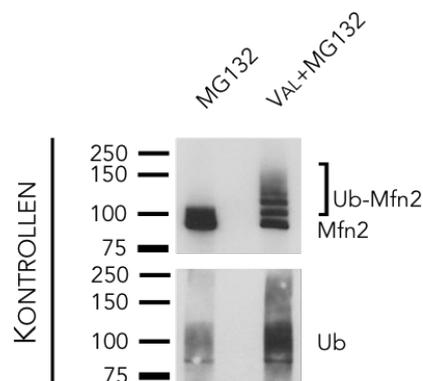


ABBILDUNG 6 | KONSERVIERTE FORMEN VON PROTEINEN DER ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN UNTER INHIBITION DES UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEMS SIND POLYUBIQUITINIERTE FORMEN.

Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y wurden für 6 h mit 1 μ M Valinomycin (Val) und 10 μ M N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal (MG132) behandelt, geerntet, die Mitochondrien extrahiert, Mitofusin 2 (Mfn2) durch Immunpräzipitation extrahiert und durch Western Blot analysiert. Im unteren Blot wurde ein spezifischer Antikörper gegen Ubiquitin (Ub) verwendet. Unter Behandlung mit Val und MG132 ließen sich ubiquitinierte Formen von Mfn2 (Ub-Mfn2) nachweisen. Gewichtsangabe des jeweils relevanten Biorad Protein-Standards in Kilodalton links.

Dass es sich bei den konservierten Formen von Tom70 und Mfn2 in den Kontrollen (Abbildung 5 A, linke Spalte) tatsächlich um ubiquitinierte Formen handelte, konnte durch einen kleinen Exkurs mit der Methode der Immunpräzipitation in Abbildung 6 gezeigt werden: Die Proteinbanden oberhalb

der vermuteten Bande für Mfn2 (86 kDa) reicherten deutlich Ubiquitin an.

In Ergänzung zum Neuroblastom-Zellmodell mit der Notwendigkeit eines künstlichen PINK1-Knock-out, wurden die Versuche in primären humanen dermalen Fibroblasten Patienten mit homozygoter PINK1-Mutation (PINK1mut) und gesunden Kontrollen wiederholt (Abbildung 7).

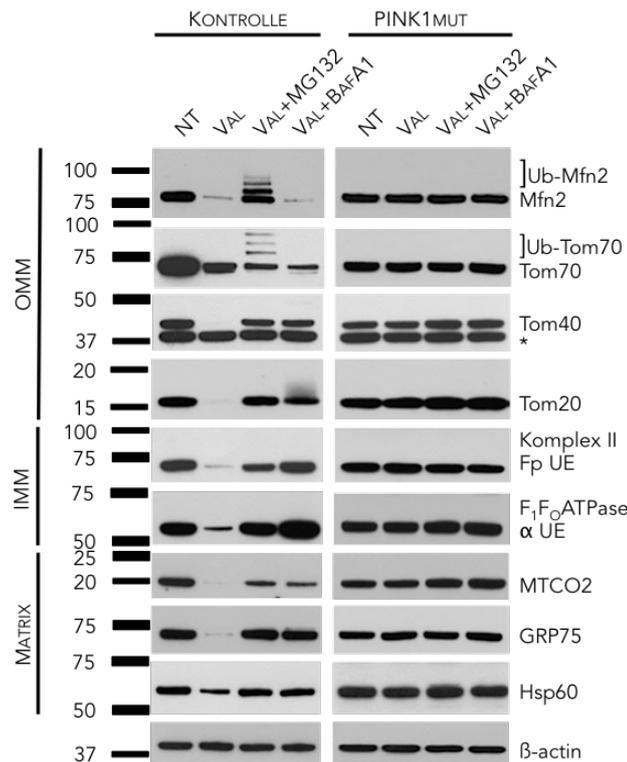


ABBILDUNG 7 | IN FIBROBLASTEN VERHINDERT DIE INHIBIERUNG DES UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEMS

ODER DES LYSOSOMALEN SYSTEMS DEN ABBAU VON DEPOLARISIERTEN MITOCHONDRIEN.

Mit stabiler Parkin-Überexpression ausgestattete Fibroblasten von Kontrollen (linke Spalte) und Patienten mit homozygoter PTEN-induzierte Kinase 1-Mutation (PINK1mut, rechte Spalte) wurden für 16 h mit 1 μ M Valinomycin (Val), 10 μ M N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal (MG132) und 20 nM Bafilomycin A1 (BafA1) behandelt. Mit Antikörpern wurden im Immunoblot Proteine aller mitochondrialer Kompartimente sichtbar gemacht: äußere Mitochondrienmembran (OMM) (Mitofusin 2 = Mfn2, Untereinheiten der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran = Tom20/40/70), innere Mitochondrienmembran (IMM) (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase-Flavoprotein-Untereinheit = Komplex II Fp UE, Zytochrom-C-Oxidase = MTCO2) und Matrix (mitochondriales 70 Kilodalton-Hitzeschockprotein 9 = GRP75, F₁F₀Adenosintriphosphat-Synthase α Untereinheit = F₁F₀ATPase α UE, 60 Kilodalton-Hitzeschockprotein = Hsp60). β -actin diente als Ladekontrolle. * unspezifische Bande. Gewichtsangabe des jeweils relevanten Biorad Protein-Standards in Kilodalton links.

Beide Fibroblasten-Zellreihen (Kontrollen und PINK1mut) sind ebenfalls mit einer stabilen Parkin-Überexpression ausgestattet worden. Um nun zu untersuchen, welche Rolle das UPS bei der Mitophagie spielt, wurden Kontroll-Fibroblasten (Abbildung 7, linke Spalte) nach Behandlung mit Valinomycin alleine, oder in Kombination mit dem UPS-Inhibitor MG132 bzw. dem Lysosom-Inhibitor Bafilomycin A1 analysiert. Hierbei bestätigten sich bei den Kontroll-Fibroblasten die Ergebnisse aus den Versuchen mit Neuroblastom-Zellen (Abbildung 5): Die großen Proteine der OMM, wie Mfn2, werden hauptsächlich über das UPS abgebaut. Die kleineren OMM-Proteine (Tom 40/20) sowie die Proteine der IMM (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase-Flavoprotein-Untereinheit, F_1F_0 -Adenosin-triphosphat-Synthase α Untereinheit, Zytochrom-C-Oxidase) und der Matrix (mitochondriales 70 Kilodalton-Hitzeschockprotein 9 = GRP75, 60 Kilodalton-Hitzeschockprotein = Hsp60) werden sowohl über das UPS als auch über das lysosomale System abgebaut.

In den Zellen mit PINK1-Defizienz (Abbildung 7, rechte Spalte) führte wie erwartet keine der durchgeführten Behandlungen zu einer Änderung in der Proteinkonzentration für die beobachteten Proteine.

Diese Ergebnisse aus den Immunoblot-Experimenten wurden abschließend noch um graphische Untersuchungen an denselben Fibroblasten-Linien (Kontrollen und PINK1mut) durch Immunzytochemie ergänzt (Abbildung 8). Behandelt wurden sie sowohl mit Valinomycin allein, als auch in Kombination mit MG132 und Bafilomycin A1. Die Mitochondrien sind in den nicht behandelten Zellen in Form eines Netzwerkes, das sich über die gesamte Zelle hinweg erstreckt, erkennbar (grün angefärbt). Die Zellkontur ist durch rot markierte Proteine abgrenzbar (z. B. Abbildung 8 C, Kontrollen, Val).

