

Charakterisierung des mitochondrialen Stressensors Pink1 während der Mitophagie

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Laura Lüdecke

aus

Bonn

Bonn 2023

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Voos
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höhfeld

Tag der Promotion: 05.02.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/Abstract	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Mitochondrien	3
2.2 Mitochondriale Homöostase und Qualitätskontrolle	4
2.3 Mitochondriale Fehlfunktion in Morbus Parkinson	6
2.4 Pink1	9
2.5 Pink1-Import	10
2.6 Pink1 /Parkin-vermittelte Mitophagie	14
2.7 Regulation des Pink1 Proteinlevels in der Zelle	17
2.8 Pink1 und Pgam5	19
3 Zielsetzung der Arbeit	20
4 Material und Methoden	21
4.1 Material	21
4.1.1 Laborgeräte	21
4.1.2 Reagenzien und Kits	21
4.1.3 Verbrauchsmaterialien	22
4.1.4 Chemikalien	22
4.1.5 Lösungen und Puffer	23
4.1.6 Medium und Reagenzien für Zellkultur	26
4.1.6.1 Reagenzien	26
4.1.6.2 Zellkulturmedium	27
4.1.7 Säugerzelllinien	28
4.1.8 Plasmide	28
4.1.9 siRNA	30
4.1.10 Antikörper	30
4.1.10.1 Primärantikörper	30

4.1.10.2 Peroxidase-gekoppelte und Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper	31
4.1.11 Proteinstandards	31
4.1.12 Software	31
4.2 Methoden.....	32
4.2.1 Zellkultur.....	32
4.2.2 Transfektion	32
4.2.3 Pink1 und Pgam5 Knockout durch CRISPR/Cas9	32
4.2.4 Zellbehandlung.....	33
4.2.5 Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	33
4.2.6 Blue Native -Polyacrylamid Gel Elektrophorese (BN-PAGE)	33
4.2.7 Proteinlyse	34
4.2.8 Proteinquantifikation mittels Bradford.....	34
4.2.9 Western Blot und Immundetektion von Proteinen	34
4.2.10 TCA-Fällung von Proteinen	35
4.2.11 Immunzytochemie	35
4.2.12 Isolation von Mitochondrien aus Säugerzellen	36
4.2.13 Zellfraktionierung.....	36
4.2.14 <i>Live Cell</i> Mikroskopie	37
4.2.15 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels TMRE Färbung und Durchflusszytometrie	37
4.2.16 Bestimmung von Sauerstoffradikalen von Zellen mittels MitoSOX Färbung und Durchflusszytometrie	37
4.2.17 <i>In vivo</i> Import von [³⁵ S]-markierten Reporterproteinen	38
4.2.18 Pink1 Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung.....	38
4.2.19 Pink1-Promotoranalyse mittels Luziferase-Assay	39
4.2.20 Massenspektrometrische Analyse des Pink1-Flag Komplexes	39
4.2.21 Auswertung der MS Daten	40
4.2.22 Statistische Analyse	40
5. Ergebnisse	41
5.1 Pink1-Proteinmenge unter zellulären und mitochondrialen Stress.....	41
5.1.1 Pink1-Detektion unter Anwendung von CCCP	41

5.1.2 Visualisierung der Mitophagie nach verschiedenem mitochondrialem Stress.....	42
5.1.3 Pink1-Induktion durch Zellstress.....	45
5.1.4 Pink1-Akkumulierung in Cybrid Zellen	47
5.1.5 Proteinaggregate unabhängige Pink1-Induktion	49
5.2 Abbau von Pink1	51
5.2.1 Regulierung des Pink1-Levels durch mitochondriale Proteasen.....	51
5.2.2 Regulierung des Pink1-Levels durch das Proteasom	52
5.2.3 Regulation der Pink1-Expression.....	56
5.2.4 Zusammenfassung der Auswirkungen verschiedener zellulärer Inhibitoren	60
5.3 Herstellung und Charakterisierung der Pink1 KO-Zelllinie.....	61
5.3.1 Morphologie von Pink1 KO-Zellen	62
5.3.2 Einfluss der Pink1 KO-Mutante auf mitochondriale Funktionen	64
5.3.3 Reduzierter <i>in vivo</i> Proteinimport von [³⁵ S]-markierten Reporterprotein in Pink1 KO Zellen.....	66
5.3.4 Wiederherstellung der Pink1 KO-Mutanten mit exogenem Pink1	67
5.5 Identifikation von PINK1 Interaktoren mittels SILAC Immunpräzipitation ..	72
5.6 Pink1 und Pgam5	82
5.6.1 Gegensätzliche Prozessierung von Pink1 und Pgam5	83
5.6.2 Pink1 und Pgam5 Interaktion.....	84
5.6.3 Einfluss von Pink1 auf Pgam5	87
5.6.4 Charakterisierung der Pgam5-KO Zellen	88
5.6.5 Analyse des Pgam5 KO auf die Pink1-Regulierung.....	90
6. Diskussion.....	95
6.1 Konditionen der Pink1-Akkumulierung bei verschiedenen mitochondrialen Schäden	95
6.2 Etablierung der Mitophagie-Visualisierung über Fusionskonstrukt	97
6.3 Auswirkungen von Proteinstress auf das Pink1-Level.....	98
6.4 Co-Regulation des Pink1-Levels über Degradation und stress-induzierte Expression.....	99
6.4.1 Regulation des Pink1-Levels über die Degradation	99
6.4.2 Regulation des Pink1-Levels über die Expression.....	102
6.5 Pink1 KO-Charakterisierung.....	104

6.6 Pink1-Komplex Interaktionen	107
6.7 Pgam5 und Pink1	110
6.8 Neues Pink1 Regulierungsmodell und Ausblick.....	113
Anhang.....	116
Abkürzungsverzeichnis	117
Abbildungsverzeichnis.....	121
Tabellenverzeichnis.....	123
Erklärung.....	124
Danksagung	125
Literaturverzeichnis	126

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zentralen Frage der Regulation von Pink1, einer Parkinson-assoziierten Kinase, die in gesunden Zellen als mitochondrialer Stresssensor agiert. Als Folge auf eine starke Akkumulation von Pink1 an geschädigten Mitochondrien wird Parkin, eine E3 Ubiquitin Ligase rekrutiert und durch Pink1 aktiviert. Dadurch wird ein Prozess des selektiven, autophagischen Abbaus des geschädigten Organells ausgelöst, der auch Mitophagie genannt wird. Wie die Regulierung von Pink1 selbst stattfindet und welche zellulären Stressbedingungen eine Pink1-Akkumulation auslösen war zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit noch weitgehend unerforscht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des Pink1-Levels nicht strikt mit der Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials einhergeht und der zelluläre Pink1-Umsatz zu einem geringen Teil durch das Proteasom, sowie durch zelluläre Expression reguliert wird. Einerseits führte die Inhibierung der Translation zu einem starken Rückgang der Pink1-Akkumulierung, während andererseits mittels Luziferase-basierender Pink1-Promotoranalyse ein Anstieg der Pink1-Expression während Mitophagie-stimulierenden Bedingungen dargestellt werden konnte. Diese Ergebnisse deuten auf ein neues Modell zur Pink1-Regulation hin, welches auf einer simultanen Co-Regulation durch Degradation und Expression basiert. Um die Rolle von Pink1 genauer zu charakterisieren, wurden Untersuchungen an einer CRISPR/Cas9-generierten Pink1 KO-Zelllinie durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Mitophagie in der Pink1 KO-Zelllinie durch exogenes Pink1 bei einer der definierten Pink1-Stresskonditionen wiederhergestellt werden konnte. Zudem bildet das exogene Pink1 den charakteristischen funktionalen Pink1-Komplex aus. Um zu analysieren, ob weitere Faktoren eine Rolle bei der Regulation von Pink1 spielen, wurden massenspektrometrisch Interaktionspartner von Pink1 unter Standard- und Stressbedingungen identifiziert. Unter diesen konnte die mitochondriale Phosphatase Pgam5 identifiziert werden, die in Abhängigkeit des $\Delta\psi$ mit Pink1

interagiert und maßgeblich an der Expression und damit Regulation von Pink1 beteiligt ist.