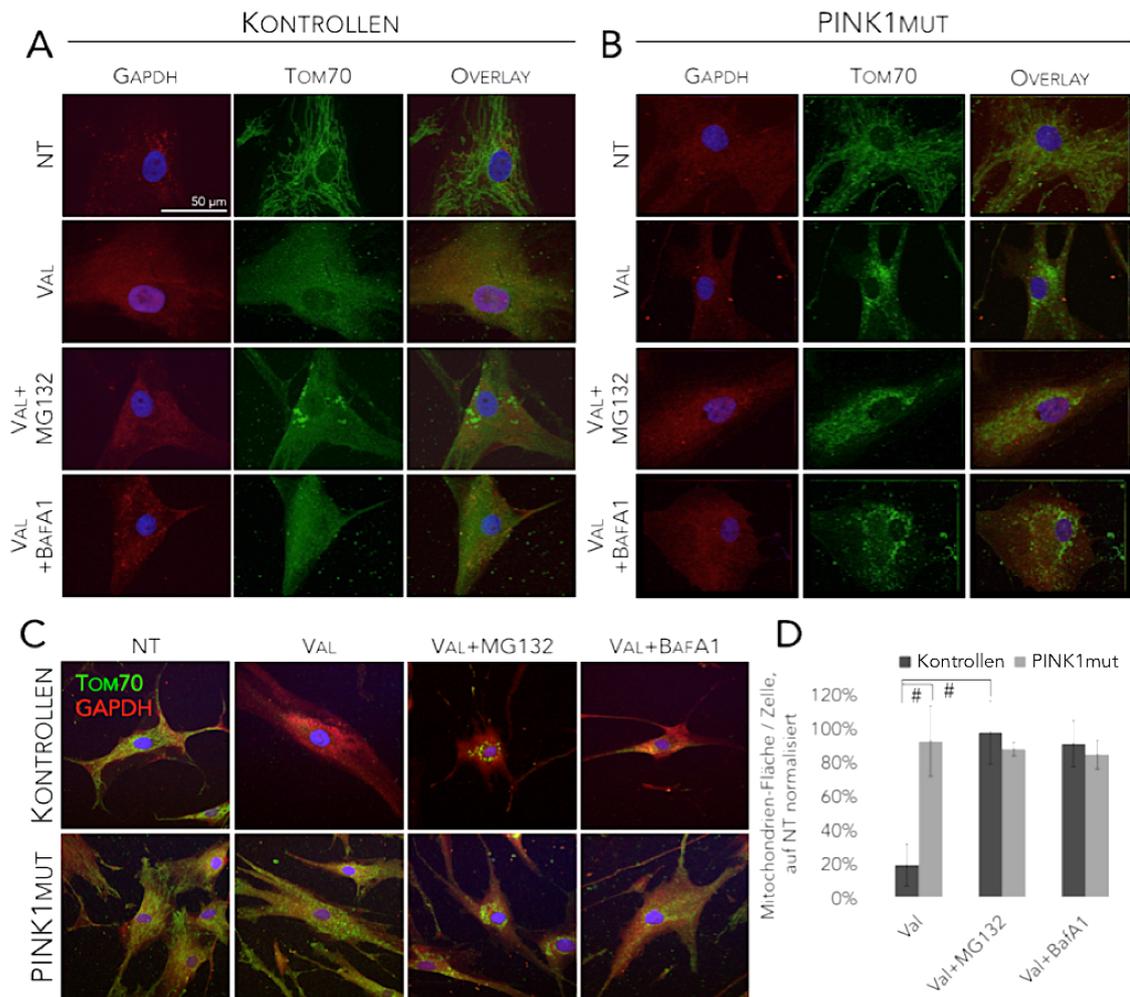


ABBILDUNG 8 | DIE MITOCHONDRIENZAHL BLEIBT DURCH INHIBITION DES UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEMS BZW. DES LYSOSOMALEN SYSTEMS KONSTANT.

Primäre humane dermale Fibroblasten (Kontrollen und mit homozygoter PTEN-induzierte Kinase 1-Mutation = PINK1mut) mit stabiler Parkin-Überexpression wurden für 18 h mit 1 μ M Valinomycin (Val), 10 μ M N-(Benzyloxycarbonyl)-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal (MG132) und 20 nM Bafilomycin A1 (BafA1) behandelt und mit Antikörpern gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder gegen Translokase der äußeren Mitochondrienmembran Untereinheit 70 kDa (Tom70) immunocytochemisch gefärbt. Die Aufnahmen entstanden im konfokalen Lichtmikroskop (**A + B**) und im konfokalen Lasermikroskop (**C**). Sie wurden zur verständlicheren Darstellung teils digital übereinander gelegt (overlay). **D** Die durchschnittliche Mitochondrienfläche pro Zelle (Pixelzahl) in Kontroll-Fibroblasten wurde auf die in nicht behandelten Zellen (NT) normalisiert. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. # $p < 0,01$.

In den Kontroll-Fibroblasten ist ohne Blockierung des UPS oder des lysosomalen Systems unter Behandlung mit Valinomycin ein fast vollständiger

Verlust der Mitochondrien (durch Antikörper gegen Tom70 markiert) erkennbar (Abbildung 8 D, Val). Wenn nun aber unter Valinomycin-Behandlung das UPS mittels MG132 inaktiviert wurde, fanden sich Mitochondrien-Konglomerate rings um den Zellkern. Die Gesamtfläche der Mitochondrien erreichte im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Valinomycin in Kontroll-Zellen wieder Ausgangswerte (Abbildung 8 D, Kontrollen). Dagegen ergab die Blockierung des lysosomalen Systems mittels Bafilomycin A1 eine diffuse und homogene Verteilung von punktförmigen Tom70-positiven Mitochondrien in der Zelle (Abbildung 8 A + C). Auch hier verringerte sich die durchschnittliche mitochondriale Fläche pro Zelle nicht (Abbildung 8 D, Kontrollen). Im Vergleich hierzu fand sich bei den Fibroblasten mit PINK1-Defizienz unter identischem Behandlungs-Regime (Inhibierung des UPS, des Lysosoms und ohne jegliche Blockierung) lediglich eine diffuse Verteilung von Tom70-markierten Mitochondrien im Zytoplasma (Abbildung 8 B + C Kontrollen, Val + BafA1). Die mitochondriale Zellfläche war unter allen Behandlungen konstant (Abbildung 8 D, PINK1 mut).

Zusammengefasst deuten diese Daten an, dass mitochondriale Proteine über zwei verschiedene Wege abgebaut werden können: das UPS und das lysosomale System.

4.2 | DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM REICHERT SICH AN DEPOLARISIERTEN MITOCHONDRIEN AN

Im Immunoblot-Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass sich auf der Oberfläche von depolarisierten Mitochondrien in Abhängigkeit von PINK1 und Parkin ubiquitinierte Formen von großen Proteinen der OMM (wie bspw. Mfn2) finden, wenn zusätzlich das UPS mit bspw. Epoxomicin oder MG132 inhibiert wird (siehe oben). Wird das UPS nicht inhibiert, lässt sich ein Abbau dieser Proteine beobachten, weshalb die Vermutung nahelag, dass das UPS unter mitochondrialer

Depolarisierung an dieser Degradierung beteiligt ist. Hierfür wäre eine räumliche Co-Lokalisierung von Mitochondrion und UPS notwendig. Um dies zu untersuchen, wurden Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y (Kontrollen und mit artifiziellem PINK1-Knock-down, jeweils mit Parkin-Überexpression) mit Valinomycin behandelt, jeweils die Fraktionen der Mitochondrien und des Zytosols mittels Mitochondrien-Extraktion voneinander getrennt und im Immunoblot-Verfahren analysiert (Abbildung 9).

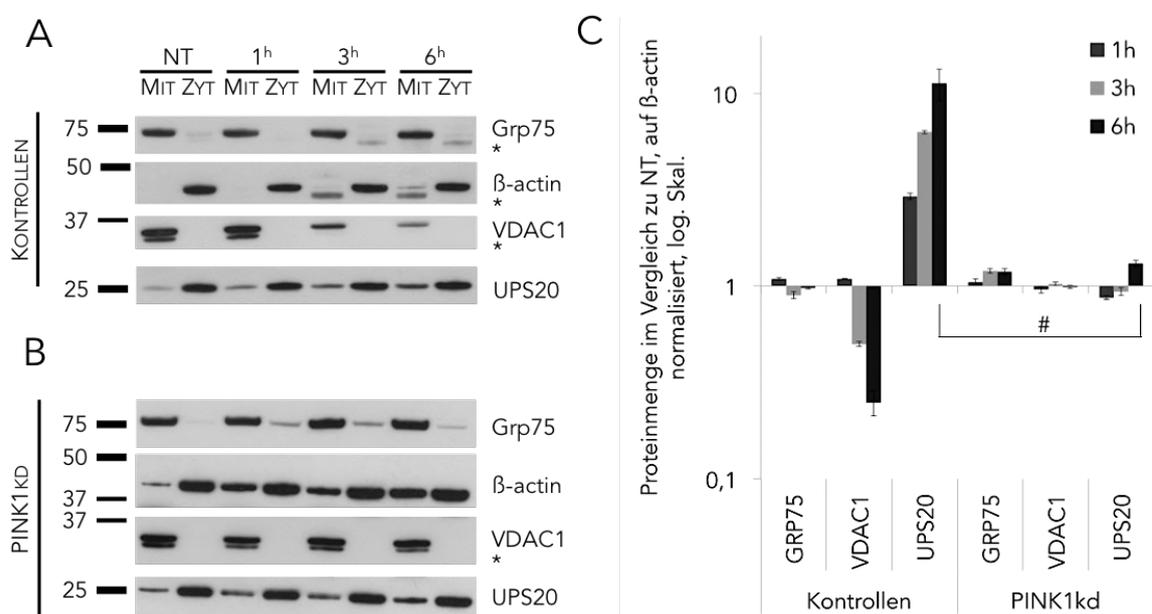


ABBILDUNG 9 | DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM REICHT SICH IN NEUROBLASTOM-ZELLEN ABHÄNGIG VON PTEN-INDUZIERTER KINASE 1 AN DEPOLARISIERTEN MITOCHONDRIEN AN.

Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y mit artifizierlicher Parkin-Überexpression (**A**) wurden mit einem PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1)-Knock-down (PINK1kd) (**B**) versehen, für 6 h mit 1 μ M Valinomycin behandelt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, mittels Mitochondrien-Extraktion in die Mitochondrien- (Mit) und die Zytosol-Fraktion (Zyt) aufgetrennt und das Ubiquitin-Proteasom-System 20 S-Untereinheit (UPS20), der spannungsabhängige Anionenkanal 1 (VDAC1) der äußeren Mitochondrienmembran sowie das mitochondriale 70 Kilodalton-Hitzeschockprotein 9 (GRP75) der Matrix im Immunoblot-Verfahren analysiert. Gewichtsangabe des jeweils relevanten Biorad Protein-Standards in Kilodalton links. **C** Die Proteinmengen der mitochondrialen Fraktionen wurden quantifiziert und auf jene von β -actin und von nicht behandelten Zellen (NT) normalisiert. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. # $p < 0,01$. β -actin diente als Ladekontrolle. * unspezifische Bande.

In den Kontrollen ließ sich ein Abbau des spannungsabhängigen

Anionenkanals 1 (VDAC1) der OMM erkennen (Abbildung 9 A + C Kontrollen), wohingegen das Matrixprotein GRP75 aufgrund der vergleichsweise kurzen Behandlungsdauer mit Valinomycin von 6 h in seinen Mengen stabil blieb. Dass das UPS ein ubiquitärer zytosolischer Proteinkomplex ist (Wojcik und DeMartino 2003), lässt sich gut an den stabilen Proteinmengen in den zytosolischen Fraktionen ablesen. In den mitochondrialen Fraktionen fand sich dagegen eine deutliche Zunahme des UPS (Abbildung 9 C), was eine zunehmende Akkumulation des UPS an depolarisierte Mitochondrien vermuten lässt. Dass dieser Prozess wiederum abhängig von der Funktionsfähigkeit des PINK1/Parkin-Stoffwechselwegs ist, lässt sich daran erkennen, dass in den Zellen mit PINK1-Defizienz der zuvor beobachtete Effekt der Kumulation des UPS an depolarisierten Mitochondrien nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 9 B + C PINK1kd). Die Proteinmengen von VDAC1 und GRP75 in den Zellen mit PINK1-Knock-down blieben wie in den vorhergehenden Experimenten stabil, was die dysfunktionale Degradierung von Mitochondrien in Zellen mit PINK1-Defizienz widerspiegelt. Die leichte Zunahme von β -actin in den mitochondrialen Fraktionen (Abbildung 9 B) ist Zeichen der zunehmenden Quervernetzung von dysfunktionalen Mitochondrien unter Depolarisation (Wang et al. 2015), die nicht in der Lage sind, PINK1-abhängige Mitochondrien-abgeleitete Vesikel zur Kupierung von dysfunktionalen Mitochondrien zu bilden (McLelland et al. 2014).

Zusammengefasst lässt sich beobachten, dass das UPS in Abhängigkeit von der Funktion des PINK1/Parkin-Stoffwechselweges an depolarisierte, dysfunktionale Mitochondrien akkumuliert und Mitochondrien mit beeinträchtigter Funktion Netzwerke zu bilden scheinen, ohne adäquat abgebaut werden zu können.

4.3 | VALINOMYCIN UND CARBONYLCYANID-4-TRIFLUOROMETHOXY-PHENYLHYDRAZON FÜHREN ZU UNTERSCHIEDLICHEN KONVERSIONEN VON MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTES PROTEIN 1A/1B-LEICHTKETTE 3

Der Autophagie-vermittelte Abbau depolarisierter Mitochondrien (Geisler et al. 2010; Vives-Bauza et al. 2010) geschieht über die Markierung von dysfunktionalen Mitochondrien mittels PINK1-Akkumulation und anschließender Ubiquitinierung von OMM-Proteinen. Die konsekutive Kaskade mündet in eine *nucleoporin 62/SQSTM1*-vermittelte Anlagerung (Geisler et al. 2010) von Membranen, auf deren Oberfläche sich die zytosolischen LC3-Proteine in ihrer Autophagie-assoziierten Form LC3-II finden (Tanida et al. 2008). Die Konversion zu LC3-II geschieht durch die Konjugation von Phosphatidylethanolamin an LC3-I (Tanida et al. 2008, S. 3) und kann im Immunblot-Verfahren gemessen werden. Dies stellt eine etablierte Methode zum Nachweis von Makro-Autophagie dar (Mizushima und Yoshimori 2007). Neben oxidativen Stressoren, wie Wasserstoffperoxid, werden in vielen Studien Ionophoren, wie Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und FCCP, die den elektrochemischen Gradienten über der IMM aufheben, für die Depolarisation von Mitochondrien verwendet. FCCP kann leicht durch alle Membranen diffundieren und dann ein Proton abgeben. Das Antibiotikum Valinomycin hingegen transportiert hauptsächlich Kaliumionen und baut so den elektrochemischen Gradienten ab (Nelson und Cox 2009). Um zu untersuchen, ob beide Ionophoren eine ebenbürtige Wirkung auf die Induktion von Mitophagie haben, wurden Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y (Kontrollen gegen Zellen mit PINK1-Knock-down) mit endogener Parkin-Expression und Zellen mit einer stabilen Parkin-Überexpression verglichen (Abbildung 10).

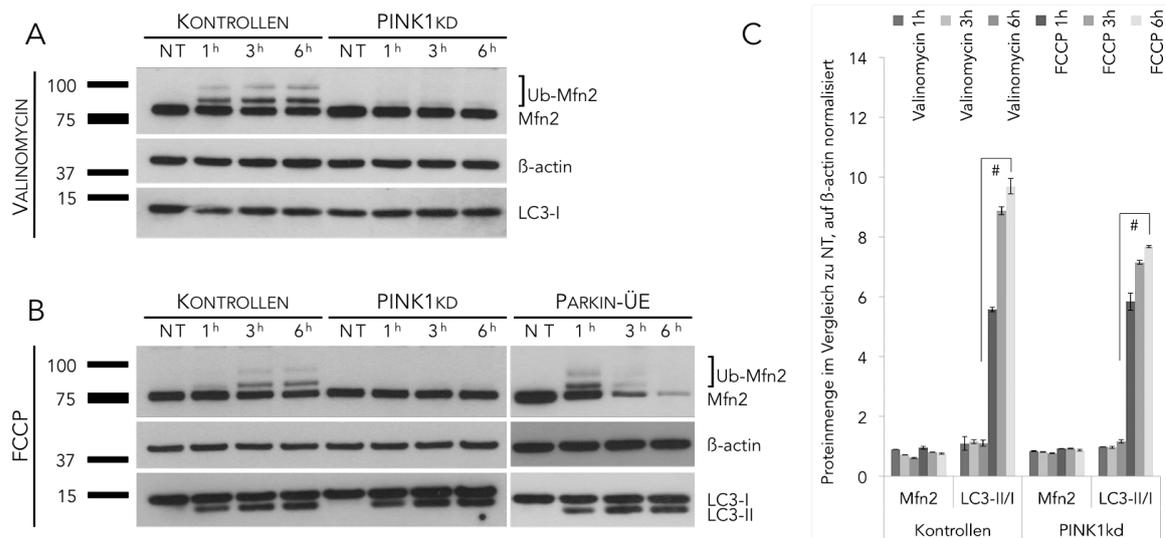


ABBILDUNG 10 | IN NEUROBLASTOM-ZELLEN FÜHRT CARBONYLCYANID-4-TRIFLUOROMETHOXY-PHENYLHYDRAZON ZU EINER STARKEN KONVERSION VON MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTES PROTEIN 1A/1B-LEICHTKETTE 3.

Neuroblastom-Zellen (Kontrollen; mit PTEN-induzierte Kinase 1-Knock-down = PINK1kd; Parkin-Überexpression = Parkin-ÜE) wurden mit 1 μM Valinomycin (**A**) bzw. 10 μM Carbonyl Cyanid-4-(Trifluoromethoxy) Phenylhydrazon (FCCP) (**B**) für 6 h behandelt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und das Protein Mitofusin 2 (Mfn2) der äußeren mitochondrialen Membran sowie die Autophagie-assoziierten Mikrotubulus-assoziierten Proteine 1A/1B Leichtkette 3A (LC3) in ihren verschiedenen Formen mittels Immunoblot analysiert. Neben Mfn2 fanden sich auch seine ubiquitinierte Formen (Ub-Mfn2). Nicht behandelte Zellen (NT). Gewichtsangabe des jeweils relevanten Biorad Protein-Standards in Kilodalton links. **C** Die Proteinmengen wurden jeweils quantifiziert und auf jene von β-actin normalisiert. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. # p < 0,01. β-actin diente als Ladekontrolle.

Wie erwartet, unterschied sich der Abbau von mitochondrialem Protein nur zwischen den Zellen mit einer Parkin-Überexpression und den übrigen Zellen (Abbildung 10 B, rechte Spalte), da der Prozess der Autophagie im Zellmodell nur bei künstlich hohen Parkin-Expressionen beobachtbar ist (Geisler et al. 2010). Dementsprechend blieben die Proteinmengen von Mfn2 in allen anderen Zellen und Behandlungen konstant. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die schnelle Ubiquitinierung (Mono-, Di-, & Poly-) des großen OMM-Proteins Mfn2 vom Status der PINK1-Expression abhängig ist und sich so in Zellen mit PINK1-Knock-

down weder unter FCCP, noch unter Valinomycin eine relevante Menge an konservierten, ubiquitinierten Formen von Mfn2 fand.