1.2 Abstract

The Parkinson's disease associated Pink1 kinase acts as a mitochondrial stress sensor in healthy cells. In this process, Pink1 accumulates at high levels on the outer membrane of damaged mitochondria and recruits and activates Parkin. Thereby, Parkin initiates the process of selective autophagic degradation of the damaged organelle, a process called mitophagy. Nevertheless, the regulation of Pink1 itself has not been definitively explored.

In this thesis, the issue of Pink1 regulation was addressed in more detail by first defining cellular stress conditions that lead to Pink1 accumulation. It was shown that the increase in Pink1 level is not strictly accompanied by depolarization of the mitochondrial membrane potential and that cellular Pink1 turnover is regulated only in small part by the proteasome, but mainly by cellular expression. Here, on the one hand inhibition of translation showed a strong decrease in Pink1 accumulation and on the other hand luciferase-based Pink1 promoter analysis was used to show an increase in Pink1 expression while mitophagy-inducing conditions. In this regard, this work demonstrates a new Pink1 regulatory model based on a simultaneous co-regulation by degradation and expression. Furthermore, a CRISPR/Cas9 generated Pink1 KO cell line was created and characterized. We show that exogenous Pink1 restores mitophagy and forms the functional Pink1 complex in the Pink1 KO cell line only in the presence of one of the stress conditions defined for Pink1 accumulation. Mass spectrometric analysis of Pink1 complex partners revealed several potential interaction partners under standard and stress conditions, including the mitochondrial phosphatase Pgam5. This work also demonstrated that a membrane potential-dependent physical interaction exists between Pink1 and Pgam5. In the course of this dissertation, it was found that Pgam5 influences Pink1 expression and thus its regulation.

2 Einleitung

Die Aufrechterhaltung der Integrität und Funktionalität von Proteinen und somit auch von lebenswichtigen Stoffwechselprozessen ist für die Zelle von höchster Bedeutung. Die Proteinhomöostase besteht aus einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Proteinanabolismus und -katabolismus und wird über das Proteinqualitätskontrollsystem, einem komplexen Zusammenspiel aus molekularen Chaperonen und Proteasen, reguliert (Hartl et al. 2011; Voos 2013). Zellulärer Stress kann das Gleichgewicht der Proteinhomöostase stören und zur Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen und somit zu einem Funktionsverlust dieser Proteine führen (Balchin et al. 2016).

Die durch endosymbiotischen Ursprung entstandenen Mitochondrien besitzen eigene Chaperone und Proteasen, welche die mitochondriale Proteinhomöostase instand halten (Voos 2013). Starker externer oder interner mitochondrialer Stress kann das eigene Kontrollsystem überlasten und zu mitochondrialer Dysfunktion führen. Die sonst für die zelluläre Energieversorgung verantwortlichen Organellen können im geschädigten Zustand im schlimmsten Fall den eigenen Zelltod verursachen (Lopez und Tait 2015). Um diesem entgegenzuwirken, werden Mitochondrien nicht nur auf Proteinebene reguliert, sondern auch auf der Ebene der Organellen selbst, indem geschädigte Mitochondrien über Autophagie abgebaut werden. Die Ursache vieler neurodegenerativer Erkrankungen kann daher in der Fehlfunktion der mitochondrialen Qualitätskontrolle und der damit einhergehenden Induktion von Apoptose liegen (Lin und Beal 2006).

2.1 Mitochondrien

Eine Zelle beinhaltet viele verschiedene Zellorganellen, die dessen Aufrechterhaltung durch die Produktion wichtiger Stoffwechsel-Metabolite sichern. So tragen zum Beispiel Mitochondrien – auch bekannt als die Kraftwerke der Zellen – zu der Produktion der zellulären Energie durch die oxidative Phosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) bei. Der mitochondriale Ursprung geht auf die Endosymbionten-Theorie zurück, bei der wahrscheinlich ein α -Proteobakterium mit der eukaryotischen Vorläuferzelle verschmolz und eine Symbiose einging (Sagan

1967). Als Konsequenz besitzen Mitochondrien eine Doppelmembran, die die Grundlage der Generierung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi$) und somit der Produktion von ATP, darstellt. In eukaryotischen Zellen erfüllen Mitochondrien neben der oxidativen Phosphorylierung von ATP über die Atmungskettenkomplexe eine Vielzahl weiterer essenzieller Funktionen. Beispielsweise agieren Mitochondrien als Calciumspeicher und sind an der β -Oxidation von Fettsäuren, dem Citratzyklus und der Synthese von Steroiden beteiligt. Die Einleitung von Apoptose wird ebenfalls über die Mitochondrien reguliert (Nunnari und Suomalainen 2012). Zusätzlich können Mitochondrien über membran-bedingte Kontaktstellen mit dem endoplasmatischen Retikulum interagieren (Vance 1990; van Vliet und Agostinis 2017). Evolutionär bedingt haben Mitochondrien über die Jahre einen Großteil ihrer genetischen Information entweder verloren oder in den Nukleus übertragen. Das mitochondriale Genom kodiert im Menschen lediglich 13 Proteine, welche ausschließlich Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe bilden. Die menschliche mitochondriale DNA (mtDNA) ist eine ca. 16 kb lange, zirkuläre DNA, die im Genauerem für 13 mRNAs, 22 tRNAs und 2 rRNAs kodiert (Anderson et al. 1981). Der Großteil aller mitochondrialen Proteine wird demnach vom Nukleus kodiert (ca. 1500 Proteine), welche anschließend im Zytosol synthetisiert und in die Mitochondrien importieren müssen (Lopez et al. 2000).

2.2 Mitochondriale Homöostase und Qualitätskontrolle

Die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionalität und Integrität von Proteinen, die sogenannte Protein-Homöostase, ist eine der zentralen Aufgaben einer Zelle. Sie besteht aus einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, Faltung sowie dessen Degradation (Voos et al. 2016). Für eine funktionale Instanzhaltung der Proteinhomöostase besitzt die Zelle verschiedene Kontrollmechanismen, auch bekannt als Proteinqualitätskontrollsystem. Dieses System besteht aus molekularen Chaperonen und Proteasen, welche sowohl unter Normal-, als auch unter Stressbedingungen an der Proteinqualitätskontrolle (PQK) der Zelle und deren Mitochondrien beteiligt sind (Abbildung 1). Die mitochondriale

PQK besteht aus Chaperonen wie den Hitzeschockproteinen (Hsp) Hsp60, dem mitochondrialen Hsp70 Mortalin, dem mitochondrialen Hsp90 Trap1 und dem mitochondrialen Hsp100 ClpB, welche den Proteinimport und Faltung nuklear kodierter Proteine unterstützen. Zusätzlich arbeiten diese Chaperone zusammen mit löslichen und membrangebundenen spezialisierten Proteasen, um die Akkumulation fehlgefalteter oder überschüssiger Proteine durch Neufaltung oder Abbau zu regulieren (Voos 2013). Langanhaltender Stress, welcher die mitochondriale PQK überlastet, kann zur Denaturierung oder sogar Aggregation von Polypeptiden führen, die ein schwerwiegendes toxisches Risiko für Mitochondrien und somit auch für die Zelle darstellen (Rüb et al. 2017; Voos et al. 2016). Neben dem Verlust ihrer metabolischen Funktion können geschädigte Mitochondrien einen negativen Einfluss auf die Zelle nehmen, indem das Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung, nämlich die Reaktiven Sauerstoffradikale (engl.: *reactive oxygen species*, ROS), im Übermaß freigesetzt werden (Guo et al. 2013). Noch fataler für die Zelle ist die Ausschüttung von mitochondrialem Cytochrom c, ein Prozess, der zur Einleitung der Apoptose dient. Darum benötigen Zellen weitere Mechanismen, die die mitochondriale Qualitätskontrolle sichern. Einer davon beinhaltet die Beseitigung geschädigter Mitochondrien im Ganzen oder in Teilen mittels Beteiligung der Autophagie-Maschinerie. Dieser Prozess, auch Mitophagie genannt, wird hauptsächlich über den mitochondrialen Stresssensor Pink1 reguliert (Ding und Yin 2012). Wie dieser den mitochondrialen Schaden signalisiert und durch welchen Stress Pink1 aktiviert wird, wird unter anderem in der hier vorgelegten Arbeit adressiert.