In der Beobachtung der Autophagie-indizierenden Konversion von LC3-I zu -II zeigte sich ein erheblicher Unterschied: Während unter Valinomycin (Abbildung 10 A) keine Konversion von LC3 beobachtet werden konnte, war FCCP (Abbildung 10 B) in der Lage, eine rasche und deutliche Konversion von LC3-I hin zur Autophagie-assoziierten Form LC3-II einzuleiten. Bemerkenswert ist, dass diese Konversion selbst in SH-SY5Y-Zellen zu beobachten war, in der laut Chan et al. 2011 (wie in Kap. 4.1 beschrieben) eigentlich keine PINK1-vermittelte Autophagie nachweisbar sein sollte (Abbildung 7 B, linke Spalte). Die Induktion des Mitochondrienabbaus durch FCCP scheint demnach einen eigenen Einfluss auf die Rate der LC3-Konversion zu haben, welcher unabhängig vom Ausmaß des Abbaus von depolarisierten Mitochondrien zu sein scheint.

Um zu untersuchen, ob sich der beobachtete Effekt auch in anderen Zell-Modellen wiederfinden würde, sind Fibroblasten mit stabiler Parkin-Überexpression (Kontrollen und mit homozygoter PINK1-Mutation) entweder mit Valinomycin oder FCCP behandelt worden (Abbildung 11). Wie in SH-SY5Y-Zellen mit Parkin-Überexpression (Abbildung 10 B, rechte Spalte) waren in den Kontrollfibroblasten beide Ionophoren gleichermaßen in der Lage, eine rasche Reduktion des Proteins Mfn2 herbeizuführen (Abbildung 11 A). Dies lässt sich auch gut in der Auswertung der Proteinmengen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (Abbildung 11 C) nachvollziehen. Die Konversion von LC3-I zu LC3-II unterschied sich dagegen erheblich zwischen beiden Ionophoren: Während die Behandlung mit Valinomycin in den Kontroll-Fibroblasten zu einer unvollständigen Konversion von LC3 führte, kam es unter FCCP zu einem vollständigen Verlust von LC3-I und dem ausschließlichen Auftreten von LC3-II (Abbildung 11 A). Der Unterschied lässt

sich in Abbildung 11 C bei Darstellung in logarithmischer Skalierung gut erkennen.

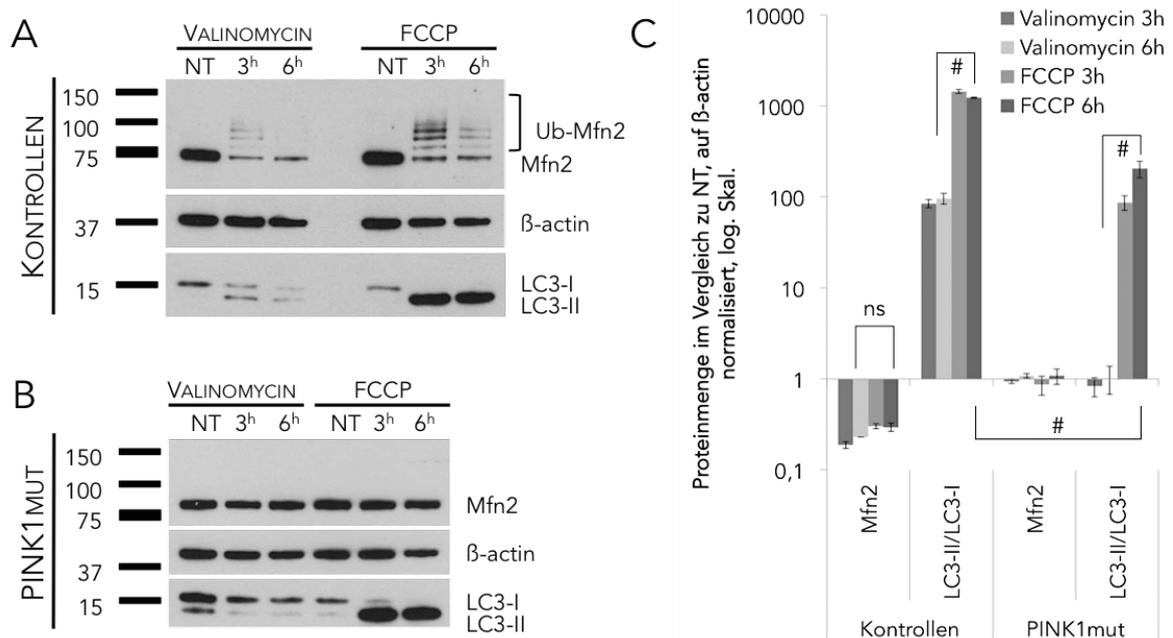


ABBILDUNG 11 | IN FIBROBLASTEN FÜHRT CARBONYLCYANID-4-TRIFLUOROMETHOXY-PHENYLHYDRAZON ZU EINER STARKEN KONVERSION VON MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTE PROTEINE 1A/1B LEICHTKETTE 3A.

Humane dermale Fibroblasten (**A** Kontrollen und **B** mit homozygoter PTEN-induzierte Kinase 1-Mutation = PINK1mut) mit stabiler Parkin-Überexpression wurden für 6 h mit 1 µM Valinomycin oder 10 µM Carbonyl Cyanid-4-(Trifluoromethoxy) Phenylhydrazon (FCCP) behandelt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und das Protein Mitofusin 2 (Mfn2) der äußeren Mitochondrienmembran sowie die Autophagie-assoziierten Mikrotubulus-assoziierten Proteine 1A/1B Leichtkette 3A (LC3) mittels Immunoblot analysiert. Nicht behandelte Zellen (NT). Gewichtsangabe des jeweils relevanten Biorad Protein-Standards in Kilodalton links. **C** Die Proteinmengen wurden jeweils quantifiziert und auf jene von β-actin normalisiert. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Nicht signifikant (ns). # p<0,01. β-actin diente als Ladekontrolle.

In den Fibroblasten mit PINK1-Mutation fand sich weder unter FCCP noch unter Valinomycin eine Reduktion des OMM-Proteins Mfn2, was bisherige Ergebnisse von Chan et al. 2011 bestätigt. Unter FCCP kam es jedoch, im deutlichen Gegensatz zu der jeweils gleich langen Behandlung mit Valinomycin, wiederum zu einem raschen und vollständigen Verschwinden von LC3-I zugunsten von LC3-II (Abbildung 11 B). Zwar war der Umschlag signifikant kleiner als bei den

Kontrollen, aufgrund der PINK1-Defizienz wäre aber gar keine relevante Mitophagie zu erwarten gewesen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass FCCP eine starke Konversion von LC3 auslöst, die unabhängig vom PINK1/Parkin-Signalweg sowie dem tatsächlichen Abbau von depolarisierten Mitochondrien ist.

5 | DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PINK1/Parkin-vermittelte Beseitigung von depolarisierten Mitochondrien unabhängig von LC3-abhängiger Makroautophagie auftreten kann. Dem UPS kommt in diesem Prozess eine essentielle Rolle zu. Die vorliegenden Daten gehen mit bereits veröffentlichten Ergebnissen von Chan et al. und Yoshii et al. 2011 konform, die zeigten, dass sich Parkin an depolarisierte Mitochondrien verlagert und dort Proteine der OMM ubiquitiniert. Diese werden daraufhin über das UPS abgebaut. Die Verlagerung des UPS an depolarisierte Mitochondrien wurde auch in dieser Arbeit nachgewiesen und darüber hinaus gezeigt, dass der Prozess der Akkumulation abhängig von der PINK1-Funktion ist. Größere OMM-Proteine, wie Mfn2 und Tom70, werden ausschließlich über das UPS abgebaut, wohingegen kleinere OMM-Proteine, wie VDAC1, Tom40 und Tom20, sowohl durch das UPS, als auch durch das lysosomale System, abgebaut werden. Diese Beobachtungen können durch ein von Yoshii et al. 2011 vorgeschlagenes Modell erklärt werden, nach dem der Abbau von einigen (größeren) OMM-Proteinen die OMM destabilisiert. Dies führe zur Fragmentierung der OMM (siehe Abbildung 12).

Diese Theorie der platzenden Mitochondrien wird durch die Tatsache gestützt, dass die Ionophor-induzierte mitochondriale Depolarisation mit einer beträchtlichen, mitochondrialen Volumenzunahme einhergeht (Kaasik et al. 2007). Der Druck auf die bereits destabilisierten, mitochondrialen Membranen wird dadurch noch verstärkt, dass diese Volumenzunahme ohne eine Vergrößerung der Membranoberfläche einhergeht. Die so entstandenen OMM-Fragmente mit teils ubiquitinierten OMM-Proteinen werden weiter über das lysosomale System abgebaut (Abbildung 12).