Mitochondriale Qualitätskontrolle

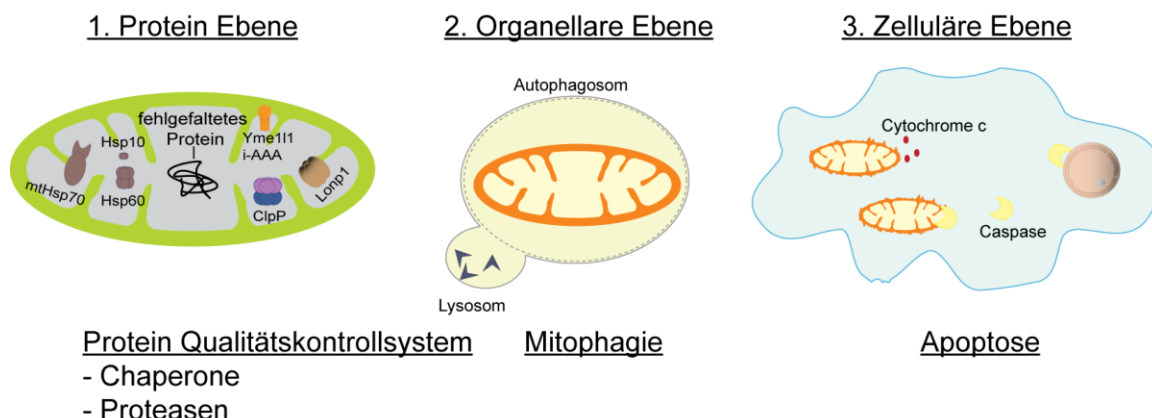


Abbildung 1: Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle.

Mitochondriale Qualitätskontrolle wird auf drei Ebenen reguliert. Zum einen auf der Proteinebene durch Chaperone und Proteasen, auf organellarer Ebene durch die Induktion von Mitophagie und zuletzt auf zellulärer Ebene, welche den Prozess der Apoptose einleitet. Letztes wird über die Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c induziert.

2.3 Mitochondriale Fehlfunktion in Morbus Parkinson

Mitochondrien spielen eine fundamentale Rolle in allen Zellen, wenngleich Zellen mit einem hohen Energiebedarf besonders betroffen von mitochondrialer Fehlfunktion sind. Dazu zählen beispielsweise Muskelzellen und neuronale Zellen, in denen der Ausfall der mitochondrialen Integrität zu schwerwiegenden Erkrankungen führen kann. Im letzteren Zelltyp können dadurch neurodegenerativen Erkrankungen ausgelöst werden. In der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen ist Morbus Parkinson (engl.: Parkinsons Disease, PD) neben Morbus Alzheimer, Chorea Huntington und amyotrophe Lateralsklerose (ALS) eine der am häufigsten diagnostizierten Krankheit (Lin und Beal 2006). Mit einer Prävalenz von 1% der Altersgruppe der über 60-Jährigen gehört Morbus Parkinson, nach Morbus Alzheimer, zu der zweithäufigsten neurodegenerativen Erkrankung weltweit (Lau und Breteler 2006). PD zeichnet sich klinisch dadurch aus, dass Patienten oftmals an den typischen Symptomen wie Rigor, Tremor, Akinesie und Haltungsinstabilität leiden, welche durch den progressiven Verlust der dopaminergen Neuronen in der *par compacta* der *substantia nigra* hervorgerufen werden (Kalia und Lang 2015). Bislang können weder die sporadische noch die genetische PD ursächlich geheilt werden. Über

diverse Behandlungsmöglichkeiten, wie die medikamentöse Behandlung mit L-Dopa, einer Vorstufe des Dopamins, können lediglich die Symptome vermindert werden, ohne jedoch den Krankheitsverlauf aufzuhalten (Armstrong und Okun 2020).

Die Entdeckung des Zusammenhangs zwischen mitochondrialer Fehlfunktion und PD wurde in den letzten Jahrzehnten weiter gefestigt. Dass erstmals PD in Verbindung mit Mitochondrien gebracht wurde, reicht zurück bis in die 1970er Jahre, als versehentlich MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) als Nebenprodukt der illegalen Droge MPPP (1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidin) als Ursache für PD festgestellt wurde (Langston et al. 1983). Später wurde belegt, dass MPTP selektiv von den dopaminergen Neuronen aufgenommen wird und in deren Mitochondrien zu MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium) oxidiert wird. Dort führt MPP⁺ zur Inhibierung des Komplex I der Atmungskette, sodass die oxidative Phosphorylierung gehemmt wird. Ein Komplex I-Mangel wurde zudem im Gewebe von sporadisch PD erkrankten Patienten nachgewiesen (Nicklas et al. 1985). Auch diverse Pestizide können einen negativen Einfluss auf den mitochondrialen Komplex I haben. So konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass Pestizide wie Rotenon und Paraquat zu einer Parkinsonerkrankung führen (Berry et al. 2010; Narayan et al. 2017). Des Weiteren konnten in *post-mortem* Gehirn-Analysen von PD-Patienten eine beträchtliche Menge an somatischen mtDNA Mutationen gefunden werden (Bender et al. 2006), was wiederum die Rolle von Mitochondrien an der Ätiologie von PD bekräftigte.

PD kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: zum einen in die sporadische (idiopathische) PD, d.h. die genaue Ursache ist unbekannt und zum anderen in die über genetische Faktoren resultierende familiäre PD. Hierbei macht die sporadische PD mit bis zu 90% aller Fälle die Mehrheit aus (Kouli et al. 2018). Bislang sind 23 Gene bekannt, welche an dem Ausbruch und Fortschritt einer PD involviert sind oder als Risikofaktoren identifiziert wurden (Kouli et al. 2018; Klein und Westenberger 2012). Die in Tabelle 1 gelisteten Gen-Loci werden auch als *PARK*-Gene bezeichnet und sind chronologisch nach ihrer Identifikation aufgeführt. So sind sechs Gene mit einer monogenetischen Form von PD assoziiert, fünf davon sind der Gruppe der mitochondrialen Gene zugeordnet.

Letztere Gruppe unterstützt somit den Zusammenhang zwischen PD und einer mitochondrialen Dysfunktion resultierend aus Mutationen in den jeweiligen mitochondrialen *PARK*-Genen.

Tabelle 1: Übersicht der *PARK*-Gene die eine zugewiesene Assoziation mit der Parkinson-Erkrankung haben*

Park	Vererbung	Genname	Beschreibung	Uniprot ID
PARK1/PARK4	AD	SCNA	Alpha-synuclein	P37840
PARK2	AR	PARKN	Parkin E3 Ubiquitin-Protein Ligase	O60260
PARK3	AD	unbekannt	unbekannt	
PARK5	AD	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal Hydrolase Isozym L1 (UCH-L1)	P09936
PARK6	AR	PINK1	Serin/Threonin-Proteinkinase Pink1	Q9BXM7
PARK7	AR	DJ-1	Proteindeglycase DJ-1	Q99497
PARK8	AD	LRRK2	Leucinreicher-Repeat-Serin/Threoninkinase 2	Q5S007
PARK9	AR	ATP13A2	Kationentransport ATPase 13A2	Q9NQ1
PARK11	AD	<i>GIGYF2</i>	GRB10 interagierendes GYF Protein 2	Q6Y7W6
PARK13	AD	<i>HTRA2/OMI</i>	Serin Protease Htra2, mitochondrial	O43464
PARK14	AR	<i>PLA2G6</i>	85 kDa calciumunabhängige Phospholipase A2	O60733
PARK15	AR	<i>FBX07</i>	F-Box-Protein 7	Q9Y3I1
PARK17	AD	<i>VPS35</i>	vakuoläre Proteinsortierungs-Ortholog 35	Q96QK1
PARK18	AD	<i>EIF4G1</i>	eukaryotische Translationsinitiationsfaktor gamma 1	Q04637
PARK19	AR	<i>DNAJC6</i>	HSP40 Auxilin	O75061
PARK20	AR	<i>SYNJ1</i>	Synaptojanin 1	O43426
PARK21	AD	<i>DNAJC13</i>	DnaJ-Homolog, Unterfamilie C, Mitglied 13	O75165
PARK23	AR	<i>VPS13C</i>	vakuläres proteinsortierung-assoziertes Protein 13C	Q709C8

* Modifiziert nach (Klein und Westenberger 2012; Kouli et al. 2018). *PARK3*, *PARK10*, *PARK12*, *PARK16*, und *PARK22* sind als Risikofaktoren bekannt oder dessen Gene wurden bislang noch nicht identifiziert, sodass diese nicht in der hier dargestellten Tabelle inbegriffen sind. AR = autosomal rezessiv; AD = autosomal dominant

Durch die Aufklärung der monogenetischen PD und die daraus resultierenden zellulären Dysfunktionen könnten demnach wichtige Schlüsse auf das gesamte Parkinson-Spektrum gezogen werden.

2.4 Pink1

Im Jahr 2001 fand eine Forschungsgruppe auf der Suche nach Mediatoren des PTEN-Signalweges einen möglichen Interaktor und identifizierten das bislang noch unbekanntes Gen, das *PTEN-induced putative kinase 1* (Pink1) genannt wurde (Unoki und Nakamura 2001). Später wurde jedoch gezeigt, dass Pink1 nicht an der Signalweg-Transduktion des PTEN-Signalweges beteiligt ist. Pink1 ist ein nuklear kodiertes Protein, welches über eine eigene Kinase-Domäne Substratproteine phosphoryliert. Das 63 KDa schwere Protein wird in allen Zellen exprimiert, jedoch zeigen Zellen, die einen hohen Energiebedarf benötigen wie Muskel-, Herz- oder Hodenzellen, eine erhöhte Expression (Unoki und Nakamura 2001). Genomisch liegt Pink1 in Eukaryoten konserviert vor, fehlt jedoch dem klassischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*.

Als erste Forschungsgruppe beschrieb Valente et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen Pink1 und PD (Gispert et al. 2009; Valente et al. 2001), nachdem bei der genomischen Sequenzierung einer betroffenen sizilianischen Familie das Pink1-Gen (*PARK6* Gen) identifiziert wurde. Mutationen in *PARK6* führen zudem zu einer juvenilen Form der PD, bei der in jungen Jahren (zwischen 30 und 50 Jahren) erste Symptome auftreten, wodurch meistens erst PD diagnostiziert wird (Valente et al. 2004). Mutationen von dem auf dem Chromosom 1 kodierte Pink1 präsentieren im Menschen die klassischen PD Symptome, vergleichbar mit einer sporadischen PD. Pink1-defiziente Mäuse zeigten zudem pathologische Veränderungen der Mitochondrien und entwickelten im Alter PD-ähnliche Symptome, wodurch zusätzlich Mitochondrien in den Fokus für Parkinson und andere neurodegenerative Erkrankungen gerückt wurden (Valente et al. 2004). Später konnte festgestellt werden, dass die meisten PD-assoziierten Mutationen im Pink1-Gen in dessen Kinase-Domäne vorliegen (Cardona et al. 2011). Pink1 ist ohne funktionale Kinase unfähig, mit dem zytosolischen Protein Parkin zu interagieren, welches ebenfalls zu den *PARK*-Genen gehört (Narendra et al. 2010).

2.5 Pink1-Import

Frühere Forschungsergebnisse deuteten darauf hin, dass Pink1 ein mitochondriales Protein ist, allerdings war die genaue suborganellare Lokalisation unklar. Gewöhnlich müssen nuklear kodierte mitochondriale Proteine über den klassischen Importweg in die Mitochondrien verlagert werden, d.h. dass diese Proteine zytosolisch synthetisiert und anschließend als Präprotein in die Mitochondrien importiert werden. Proteine, die über den klassischen mitochondrialen Importweg in die Mitochondrien importieren, besitzen eine N-terminale mitochondriale Präsequenz (engl.: *mitochondrial targeting sequence*, MTS) (Becker et al. 2012b). Diese Präsequenz wird von mitochondrialen Außenmembranrezeptoren, wie Tom70 (engl.: *Translocase of the Outer Membrane 70*) und Tom20 (engl.: *Translocase of the Outer Membrane 20*) erkannt, die in das Zytosol gerichtet sind. Da Mitochondrien durch eine Doppelmembran umschlossene Zellorganellen sind, müssen mitochondriale Präproteine über die mitochondriale Außenmembran (engl.: *outer mitochondrial membrane*, OMM) und die mitochondriale Innenmembran (engl.: *inner mitochondrial membrane*, IMM) transportiert werden. Dieser Import verläuft über den Tom- und Tim23 (engl.: *Translocase of the inner membrane 23*) -Komplex. Der Import durch Tim23 ist an ein intaktes mitochondriales $\Delta\psi$ gekoppelt, das ein von der Atmungskette hergestellter elektrochemischer Protonengradient ist (Lohret et al. 1997). Dieser elektrochemische Protonengradient führt dazu, dass mitochondriale Präproteine über ihre positiv-geladene MTS durch den Tim-Kanal gezogen werden können (Geissler et al. 2000). Der vollständige Proteinimport in die mitochondriale Matrix ist außerdem abhängig von der in der Matrix lokalisierten ATP-Hydrolyse des Motorkomplexes PAM (engl.: *presequence translocase-associated motor*), der sich aus dem Chaperon Hsp70, Tim44, Pam16, Pam18 und Mge1 zusammensetzt und die Translokation und Faltung des Präproteins vervollständigt. Anschließend kann die MTS von der Protease MPP (engl.: *Matrix processing peptidase*) abgespalten werden. Durch diese Prozessierung entsteht das reife Protein (m-Protein), welches dann in der Matrix verbleibt. Neben dem klassischen Proteintransport in die Matrix gibt es noch weitere Import-Wege, welche die Präproteine zu anderen spezifischen mitochondrialen Subkompartimenten führen

(Becker et al. 2012b). Das N-terminale Segment von Pink1 ähnelt dem einer klassischen mitochondrialen Präsequenz, welche den mitochondrialen Import von Pink1 vermittelt (Silvestri et al. 2005). Zudem wurde ein Prozessierungsfragment der 63 kDa Pink1-Form (Pink1_{FL} = engl.: *full length*) von 55 kDa identifiziert (Pink1_P = engl.: *processed*) (Deas et al. 2011). Zunächst wurde der klassische matrixlokalisierte Proteinimport als Importweg für Pink1 beschrieben, jedoch kam es zu kontroversen Studien über den genauen mitochondrialen Bestimmungsort von Pink1, sodass zunächst kein eindeutiger Importweg für Pink1 dargestellt werden konnte. Zum Beispiel wurde Pink1 im Intermembranraum (engl.: *mitochondrial intermembrane space, IMS*) detektiert (Meissner et al. 2011) während eine weitere Forschungsgruppe Pink1 wiederum in der IMM lokalisierte (Silvestri et al. 2005). In weiteren Studien konnte hingegen gezeigt werden, dass beide Pink1-Fragmente, die 63 kDa und die 55 kDa Form, hauptsächlich an der Außenmembran, mit der Kinase-Domäne dem Zytosol zugewandt, lokalisiert sind (Becker et al. 2012a). Zudem konnten Anteile der prozessierten Pink1_P-Form teilweise im Zytosol nachgewiesen werden (Lin und Kang 2008). Des Weiteren wurde dem $\Delta\psi$ eine Rolle im spezifischen Pink1-Import und Stabilität an der Außenmembran zugeschrieben, da das endogene Pink1 unter basalen Konditionen ($+\Delta\psi$) kaum mit gängigen Nachweismethoden wie Western Blot oder Immunfluoreszenz detektierbar ist. Ein Pink1-Nachweis ist bislang nur möglich, wenn das mitochondriale Membranpotenzial durch einen Entkoppler wie CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) aufgehoben wird (Narendra et al. 2010). Zusätzlich wurde eine aufeinanderfolgende Pink1-Prozessierung von unterschiedlichen Proteasen belegt, wodurch die suborganellare Lokalisation von Pink1 ebenfalls betroffen sein soll (Deas et al. 2011; Greene et al. 2012). Zusammengefasst findet der exakte Pink1-Import viel komplexer statt und suggeriert ein vielschichtiges Zusammenspiel dieser gelisteten Faktoren.