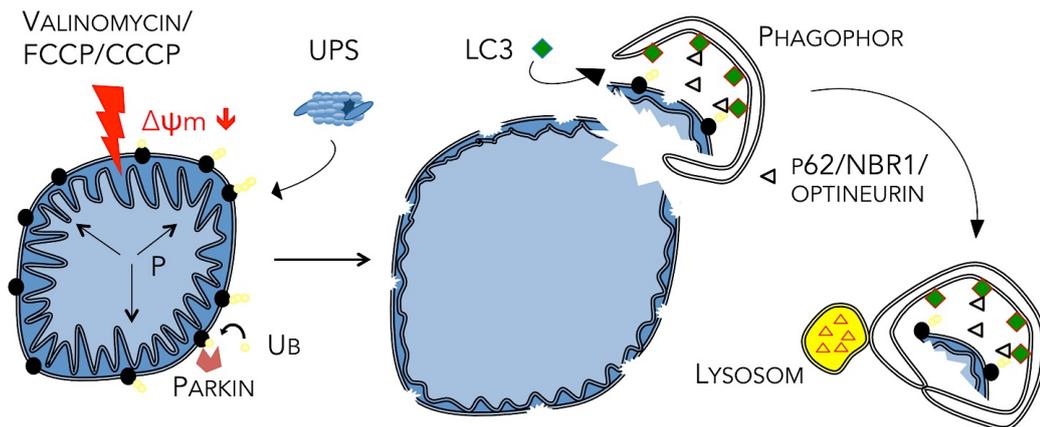


ABBILDUNG 12 | DIE ÄUßERE MITOCHONDRIENMEMBRAN WIRD DURCH MITOCHONDRIALE DEPOLARISIERUNG DESTABILISIERT.

Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon (FCCP), Valinomycin und Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) führen zu mitochondrialer Depolarisation ($\Delta\psi_m$) und Parkin-vermittelten Ubiquitinierungen (Ub). Ubiquitinierte Proteine werden über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut. Der Druck (P) im Inneren des Mitochondrions steigt und führt zur Ruptur. Fragmente werden, vermittelt durch Mikrotubulus-assoziierte Proteine 1A/1B Leichtkette 3A (LC3) und weitere Proteine, wie das des Nachbar-Gens 1 des Brustkrebs-Gens 1 (NBR1), *nucleoporin 62* (p62) und Optineurin, durch Umhüllen mit einer Doppelmembran (Phagophor) und Fusion mit Lysosomen abgebaut.

Obwohl der Abbau von Proteinen der IMM und von Matrix-Proteinen von einem funktionsfähigen UPS abhängt, werden diese Proteine hauptsächlich durch das lysosomale System abgebaut. Unter den mitochondrialen Matrix-Proteinen war es vor allem das Hsp60, dessen Valinomycin-induzierter Abbau sich von allen anderen untersuchten mitochondrialen Proteinen unterschied: Selbst nach 16 h war die Proteinmenge immer noch relativ stark erhalten geblieben (Abbildung 5Abbildung 7). Der Inhalt der Omegasomen in der Makro-Autophagie wird selektiv durch saure, lysosomale Enzyme hydrolysiert (Feng et al. 2014). Dennoch sind die vorliegenden Daten mit einer Studie konsistent, die zeigte, dass auch andere Matrix-Proteine, wie Superoxid-Dismutase 2 und ATP-Synthase-F1- β -Untereinheit, nicht von der mitochondrialen Depolarisation betroffen sind (Chan et al. 2011).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Abbauraten von

mitochondrialen Matrix-Proteinen könnte die Theorie sein, dass nach der OMM-Ruptur (siehe oben) eine zweite Ruptur der IMM zu einer Diffusion von mitochondrialen Matrix-Proteinen ins Zytosol führt. Eine Erklärung dafür, dass diese Proteine im Zytosol nicht wie andere mitochondriale Proteine sofort erkannt und abgebaut werden, könnte sein, dass Hsp60, Superoxid-Dismutase 2 und ATP-Synthase-F1- β -Untereinheit gelegentlich auch außerhalb von Mitochondrien gefunden werden können (Luk et al. 2005; Chandra et al. 2007; Ishii et al. 2012). Dadurch könnten sie besser von den Caspasen und Mikroautophagie-Prozessen des Zytosols toleriert werden als andere Matrix-Proteine und dadurch länger in der Zelle nachweisbar sein (Rakovic et al. 2018).

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus den vorliegenden Daten ist, dass depolarisierte Mitochondrien offenbar ohne eine zwingende Konversion des "Autophagie-Markers" LC3 abgebaut werden können. Die Konversion von LC3 aus ihrer zytosolischen Form LC3-I zu ihrer Autophagie-assoziierten Form LC3-II (Gegg et al. 2010) oder die Co-Lokalisierung von exogen exprimiertem *green/red fluorescent protein*-markiertem LC3 mit Mitochondrien und Parkin (Narendra et al. 2008; Vives-Bauza et al. 2010) dienten bislang als verlässliche Indikatoren von Makro-Autophagie. Allerdings benutzte ein Großteil der bisherigen Studien nur eine Art der Entkoppler der Atmungskette (CCCP oder FCCP), um den Verlust des mitochondrialen Membran-Potentials zu induzieren. Durch den Vergleich der Effekte des gewöhnlich benutzten, Protonen-spezifischen Entkopplers FCCP mit der Wirkung des Kalium-Ionophors Valinomycin konnte gezeigt werden, dass der FCCP-induzierte Abbau von depolarisierten Mitochondrien wie erwartet (Gegg et al. 2010) von einer starken LC3-Konversion begleitet wird. Erstaunlich ist aber die Beobachtung, dass eine vergleichbare Konversion sogar in Zellen mit PINK1-Knock-down nachweisbar war, obwohl diese Zellen nicht zu einer adäquaten Beseitigung von dysfunktionalen Mitochondrien fähig waren. All dies deutet darauf

hin, dass der Entkoppler FCCP selbst (unabhängig von stattfindender oder erfolgreicher Mitophagie) eine starke Aktivierung der Prozesse der Makro-Autophagie bewirkt. Im Hinblick auf mitochondriale Depolarisation, Verlagerung von Parkin an Mitochondrien (Rakovic et al. 2010) und Einleitung der PINK1-abhängigen mitochondrialen Beseitigung (Rakovic et al. 2013), war Valinomycin anderen Ionophoren, wie FCCP, ebenbürtig. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der verwendeten Ionophoren könnte deren Wirkmechanismus sein (Abbildung 13).

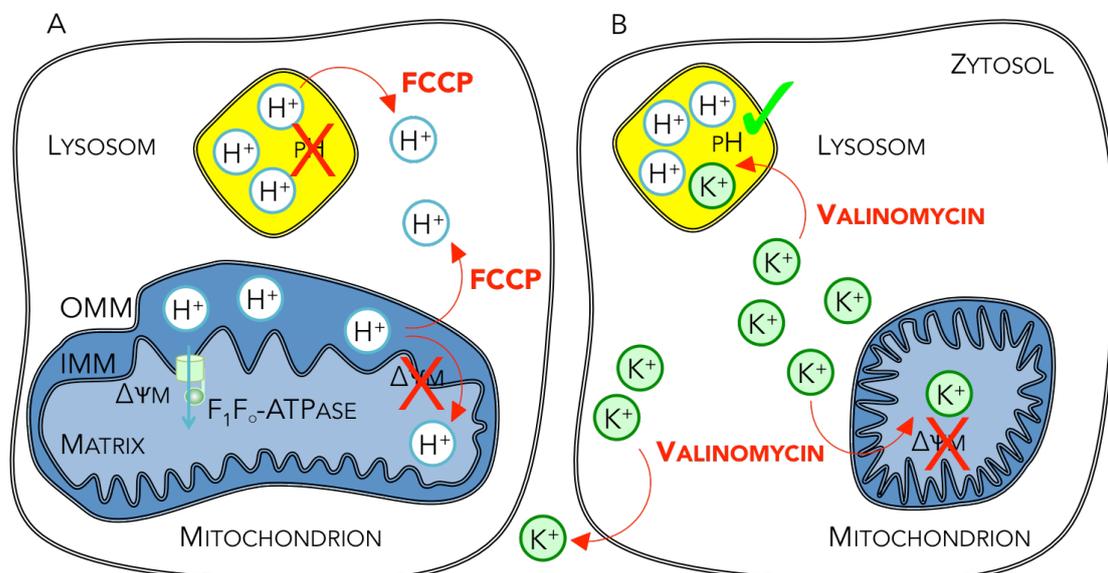


ABBILDUNG 13 | MODELL DER WIRKUNGEN VON CARBONYLCYANID-4-TRIFLUORMETHOXY-PHENYLHYDRAZON UND VALINOMYCIN.

A Carbonylcyanid-4-trifluormethoxy-Phenylhydrazon (FCCP) bewirkt durch Protonentransport (H⁺) die Neutralisierung des sauren Milieus (pH) in Lysosomen und hebt den Protonengradienten (ΔΨ_m) über der inneren Mitochondrienmembran (IMM) auf, der für die Funktion der F₁F₀-Adenosintriphosphat-Synthase (F₁F₀-ATPase) notwendig ist. Äußere Mitochondrienmembran (OMM) **B** Valinomycin bewirkt durch den Kalium-Transport (K⁺) dieselbe Mitochondrien-Depolarisierung. Das saure Milieu der Lysosomen bleibt dagegen erhalten.

Während Valinomycin als Kalium-Transporter den elektrochemischen Gradienten über der IMM als energetische Quelle der ATP-Synthase aufhebt, ist FCCP als Protonen-Transporter zusätzlich in der Lage, das saure Milieu in

lysosomalen Vesikeln zu neutralisieren. Durch seine Transportfunktion hebt FCCP dort den Protonenüberschuss auf, der für die Aktivität der sauren Hydrolasen notwendig ist (Hu et al. 2015).

Zusammengenommen weisen die Daten darauf hin, dass der PINK1/Parkin-vermittelte Abbau von mitochondrialen Proteinen durch einen Mechanismus vollzogen werden kann, der sich von der klassischen Mitophagie unterscheidet. Dieser Mechanismus benötigt jedoch sowohl ein funktionierendes UPS, als auch ein funktionierendes lysosomales System.

AUSBLICK

Seitdem die Daten zu dieser Arbeit aus den Experimenten erhoben wurden, stand die Welt der Forschung nicht still und hat neue Erkenntnisse zutage gebracht. Über die Daten dieser Arbeit hinausgehend, konnte bereits gezeigt werden, dass der Abbau von depolarisierten Mitochondrien nicht beeinträchtigt wird, wenn das Protein LC3 in der Zelle fehlt (Rakovic et al. 2018). Leider ist nach wie vor ungeklärt, wie das genaue Verhältnis von lysosomalem System und dem Proteasom als Teil des UPS im Zusammenspiel der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie ist. Weiterhin ist unklar, wie sich entscheidet, ob mitochondriale Proteine über das UPS abgebaut werden oder das ganze Mitochondrion via lysosomalem System.

Die Daten aus dieser Arbeit sollten durch weitere LC3-Defizienz-Modelle ergänzt werden, in denen der Abbau von defekten Mitochondrien untersucht wird, um zu klären, ob die klassische LC3-vermittelte Makro-Autophagie für die PINK1/Parkin-vermittelte mitochondriale Qualitätskontrolle notwendig ist. Darüber hinaus wäre insbesondere die Untersuchung von weiteren "Toxinen" (wie des hier verwendeten Valinomycin) sinnvoll, das bei unterschiedlichem Wirkmechanismus denselben Effekt wie die klassischen Ionophoren auslöst. Nur so scheint die Klärung der Frage möglich, welche Effekte auf UPS und Lysosom vielleicht nur artifiziell dem verwendeten Ionophor zuzuschreiben sind und welche Effekte dem simulierten zellulären Stress zuzuschreiben sind. Weitere Klarheit könnten Elektronenmikroskopie-Untersuchungen liefern, bei denen einzelne Proteine (wie bspw. LC3 oder das 26 S-Proteasom) markiert werden und deren genaue Lokalisation während der Mitophagie untersucht werden können.

Zumindest hat sich bereits eine Vorstellung davon etabliert, dass beide Systeme, UPS und lysosomales System, untrennbar miteinander zusammen arbeiten und sich gegenseitig regulieren können. Über die integrative

Zusammenarbeit aller anderen eventuell an Mitophagie beteiligten Systeme, wie bspw. der mitochondrialen ungefalteten Protein-Antwort (Al-Furoukh et al. 2015) oder gar eines weiteren Abbauweges, ist zudem bisher wenig bekannt.

Um die Abläufe der Mitophagie besser zu verstehen, werden in Zukunft Interactom-Analysen der beteiligten Proteine zusammen mit *in vitro*-Analysen von Knock-out-Modellen notwendig sein. Dabei wird das Zell-Modell eine bedeutende Rolle spielen, wobei neuronale Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen die Vorteile von Fibroblasten und Neuroblastom-Zellen wohl am besten vereinen dürften.

Das Ziel einer kausalen Therapie scheint indes auch unabhängig von dem genauen Verständnis des entscheidenden molekularen Mechanismus, der bei der PD zur fehlerhaften Mitophagie in dopaminergen Neuronen führt, ein Stück näher zu rücken. Nach ersten erfolgreichen *in vivo*-Versuchen einer Transplantation von dopaminergen Vorläufer-Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen in Primaten (Kikuchi et al. 2017) hat eine japanische Arbeitsgruppe 2018 mit der Rekrutierung von Patienten für eine klinische Studie nach demselben Prinzip begonnen (Takahashi 2019).

ZUSAMMENFASSUNG

Die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin und die mitochondriale PTEN-induzierte putative Kinase 1 (PINK1) sind gemeinsam an der Beseitigung von dysfunktionalen Mitochondrien durch Makro-Autophagie (Mitophagie) beteiligt. In primären humanen Fibroblasten sowie in shRNA- und CRISPR/Cas9-generierten, isogenen Neuroblastom-Zellen wird die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und des lysosomalen Systems bei der Mitophagie analysiert. Hierdurch wird das aktuelle Modell der PINK1/Parkin- und LC3-vermittelten Mitophagie hinterfragt. Mitochondrien wurden hier, im Gegensatz zu früheren Studien, die als mitochondriale Entkoppler v. a. die Protonen-Ionophoren CCCP und FCCP benutzten, mit einem Kalium-Ionophor gestresst: Valinomycin. Das UPS ist alleine für den Abbau von Proteinen der äußeren mitochondrialen Membran essentiell. Allerdings zeigte sich, dass sowohl das UPS, als auch das lysosomale System, für die Beseitigung von depolarisierten Mitochondrien notwendig sind (egal ob durch FCCP oder Valinomycin induziert) und dass das UPS an depolarisierten Mitochondrien PINK1-abhängig akkumuliert. Während allerdings FCCP eine starke LC3-Konversion induzierte, konnte unter der Behandlung mit Valinomycin (trotz effektiven mitochondrialen Abbaus) keine Autophagie-assoziierte Konversion zu LC3-II gefunden werden. Darüberhinaus führte FCCP sogar in Mitophagie-inkompetenten, PINK1-defizienten Zellen zu einer LC3-Konversion. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die PINK1/Parkin-vermittelte mitochondriale Qualitätskontrolle unabhängig von LC3-vermittelter Makro-Autophagie auftreten kann.

SUMMARY

The ubiquitin ligase Parkin and the mitochondrial kinase PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) jointly function in the clearance of damaged mitochondria through macroautophagy (mitophagy). Using primary human Fibroblasts and both shRNA- and CRISPR/Cas9-generated isogenic neuroblastoma cells, the prevailing model of PINK1/Parkin-mediated and LC3-dependent mitophagy is being challenged by revisiting the role of the ubiquitin proteasome system (UPS) and the lysosomal system in mitophagy. In contrast to previous studies employing mainly the proton ionophores CCCP or FCCP as the mitochondrial uncoupler, here, mitochondria have been stressed with a potassium ionophore, valinomycin. Only the UPS proved essential for the degradation of outer mitochondrial membrane proteins, while both the UPS and the lysosomal system are required for the removal of depolarized mitochondria, regardless of whether induced by FCCP or valinomycin. Furthermore, the UPS accumulated in a PINK1-dependent manner on depolarized mitochondria. Whereas FCCP induced a strong conversion of LC3 and despite the effective mitochondrial clearance, no autophagy-related LC3-II was observed upon valinomycin treatment. However, even in mitophagy-incompetent cells due to PINK1 deficiency, FCCP induced a strong conversion of LC3. These data ultimately indicate that the PINK1/Parkin-mediated mitochondrial quality control can occur independently from LC3-dependent macroautophagy.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 | Proteinstruktur von Parkin und PTEN-induzierte putative Kinase 1.....8

Abbildung 2 | Autophagie-Formen.10

Abbildung 3 | Abbau und Akkumulation von PTEN-induzierter Kinase 1.....12

Abbildung 4 | Mitochondriale Proteine, Degradierungswege und Inhibitoren.29

Abbildung 5 | In Neuroblastom-Zellen verhindert die Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems oder des lysosomalen Systems den Abbau von depolarisierten Mitochondrien.31

Abbildung 6 | Konservierte Formen von Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran unter Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind polyubiquitinierte Formen.32

Abbildung 7 | In Fibroblasten verhindert die Inhibierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems oder des lysosomalen Systems den Abbau von depolarisierten Mitochondrien.33

Abbildung 8 | Die Mitochondrienzahl bleibt durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems bzw. des lysosomalen Systems konstant.35

Abbildung 9 | Das Ubiquitin-Proteasom-System reichert sich in Neuroblastom-Zellen abhängig von PTEN-induzierte Kinase 1 an depolarisierten Mitochondrien an.37

Abbildung 10 | In Neuroblastom-Zellen führt Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon zu einer starken Konversion von Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1A/1B-Leichtkette 3. ...40

Abbildung 11 | In Fibroblasten führt Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon zu einer starken Konversion von Mikrotubulus-assoziierte Proteine 1A/1B Leichtkette 3A.42

Abbildung 12 | Die äußere Mitochondrienmembran wird durch mitochondriale Depolarisierung destabilisiert.....45

Abbildung 13 | Modell der Wirkungen von Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxy-Phenylhydrazon und Valinomycin.47

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 | Monogene Ursachen von früh beginnender Parkinson-Erkrankung.4