Becker et al. konnten mittels *in vitro* Studien genauere Daten zur suborganellaren Lokalisierung und den Import von Pink1 darstellen (Abbildung 2). Sie fanden heraus, dass während $+\Delta\psi$, Pink1 teilweise durch die IMM über den Tom- und Tim23-Komplex importiert wird. Pink1 besitzt jedoch ein Außenmembran-Retentions-Signal, das dazu führt, dass es unvollständig importiert und in dem Tom- und Tim23-Kanal verbleibt, sodass eine vollständige Translokation über die

IMM verhindert wird (Okatsu et al. 2015). Lediglich ein Bruchteil des N-Terminus reicht bis in die Matrix und kann dort von der Protease MPP prozessiert werden, wodurch ein Intermediäres Spaltprodukt von ca. 60 kDa entsteht (Greene et al. 2012). Die in der IMM lokalisierte Protease PARL (engl.: *Presenilins-associated rhomboid-like protein*) schneidet Pink1 ein weiteres Mal zwischen der Position 103 und 104 in dessen Peptidsequenz und generiert schließlich das 53 kDa Fragment (Pink1_P) (Deas et al. 2011). In depolarisierten Mitochondrien assoziiert das vollständige 63 kDa Pink1 (Pink1_{FL}) mit der OMM (möglicherweise über den Tom-Komplex). Durch die Abwesenheit des Membranpotenzials ($-\Delta\psi$) können Präproteine und somit auch Pink1 nicht mehr importieren, da der Protonengradient die benötigte treibende Kraft für den Import darstellt. Dies führt dazu, dass Pink1 an der OMM akkumuliert, welches wiederum das zytosolische Parkin an die Mitochondrien rekrutiert und die nachgelagerte Mitophagie einführen kann. Zusammenfassend ist nach aktuellem Stand der Forschung Pink1 ein mitochondriales Außenmembranprotein, welches über einen nicht-kanonischen Importweg in die OMM inseriert wird – ein Prozess, der in Abhängigkeit des mitochondrialen Membranpotenzials und der korrekten Prozessierung des Pink1-Peptides stattfindet.

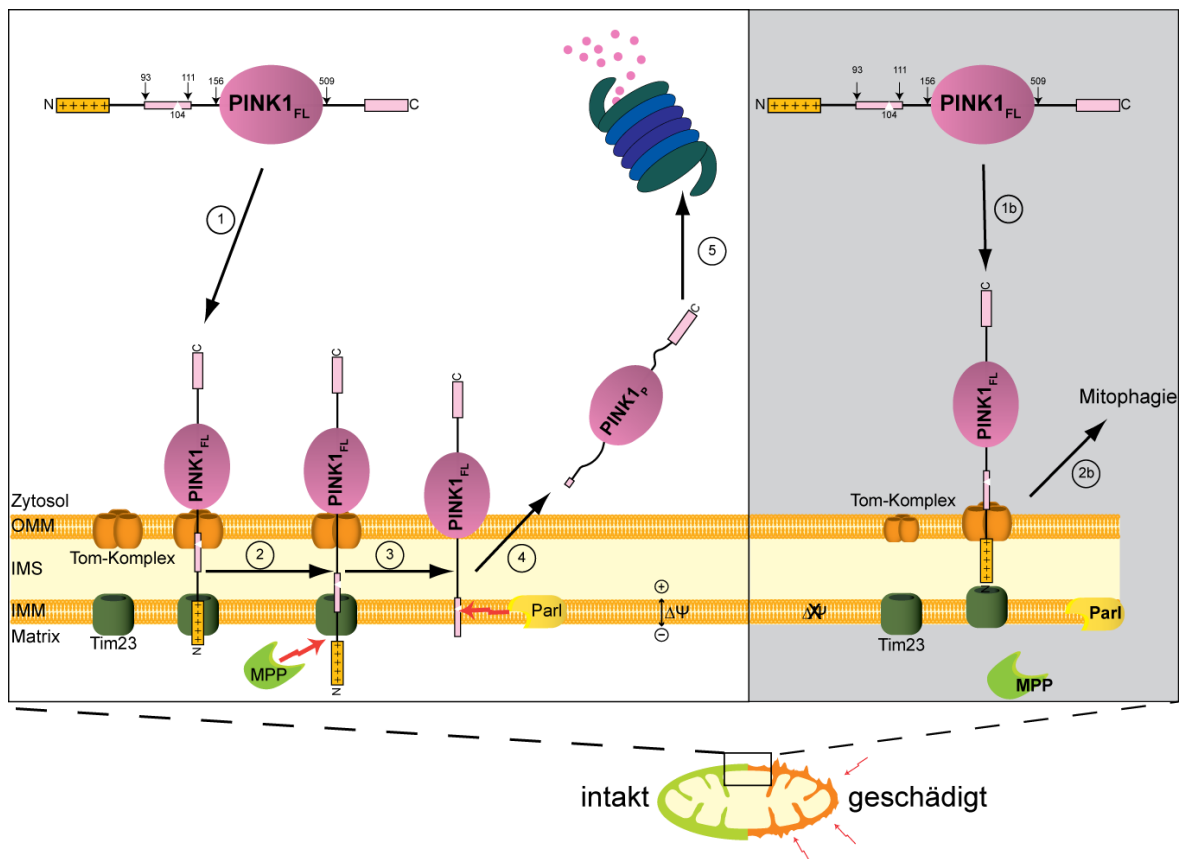


Abbildung 2: Modell der Pink1-Prozessierung in Abhängigkeit von $\Delta\psi$.

Intakte Mitochondrien mit stabilem Membranpotential $+\Delta\psi$ (linke Seite) exprimieren konstant niedrige Mengen von Pink1 (Pink1_{FL}). Die N-terminal lokalisierte Präsequenz von Pink1 steuert den Import von Pink1 durch den Tom-Komplex und Tim23 (1). Pink1 wird aufgrund des inneren mitochondrialen Retentionssignals unvollständig in die mitochondriale Matrix importiert, da nur die Präsequenz in Richtung der mitochondrialen Matrix weist (2). Die in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Protease MPP spaltet die mitochondriale Präsequenz ab (3), und die IMM-Protease PARL schneidet Pink1 an Position 104 (3), wodurch die prozessierte Pink1-Form (Pink1_P) entsteht. Pink1_P wird in das Zytosol freigesetzt und schließlich durch das Proteasom abgebaut. In geschädigten Mitochondrien mit depolarisiertem Membranpotential $-\Delta\psi$ (rechte Seite) akkumuliert Pink1 an der OMM (1b), was zur Einleitung der Mitophagie führt (2b). Modifiziert nach (Becker et al. 2012a).

2.6 Pink1 /Parkin-vermittelte Mitophagie

Über eine spezifische Form der Makroautophagie können geschädigte und dysfunktionale Mitochondrien vom mitochondrialen Netzwerk segregiert und selektiv als ganzes Organell abgebaut werden. Die makroautophagische Beseitigung geschädigter Mitochondrien oder kleinere Bestandteile des mitochondrialen Netzwerks wird umfangreich studiert. Es wurden bisher drei Typen der Mitophagie beschrieben: 1. Die rezeptor-vermittelte Mitophagie, die über den FUNDC1- oder den BNIP3/NIX-Rezeptor aufgrund von oxidativem Stress oder Nährstoffmangel den Abbau von Mitochondrien reguliert, 2. der Abbau geschädigter mitochondrialer Proteine durch abgelagerte mitochondriale Vesikel (engl.: *mitochondrial derived vesicles*, MDVs) und 3. die Pink1/Parkin-vermittelte Mitophagie (Ding und Yin 2012; Lemasters 2014).