REFERENZEN

- Abbas MM, Xu Z, Tan LCS (2018): Epidemiology of Parkinson's Disease-East Versus West. *Mov Disord Clin Pract* 5, 14–28
- Al-Furoukh N, Ianni A, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Wanrooij S, Braun T (2015): ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPR_{mt}) in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1853, 2580–2591
- Almeida A, Medina JM (1997): Isolation and characterization of tightly coupled mitochondria from neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res* 764, 167–172
- Auburger G, Klinkenberg M, Drost J, Marcus K, Morales-Gordo B, Kunz WS, Brandt U, Broccoli V, Reichmann H, Gispert S, Jendrach M (2012): Primary Skin Fibroblasts as a Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 46, 20–27
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, et al. (2006): High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38, 515–517
- Bentivoglio AR, Cortelli P, Valente EM, Ialongo T, Ferraris A, Elia A, Montagna P, Albanese A (2001): Phenotypic characterisation of autosomal recessive PARK6-linked parkinsonism in three unrelated Italian families. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 16, 999–1006
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3, 1301–1306
- Billingsley KJ, Bandres-Ciga S, Saez-Atienzar S, Singleton AB (2018): Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 373, 9–20
- Braczynski AK, Schulz JB, Bach J-P (2017): Vaccination strategies in tauopathies and synucleinopathies. *J Neurochem* 143, 467–488
- Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RLJ, Hess S, Chan DC (2011): Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 20, 1726–1737
- Chandra D, Choy G, Tang DG (2007): Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release: EVIDENCE THAT ITS PRO-APOPTOTIC OR PRO-SURVIVAL FUNCTIONS INVOLVE DIFFERENTIAL INTERACTIONS WITH CASPASE-3. *J Biol Chem* 282, 31289–31301
- Chen Y, Dorn GW (2013): PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science* 340, 471–475
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M (2006): *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162–1166

REFERENZEN

- Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, Tea JS, Yu C, Coons M, Kirkpatrick DS, Bingol B, Corn JE (2015): USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat Cell Biol* 17, 160–169
- Dauer W, Przedborski S (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909
- Donaldson I (2015): James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *J R Coll Physicians Edinb* 45, 84–86
- Dorsey ER, Elbaz A, Nichols E, Abd-Allah F, Abdelalim A, Adsuar JC, Ansha MG, Brayne C, Choi J-YJ, Collado-Mateo D, et al. (2018): Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 17, 939–953
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ (2014): The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24, 24–41
- Fernandez Y, Miller TP, Denoyelle C, Esteban JA, Tang W-H, Bengston AL, Soengas MS (2006): Chemical Blockage of the Proteasome Inhibitory Function of Bortezomib: IMPACT ON TUMOR CELL DEATH. *J Biol Chem* 281, 1107–1118
- Forno LS (1996): Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 259–272
- Franz A, Kevei É, Hoppe T (2015): Double-edged alliance: mitochondrial surveillance by the UPS and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 37, 18–27
- Gegg ME, Cooper JM, Chau K-Y, Rojo M, Schapira AHV, Taanman J-W (2010): Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 19, 4861–4870
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010): PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12, 119–131
- Giannoccaro MP, La Morgia C, Rizzo G, Carelli V (2017): Mitochondrial DNA and primary mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: MT DNA AND PD. *Mov Disord* 32, 346–363
- Gibb WR (1988): Accuracy in the clinical diagnosis of parkinsonian syndromes. *Postgrad Med J* 64, 345–351
- Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R, et al. (2008): Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 23, 2129–2170
- Guo X, Macleod GT, Wellington A, Hu F, Panchumarthi S, Schoenfield M, Marin L, Charlton MP, Atwood HL, Zinsmaier KE (2005): The GTPase dMiro Is Required for Axonal Transport of Mitochondria to Drosophila Synapses. *Neuron* 47, 379–393
- Hamacher-Brady A, Brady NR (2016): Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci* 73, 775–795

REFERENZEN

- Hang L, Thundiyil J, Lim K-L (2015): Mitochondrial dysfunction and Parkinson disease: a Parkin-AMPK alliance in neuroprotection: Parkin-AMPK axis in mitochondrial homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 1350, 37–47
- Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C (2009): The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev* 19, 254–265
- Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, et al. (1998a): Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 44, 935–941
- Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, Kitada T, Yoshino H, Elibol B, Brookes AJ, Yamamura Y, Kobayashi T, Wang M, et al. (1998b): Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 754–758
- Heo J-M, Rutter J (2011): Ubiquitin-dependent mitochondrial protein degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 1422–1426
- Hicke L (2001): Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195–201
- Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS (2009): Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem* 284, 14978–14986
- Hu Y-B, Dammer EB, Ren R-J, Wang G (2015): The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4
- HUANG H-M, Martins R, Gandy SAM, Etcheberrigaray R, Ito E, Alkon DL, Blass J, Gibson G (1994): Use of Cultured Fibroblasts in Elucidating the Pathophysiology and Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 747, 225–244
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992): Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, 181–184
- Ishii H, Kunihiro S, Tanaka M, Hatano K, Nishikata T (2012): Cytosolic subunits of ATP synthase are localized to the cortical endoplasmic reticulum-rich domain of the ascidian egg myoplasm. *Dev Growth Differ* 54, 753–766
- Jaspers K: *Der Arzt im technischen Zeitalter: Technik u. Medizin, Arzt u. Patient, Kritik d. Psychotherapie.* (Serie Piper 441), Orig.-Ausg; Piper, München 1986
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985): Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2173–2177

REFERENZEN

- Kaasik A, Safiulina D, Choubey V, Kuum M, Zharkovsky A, Veksler V (2007): Mitochondrial Swelling Impairs the Transport of Organelles in Cerebellar Granule Neurons. *J Biol Chem* 282, 32821–32826
- Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA, Banerjee S, Youle RJ (2014): PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol* 205, 143–153
- Karimi-Moghadam A, Charsouei S, Bell B, Jabalameli MR (2018): Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. *Cell Mol Neurobiol* 38, 1153–1178
- Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo JL, Suttrop N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, et al. (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin*. Reg: Register. 19. Auflage; McGraw-Hill Education, New York, NY 2016
- Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N (2011): Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci* 32, 573–580
- Kazlauskaite A, Kondapalli C, Gourlay R, Campbell DG, Ritorto MS, Hofmann K, Alessi DR, Knebel A, Trost M, Muqit MMK (2014): Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J* 460, 127–139
- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, Mizuma H, Takara S, Takahashi R, Inoue H, et al. (2017): Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548, 592–596
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608
- Kondapalli C, Kazlauskaite A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, Burchell L, Walden H, Macartney TJ, Deak M, et al. (2012): PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2, 120080–120080
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, et al. (2014): Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162–166
- Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K (2006): Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 38, 518–520
- Kumar K, Djarmati-Westenberger A, Grünewald A (2011): Genetics of Parkinson's Disease. *Semin Neurol* 31, 433–440
- La Quaglia MP, Manchester KM (1996): A comparative analysis of neuroblastic and substrate-adherent human neuroblastoma cell lines. *J Pediatr Surg* 31, 315–318

REFERENZEN

- Lang AE, Lozano AM (1998a): Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339, 1044–1053
- Lang AE, Lozano AM (1998b): Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339, 1130–1143
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983): Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979–980
- de Lau LM, Breteler MM (2006): Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5, 525–535
- Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ (2012): Role of PINK1 Binding to the TOM Complex and Alternate Intracellular Membranes in Recruitment and Activation of the E3 Ligase Parkin. *Dev Cell* 22, 320–333
- Leroy E, Anastasopoulos D, Konitsiotis S, Lavedan C, Polymeropoulos MH (1998): Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum Genet* 103, 424–427
- Lücking CB, Abbas N, Dürr A, Bonifati V, Bonnet AM, de Broucker T, De Michele G, Wood NW, Agid Y, Brice A (1998): Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *Lancet Lond Engl* 352, 1355–1356
- Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC (2005): Manganese Activation of Superoxide Dismutase 2 in the Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 22715–22720
- Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Dürr A, et al. (2016): Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force: Nomenclature of Genetic Movement Disorders. *Mov Disord* 31, 436–457
- Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ (2004): Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1, R127-133
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou Y, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, et al. (2010): PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189, 211–221
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, others (1997): Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25. 2-27. *Am J Hum Genet* 60, 588
- Mattle H, Mumenthaler M, Schroth G: Neurologie. 13., vollst. überarb. Aufl; Thieme, Stuttgart 2013

REFERENZEN

- Mauvezin C, Neufeld TP (2015): Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 11, 1437–1438
- McLelland G-L, Soubannier V, Chen CX, McBride HM, Fon EA (2014): Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J* n/a-n/a
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989): Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 1450–1455
- Mizushima N (2007): Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861–2873
- Mizushima N, Yoshimori T (2007): How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545
- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ (2008): Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183, 795–803
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen D-F, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ (2010): PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biol* 8, e1000298
- Nargund AM, Fiorese CJ, Pellegrino MW, Deng P, Haynes CM (2015): Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol Cell* 58, 123–133
- Nelson DL, Cox MM: *Lehninger Biochemie*. (Springer-Lehrbuch), 4. Auflage; Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2009
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985): Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36, 2503–2508
- Oertel W, Schulz JB (2016): Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem* 139, 325–337
- Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou Y, Kimura M, Sato S, Hattori N, Komatsu M, et al. (2010): p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria: Parkin and p62 for mitochondrial clustering. *Genes Cells no-no*
- Okatsu K, Uno M, Koyano F, Go E, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N (2013): A Dimeric PINK1-containing Complex on Depolarized Mitochondria Stimulates Parkin Recruitment. *J Biol Chem* 288, 36372–36384
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T (2007): p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131–24145
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim J-M, Chung J (2006): Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157–1161