Pink1 spielt eine Schlüsselrolle bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle, indem es sowohl die Initiierung der Pink1/Parkin-vermittelten Mitophagie als auch die Bildung von MDVs reguliert (McLelland et al. 2014; McLelland et al. 2016). Mäuse mit einer Pink1-Deletion zeigten jedoch eine von Pink1 unabhängige basale Mitophagie, was auf eine enge Verknüpfung zwischen den oben genannten Arten der Mitophagie als kompensatorische Wege hindeutet (McWilliams et al. 2018).

Pink1 fungiert als mitochondrialer Stresssensor, indem es konstant exprimiert wird (Pickrell und Youle 2015). In geschädigten Mitochondrien, die durch das Fehlschlagen des Imports gekennzeichnet sind, kommt es zur Akkumulation von Pink1_{FL}-Dimeren, die ihrerseits in *trans* autophosphorylieren, um die eigene Kinase-Funktion zu aktivieren (Okatsu et al. 2013). Dabei kann Pink1 an drei verschiedene Positionen autophosphorylieren: Ser228, Thr257 und Ser402, wobei nur Phosphorylierungen an Serin-Aminosäuren zu einer erfolgreichen Parkin-Rekrutierung führen (Okatsu et al. 2012). Die Phosphorylierung fördert die Schaffung einer Bindungsstelle für Ubiquitin und Parkin, welche dann von Pink1 phosphoryliert werden, was wiederum zur Aktivierung von Parkin und zur Einleitung der Mitophagie führt (Rasool et al. 2018). Zudem wird dieser Prozess verstärkt, indem das phosphorylierte Ubiquitin wiederum als Parkin-Rekrutierungssignal dient (Koyano et al. 2014). Die zytosolische E3-Ligase Parkin wird dadurch an die OMM verlagert und über die Pink1-vermittelte

Phosphorylierung aktiviert (Kondapalli et al. 2012; Koyano et al. 2014; Rasool et al. 2018; Shiba-Fukushima et al. 2012). Parkin ubiquitinyliert verschiedene OMM-Proteine wie z.B. Mfn1/2, VDAC1/2/3, Mito1, aber auch Teile des Tom-Komplexes (Gegg et al. 2010; Ordureau et al. 2015; Ordureau et al. 2018; Ziviani et al. 2010). Die Parkin-spezifisch ubiquitinylierten Proteine werden von der Autophagie-Maschinerie erkannt, indem Adaptorproteine der Phagophorenmembran mit diesen interagieren (Tanaka et al. 2010). Das Autophagosom umschließt die mitochondriale Fracht und verschmilzt zum endgültigen Abbau mit dem Lysosom. Umgekehrt regulieren Deubiquitinasen, wie USP30, unkontrollierte Mitophagie, indem sie die Parkin-induzierte Ubiquitinylierung aufheben (Bingol et al. 2014)(Abbildung 3).

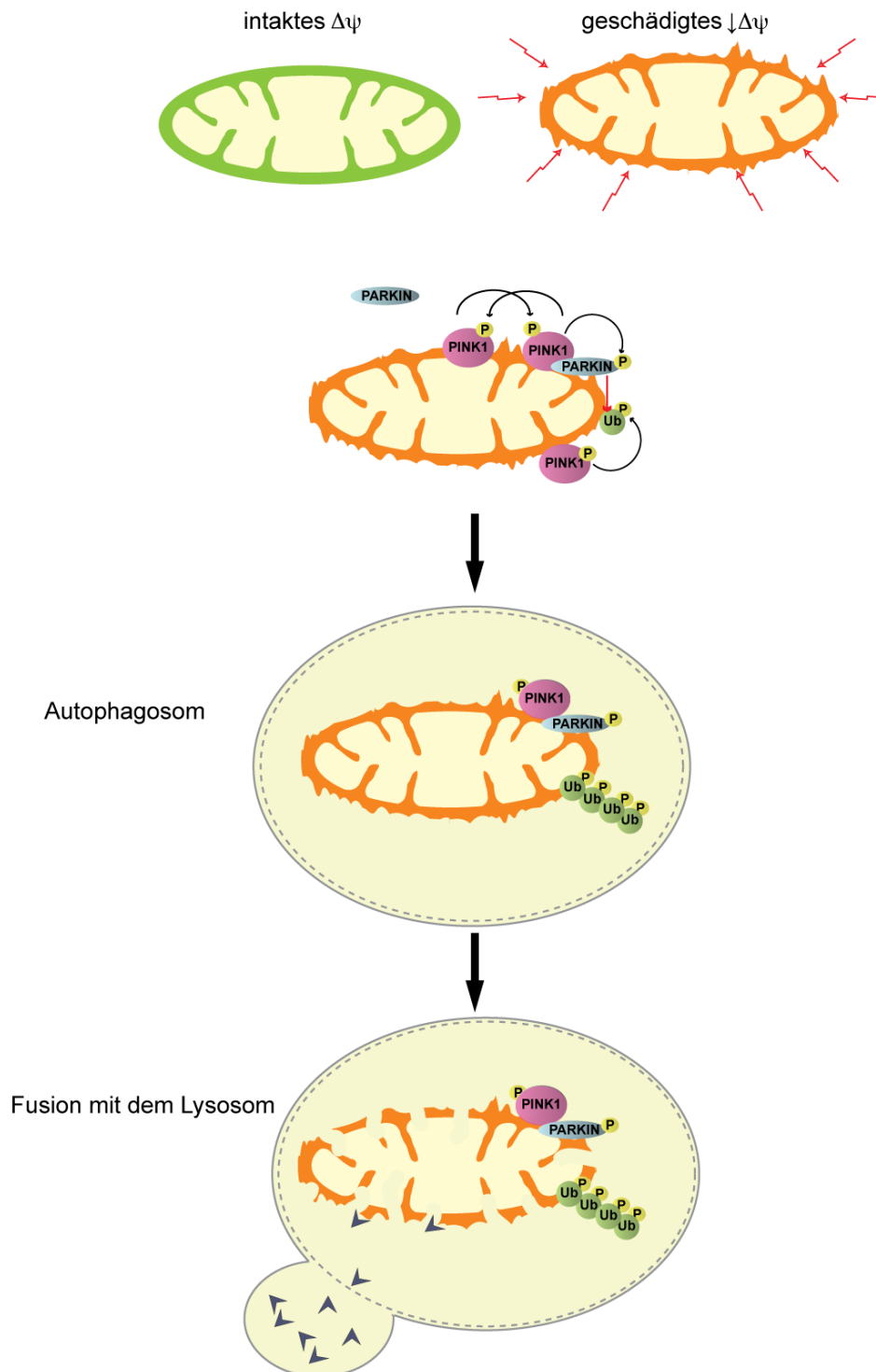


Abbildung 3: Aktuelles Modell der Pink1/Parkin-medierten Mitophagie.

Unter physiologischen Bedingungen ist das Proteinlevel von Pink1 sehr gering. Mitochondrialer Stress der zu dem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi$) führt, initiiert die Akkumulierung von Pink1 an der OMM. Pink1-Dimere auto-phosphorylieren in *trans*, sodass eine Selbstaktivierung und Konformationsänderung stattfindet. Das phosphorylierte Pink1 phosphoryliert Ubiquitin an dem Serine65, sodass diese Modifikation als ein Parkin-Rekrutierungssignal dient. Die zytosolische E3 Ligase Parkin wird ebenfalls von Pink1 phosphoryliert, welches Parkins E3 Ligase aktiviert. Parkin ubiquitinylierte mitochondriale Außenmembranproteine dienen als Erkennungssignal für die Autophagie-Maschinerie, sodass geschädigte Mitochondrien in einem Autophagosom isoliert werden. Dieses fusioniert mit dem Lysosom, welches mittels Hydrolasen den gesamten Inhalt verdaut.

2.7 Regulation des Pink1 Proteinlevels in der Zelle

Bis heute sind die zellulären Mechanismen, die zur Akkumulierung von Pink1 selbst führen, weit weniger eindeutig identifiziert. Das endogene Pink1-Level ist unter normalen Bedingungen so gering, dass dieses kaum nachweisbar ist. Das derzeitige Pink1- Regulationsmodell besagt, dass Pink1 konstitutiv auf einem niedrigen Niveau exprimiert und dieser niedrige stationäre Zustand durch einen schnellen und ebenfalls konstitutiven intrazellulären Umsatz durch Abbau von Pink1 erzeugt wird (Jin et al. 2010; Pickrell und Youle 2015). Eine verringerte Degradationsrate von Pink1, ausgelöst durch eine Dissipation des $-\Delta\psi$, soll zu einer Anhäufung von Pink1 an der äußeren Oberfläche der OMM führen (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010). Die daraus resultierenden hohen Pink1-Mengen wiederum führen zu einer Aktivierung von Parkin und Ubiquitin, gefolgt von der anschließenden Einleitung der Mitophagie (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010; Ziviani et al., 2010). Im Allgemeinen wurde eine chemisch induzierte Depolarisierung der mitochondrialen Innenmembran als Standardinduktion extremer mitochondrialer Schäden und zur Einleitung von Mitophagie in Zellkultursystemen verwendet. Es ist jedoch unklar, ob bei der Ätiologie der PD oder ähnlicher neurodegenerativer Erkrankungen, bei denen Mitochondrien beteiligt sind, eine vollständige Depolarisierung der Mitochondrien stattfindet. Eine Analyse des Pink1-Verhaltens auf molekularer Ebene unter pathophysiologisch relevanten Bedingungen steht daher weitgehend aus.

Es wird angenommen, dass die Expression des nuklear-kodierten Pink1 durch den Transkriptionsfaktor Foxo3a reguliert wird (Mei et al. 2009). Das Polypeptid Pink1 enthält eine N-terminale Zielsequenz, die das Protein nach der Synthese durch zytosolische Ribosomen in die Mitochondrien lenkt (Bogorodskiy et al. 2021; Pickrell und Youle 2015). Der Import von Pink1 folgt jedoch nicht den für mitochondriale Präproteine typischen Importwegen (Becker et al. 2012a). Obwohl der N-terminale Teil von Pink1, der als mitochondriale Zielsequenz fungiert, durch ein mitochondriales Prozessierungsereignis in Abhängigkeit vom Membranpotenzial abgeschnitten wird (Deas et al. 2011; Greene et al. 2012; Jin et al. 2010), befinden sich sowohl die Vollängen- als auch die prozessierte Form

von Pink1 überwiegend an der Außenseite der OMM. Über eine Tom40 Interaktion und einem C-terminalen Außenmembran-Retentionsignal wird die typische Pink1-Lokalisierung vermittelt, mit der Kinasedomäne dem Zytosol zugewandt (Becker et al. 2012a; Okatsu et al. 2015; Zhou et al. 2008). Diese Lokalisierung von Pink1 steht im Einklang mit seiner Rolle bei der Aktivierung des Mitophagie-Signalweges. Es wurde postuliert, dass die niedrigen Steady-State-Mengen von Pink1 unter normalen Bedingungen auf den schnellen Abbau der importierten und verarbeiteten Pink1-Moleküle zurückzuführen sind (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010). Über die für den Abbau verantwortliche Protease sind widersprüchliche Angaben veröffentlicht worden. Da der Abbau der typischen *N-End*-Regel zu folgen scheint (Yamano und Youle, 2013) und proteasomale Inhibitoren zumindest die prozessierte Form stabilisieren, wurde angenommen, dass das Proteasom die wichtigste beteiligte Protease bzw. Proteasekomplex ist (Lin und Kang, 2008; Takatori et al., 2008). Das prozessierte Pink1-Fragment wird an seiner K137-Peptidposition polyubiquitinyliert, wodurch es vom Proteasom erkannt und abgebaut wird (Liu et al. 2017). Im Gegensatz dazu wurde postuliert, dass Pink1 von der LonP1-Protease, der Hauptprotease des mitochondrialen Matrixkompartiments, abgebaut wird (Thomas et al., 2014). Dies ist im Wesentlichen nicht mit der Lokalisierung von Pink1 an der äußeren Membran vereinbar ist. Die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Protease OMA1 baut fehlimportiertes Pink1 in Tom7-defizienten Mäusen ab, welches sich während der Mitophagie nicht in der OMM anreichert (Sekine et al. 2019).

Zusammenfassend konnte noch nicht geklärt werden, welche molekularen Prozesse für die zunehmende Anreicherung von Pink1 an der mitochondrialen Oberfläche, als ein wichtiger Auslöser für die Pink1/Parkin-vermittelte Mitophagie dienen. Bis heute ist unklar, was genau die Pink1-Akkumulation verursacht, abgesehen von der vollständigen Entkopplung des mitochondrialen Membranpotenzials, die zu einer starken mitochondrialen Schädigung führt. Bislang wurden verschiedene andere Stressoren wie intrazelluläre Aggregate, Nährstoffmangel in Form von Aminosäuremangel, ROS-Stress, Ungleichgewicht von intrazellulärem Calcium und sogar viraler Stress beschrieben, die bei der Pink1-Induktion eine Rolle spielen sollen (Hirota et al. 2015; Jin und Youle 2013; Wang et al. 2020; Xiao et al. 2017; Zhang et al. 2017). Außerdem stellt sich die

Frage, ob die prozessierte Form von Pink1 ein Abbauprodukt darstellt, oder ob diese eine spezifische Funktion erfüllt.

2.8 Pink1 und Pgam5

Die mitochondriale Phosphoglycerat-Mutase 5, bzw. mitochondriale Serin/Threonin Phosphatase (Pgam5), ist als ein weiteres mitochondriales Außenmembranprotein bekannt, das ebenfalls $\Delta\psi$ -abhängig von PARL prozessiert wird. Im Gegensatz zu Pink1, welches bei $+\Delta\psi$ prozessiert wird, wird Pgam5 erst bei einer Dissipation des Membranpotenzials ($-\Delta\psi$) geschnitten (Cheng et al. 2021). Pgam5 kommt im Menschen als die Pgam5-L und die Pgam5-S Isoform vor, wobei die von PARL prozessierte Δ Pgam5-L das gleiche Molekulargewicht aufweist wie Pgam5-S und sie somit kaum voneinander separierbar sind. Es wurde beschrieben, dass Mutationen im Pgam5-Gen einen PD-ähnlichen Phänotyp in *Drosophila melanogaster* verursachen (Lu et al. 2014; Sadatomi et al. 2013) und Pgam5 als möglicher Pink1-Bindungspartner fungiert (Imai et al. 2010). Im Verlauf der Mitophagie bildet Pink1 mindestens zwei hochmolekulare Komplexe an der Oberfläche von Mitochondrien (Becker et al. 2012a), deren Teilnehmer noch nicht eindeutig identifiziert wurden. Es wurde jedoch beschrieben, dass im Verlauf der Mitophagie-Initiierung Pgam5 mit Pink1 interagiert und Pink1 an der OMM stabilisiert (Imai et al. 2010; Park et al. 2018). Aufgrund dessen wurde Pgam5 im Zuge dieser Arbeit als ein interessanter Bindepartner genauer in Betracht gezogen und untersucht, ob es an der Regulation von Pink1 beteiligt ist.