REFERENZEN

- Parker WD, Boyson SJ, Parks JK (1989): Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26, 719–723
- Parkinson J: An Essay on the Shaking Palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones, London 1817
- Pickrell AM, Youle RJ (2015): The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron* 85, 257–273
- Pinter B, Diem-Zangerl A, Wenning GK, Scherfler C, Oberaigner W, Seppi K, Poewe W (2015): Mortality in Parkinson's disease: A 38-year follow-up study: Mortality in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 30, 266–269
- Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N, et al. (2007): The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9, 1243–1252
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, et al. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, et al. (2015): MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease: MDS-PD Clinical Diagnostic Criteria. *Mov Disord* 30, 1591–1601
- Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin L-S, Li L (2007): PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 5, e172
- Rabinowitz JD, White E (2010): Autophagy and Metabolism. *Science* 330, 1344–1348
- Rakovic A, Grunewald A, Seibler P, Ramirez A, Kock N, Orolicki S, Lohmann K, Klein C (2010): Effect of endogenous mutant and wild-type PINK1 on Parkin in fibroblasts from Parkinson disease patients. *Hum Mol Genet* 19, 3124–3137
- Rakovic A, Shurkewitsch K, Seibler P, Grunewald A, Zanon A, Hagenah J, Krainc D, Klein C (2013): Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)-induced Putative Kinase 1 (PINK1)-dependent Ubiquitination of Endogenous Parkin Attenuates Mitophagy: STUDY IN HUMAN PRIMARY FIBROBLASTS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED NEURONS. *J Biol Chem* 288, 2223–2237
- Rakovic A, Ziegler J, Mårtensson CU, Prasuhn J, Shurkewitsch K, König P, Paulson HL, Klein C (2018): PINK1-dependent mitophagy is driven by the UPS and can occur independently of LC3 conversion. *Cell Death Differ* [Epub ahead of print](#)
- Roy M, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H (2015): Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 33, 111–118
- Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, Harper JW (2013): Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496, 372–376

REFERENZEN

- Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *The Lancet* 333, 1269
- Schapira AHV, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1990): Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55, 2142–2145
- Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N (2012): PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep* 2
- Shimura H, Hattori N, Kubo S i, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000): Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25, 302–305
- Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF (1997): Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 42, 261–264
- Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V (2013): The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications: The Genetics of PD. *Mov Disord* 28, 14–23
- Soubannier V, McLelland G-L, Zunino R, Braschi E, Rippstein P, Fon EA, McBride HM (2012): A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from Mitochondria to Lysosomes. *Curr Biol* 22, 135–141
- Spatola M, Wider C (2014): Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat Disord* 20 Suppl 1, S35-38
- Takahashi J (2019): Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi. *Regen Med* 14, 93–95
- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen D-F, Karbowski M, Youle RJ (2010): Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 191, 1367–1380
- Tanida I, Ueno T, Kominami E: LC3 and Autophagy; in: *Autophagosome and Phagosome*; hrsg. v. Deretic V; Humana Press, Totowa, NJ 2008, 77–88
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, et al. (2011): Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ Health Perspect* 119, 866–872
- Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S (1996): Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem (Tokyo)* 119, 572–576
- Unoki M, Nakamura Y (2001): Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20, 4457–4465

REFERENZEN

- Valente EM (2004): Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* 304, 1158–1160
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW (2001): Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 68, 895–900
- Valente EM, Brancati F, Caputo V, Graham EA, Davis MB, Ferraris A, Breteler MMB, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, et al. (2002a): PARK6 is a common cause of familial parkinsonism. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 23 Suppl 2, S117-118
- Valente EM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MMB, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, De Michele G, et al. (2002b): PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families. *Ann Neurol* 51, 14–18
- Villegas J, McPhaul M (2005): Establishment and culture of human skin fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol* 28–3
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RLA, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, et al. (2010): PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci* 107, 378–383
- Wang C, Du W, Su QP, Zhu M, Feng P, Li Y, Zhou Y, Mi N, Zhu Y, Jiang D, others (2015): Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation. *Cell Res* 25, 1108–1120
- Wojcik C, DeMartino GN (2003): Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 579–589
- Wong YC, Holzbaur ELF (2014): Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E4439-4448
- Xhima K, Nabbouh F, Hynynen K, Aubert I, Tandon A (2018): Noninvasive delivery of an α -synuclein gene silencing vector with magnetic resonance-guided focused ultrasound: Noninvasive Knockdown of Brain α -Syn. *Mov Disord* 33, 1567–1579
- Xu S, Peng G, Wang Y, Fang S, Karbowski M (2011): The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol Biol Cell* 22, 291–300
- Yamano K, Youle RJ (2013): PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* 9, 1758–1769
- Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N (2011): Parkin Mediates Proteasome-dependent Protein Degradation and Rupture of the Outer Mitochondrial Membrane. *J Biol Chem* 286, 19630–19640
- Youle RJ, van der Bliek AM (2012): Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337, 1062–1065

REFERENZEN

Zwickl P, Ng D, Woo KM, Klenk HP, Goldberg AL (1999): An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem* 274, 26008–26014

DATENBANKEN

<http://www.mdsgene.org> (Tag des Zugriffs: 12.04.2019)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (Tag des Zugriffs: 26.05.2019)

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

VOR- UND ZUNAME Jonathan Sebastian Hugo ZIEGLER
ANSCHRIFT Mierendorffstraße 18
04318 Leipzig
TELEFONNUMMER + 49 177 2689180
EMAIL-ADRESSE jonathan.sebastian.ziegler@gmail.com
GEB.-DATUM/-ORT 04. November 1989 in Wuppertal
KONFESSION römisch-katholisch



AUSBILDUNG

seit 07/2016 Arzt in Weiterbildung, Klinik für Neurologie, Universitätsklinik
Leipzig, Prof. J. Claßen
01-06/2016 Promotionsarbeit am Institut für Neurogenetik Lübeck, Prof. C. Klein
12/2015 Approbation als Arzt (ausgestellt am 14.12.2015)
2008-2015 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
12/2015 Ärztliche Prüfung (Note: 1,8)
2014/15 PJ-Wahlfach: Neurologie (Schön Klinik, Neustadt i. Holst.)
2013 Notarztwagenpraktikum, Anästhesie, UKSH Lübeck
08/2013 Summer School Neurologie, Univ. Göttingen, Prof. Bähr
2012 Erasmus-Semester an Università La Sapienza, Roma, Italien
07/2011 Auslandsfamulatur RS Mitra Setia, Ungaran, Indonesien
06/2008 Abitur/Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,4)

SONSTIGE ABSCHLÜSSE

09/2018 Notarzt-Kurs, Sächsische Landesärztekammer
02/2015 ALS – Training (nach ERC-Guidelines 2010)
11/2012 Grundkurs "Evidenzbasierte Medizin" (Deutsches Netzwerk ebm)
2010 BWL für Medizinstudenten (Th. Elsholz)
2008 CAE - Cambridge Certificate of Advanced English (Englisch-
Sprachzertifikat)
2006 DELF B1 (Französisch-Sprachzertifikat)
2004 C-Examen (Nebenberuflicher Kirchenmusiker, Diözese Würzburg)

INTERESSENSCHWERPUNKTE

MUSIK Klavierausbildung (8 Jahre)/Orgelausbildung (10 Jahre)
Organist in Bad Schwartau/Timmendorferstrand (seit 2009)
MEDIZIN Stud. Hilfskraft, Klinik für Urologie, UKSH Lübeck (2011-2012)
Stud. Hilfskraft, Institut für Neurogenetik, Lübeck (2013)

Lübeck, den 17. Juni 2019


Jonathan S. H. Ziegler

PUBLIKATIONEN

Die vorliegenden Daten wurden in folgender Schrift publiziert:

Rakovic A, Ziegler J, Mårtensson CU, Prasuhn J, Shurkewitsch K, König P, Paulson HL, Klein C
(2018): PINK1-dependent mitophagy is driven by the UPS and can occur independently of LC3
conversion. Cell Death Differ [Epub ahead of print](#)

Die vorliegenden Daten wurden auszugsweise in folgenden Poster-Präsentationen dargestellt:

Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), September 2014, München
J. Ziegler, C. Mårtensson, A. Rakovic, C. Klein: PINK1-/Parkin-mediated mitochondrial quality
control is executed by the UPS rather than by autophagy.

7. Doktorandentag der Universität zu Lübeck, Juni 2013, Universitätskirche St. Petri, Lübeck
K. Shurkewitsch, J. Ziegler, A. Rakovic, C. Klein: Role of the ubiquitin proteasome system and
lysosomal system in PINK1-/Parkin-dependent mitophagy in human primary fibroblasts.
(Preisträger-Poster des Schülerpreises)

DANKSAGUNG

Meinen Eltern und Geschwistern.

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. Christine Klein, die mir diese Arbeit anvertraute und stets mit ihrem Rat zur Seite stand. Herrn Dr. Aleksandar Rakovic danke ich für seine maßlose Geduld und Disziplin, die ich von ihm lernen durfte und ohne die es diese Arbeit nicht gäbe: Von ihm habe ich alles gelernt. Herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik, besonders Britta, Franziska, Franca, Christoph und Katharina. Es war eine tolle Zeit!

Schließlich danke ich Lucie, die sich mein Herz so oft mit meiner Arbeit teilen musste.

Ich, Jonathan Sebastian Hugo Ziegler, geboren am 04.11.1989 in Wuppertal, versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit alleine und ohne Zuhilfenahme von anderen Hilfsmitteln als angegeben, angefertigt habe.

Leipzig, den 17. Juni 2019