3 Zielsetzung der Arbeit

Im Vordergrund dieser Dissertation stand die Charakterisierung von der parkinson-assoziierten Kinase Pink1 und den zugrundeliegenden zellulären Faktoren während Mitophagie. Derzeit beruht die klassische Pink1-Regulierung auf dem membranpotenzial-abhängigen Proteinimport und einen damit einhergehenden schnellen Umsatz des Proteins durch Abbau. Unklar ist jedoch, ob das Pink1/Parkin Modell eine vollständige Depolarisierung aller Mitochondrien für die Aktivierung des Pink1/Parkin Systems voraussetzt; einem Zustand, der unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich erscheint. Zusätzlich verbraucht eine konstitutive Synthese des Pink1-Peptids und dessen gleichzeitiger Abbau viel Energie, sodass dieser Prozess für die Zelle nicht energieeffizient ist. Um diesen Aspekt zu adressieren, sollte das endogene Verhalten von Pink1 analysiert und über ein neuetabliertes Mitophagie-Assay den durch Pink1 regulierten Mitochondrien-Abbau visualisiert werden. Um einen genaueren Überblick über die für den Anstieg des Pink1-Spiegels verantwortlichen zellulären Bedingungen zu bekommen, sollten humane Zellen zum einen mit diversen Inhibitoren behandelt, aber auch genetisch veränderte humane Zelllinien analysiert werden. Im weiteren Fokus dieser Arbeit sollte mittels CRISPR/Cas9 eine funktionale humane Pink1 KO-Zelllinie generiert und charakterisiert werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von exogenem Pink1 in der Pink1 KO-Zelllinie genauer betrachtet werden, um weitere Rückschlüsse auf die Regulation von Pink1 zu ziehen.

Das während der Mitophagie stabilisierte Pink1 formt einen hochmolekularen Komplex, dessen Komplexpartner und deren Funktion in diesem Prozess bis jetzt teilweise unklar sind. Für den Nachweis von Pink1_P als auch Pink1_{FL} Interaktionspartnern, sollte eine massenspektrometrische Analyse von zuvor affinitätsgereinigtem Pink1 unter physiologischen als auch Pink1-stimmulierenden Bedingungen durchgeführt werden. Ein besonderes Augenmerk lag zudem in der Analyse der funktionalen Konsequenz durch den massenspektrometrisch identifizierten Bindepartner Pgam5. Dafür sollte mittels *in vitro* Bindestudien die physiologische Interaktion analysiert, sowie durch Überexpressionsanalysen und Heranziehen einer zusätzlich CRISPR/Cas9 generierten Pgam5 KO-Zelllinie studiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Laborgeräte

Laborgeräte	Name	Hersteller
Autoklav	Varopclav 405E	H+P
Blotkammer	Semi-Dry Blotter	PeqLab
Blue-native PAGE Gelkammer	Hoefer SE 600	Hoefer
CCD-Kamera	LAS-4000 mini	Fujifilm
Durchflusszytometer	CyFlow space CYS3001	Sysmex-Partec
Durchlichtmikroskop	WILL	Wilovert S
Einfrier-Container	Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene®
Immunfluoreszenz Mikroskop	EVOS _{FL}	PeqLab
<i>Live cell</i> Mikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
Mikroplattenleser	Infinite M200 pro	Tecan
Power Supply	Power Supply	Biorad
Ultraschall	Bioruptor®-Sonication Device	Diagenode
Zellinkubator	Functional Line Cell Incubator	Heraeus Instrument

4.1.2 Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
ATP Determination Kit	Invitrogen
Express [³⁵ S] Protein Labeling mix	Perkin Elmer
MitoSOX mitochondrialer Superoxid Indikator	Life technologies
Plasmid DNA isolation Kit	Life technologies
Protease Inhibitor Cocktail	Carl Roth
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega

Roti®-Bradfordreagenz	Carl Roth
Roti®-Mount Fluoro Care	Carl Roth
Roti®-Mount Fluoro Care mit DAPI	Carl Roth
ServaLight EoSUltra CL HRP WB	Serva
Turbofect Transfektionsreagenz	Thermo Scientific

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cell scraper	Eppendorf
Live Cell Platte (μ -Dish, 50 mm)	Ibidi
Pipetten	Cellstar
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Roti-PVDF, pre size 0.45 μ m, Roth

Die Standard-Verbrauchsmaterialien wurden von Sarstedt verwendet.

4.1.4 Chemikalien

Name	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Antimycin A	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Carbonyl-cyanid3-chlorophenylhydrazon	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Digitonin	Calbiochem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Menadion	Sigma-Aldrich
MG132 (Z-leu-leu-leu-al)	Sigma-Aldrich
Oligomycin	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Puromycin	Carl Roth
Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE)	Life technologies
Valinomycin	Sigma-Aldrich

Alle weiteren verwendeten Chemikalien, sofern hier nicht aufgeführt, wurden von Carl Roth bezogen.

4.1.5 Lösungen und Puffer

Alle hier gelisteten Puffer wurden für die dargestellten Experimente verwendet. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen und Puffer in destilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt.

Puffer	Zusammensetzung
Agarose Gel	1% (w/v) Agarose 0,1% (v/v) Ethidiumbromid in TAE
Anoden Puffer (10x)	500 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0
Blockier Lösung	5 % (w/v) Milchpulver 0.5% (v/v) Tween 20 1x Dekosalt oder 1x TBS
Blockier Lösung (Immunzytochemie)	2% (w/v) BSA 1 x PBS
Coomassie Entfärber	50% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 40% ddH ₂ O
Coomassie Färbelösung	50% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 5 g/L Coomassie Brilliant Blue G 250 40% ddH ₂ O
Deko Salt (1x)	50 mM Tris 150 M NaCl
Digitonin Lysepuffer	1% (w/v) Digitonin 20 mM Tris-HCl pH 7,4 2 mM EDTA pH 8,0 50 mM NaCl 10% (v/v) Glycerol 1 mM PMSF

Material und Methoden

FACS Puffer	0.2 % (w/v) BSA 1 x PBS
Fixierlösung, pH 7.2	4% (v/v) Formaldehyde 10% (w/v) Saccharose 1 x PBS
Gelpuffer (3x)	200 mM ϵ -Aminocapronsäure 150 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0
Import Puffer	5 mM Glutamat 5 mM Malat 50 mM KPi, PH7,4 2 mM ATP 1 mM DTT in Import Stammlösung
Import Stammlösung	250 mM Saccharose 20 mM HEPES/KOH, pH7,6 80 mM Kaliumacetat 5 mM Magnesiumacetat
Kathoden Puffer (10x)	500 mM Tricin pH 7 150 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0 0,2% (w/v) Coomassie G-250
KPi- Kalium-Phosphat Puffer	1 M K_2HPO_4 pH 7,4 1 M KH_2PO_4 pH 7,4
Lämmli Probenpuffer (1x Lämmli)	10% (v/v) Glycerol 60 μ M Tris/ HCl pH 6.8 2% (w/v) SDS 5% (v/v) β - Mercaptoethanol
Lösung A	20 mM Hepes pH 7,6 220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 1 mM EDTA 0,2% (w/v) BSA 1 mM PMSF

Lösung B	20 mM Hepes pH 7,6 220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 1 mM EDTA 1 mM PMSF
Lysepuffer	0,5% Triton 30 mM Tris-HCl, pH7,4 200 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1x PI (Proteinase Inhibitor Cocktail) 0,5 mM PMSF
PBS-Phosphate buffered saline 1x (pH7.4)	2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2HPO_4 8,1 mM Na_2HPO_4 0,137 M NaCl
Permeabilisierungslösung	0,5% (w/v) Triton X-100 1 x PBS
Potenzial Puffer (pH 7,2)	0,6 M Sorbitol 0,1% (w/v) BSA 10 mM MgCl_2 20 mM KPi (pH 7,2)
Probenpuffer Blue Nativ (10x)	5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 500 mM ϵ -Aminocapronsäure 100 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0
SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Tris/HCl 1,91 M Glycin 10% SDS
TAE	5 mM Tris 2 mM EDTA 2 mM Natriumacetat pH 8,0

TBS (1x)	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
Transferpuffer (1x)	20 mM Tris 0,15 M Glycin 0,1% (w/v) SDS 20% (v/v) Ethanol
Wet blot Puffer	92 mM Glycin 25 mM Tris

4.1.6 Medium und Reagenzien für Zellkultur

4.1.6.1 Reagenzien

Name	Hersteller
0.005% Trypsin-EDTA	Gibco, Life technologies
10x PBS	Gibco, Life technologies
DMSO	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, Life technologies
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Life technologies
L-Glutamin	Gibco, Life technologies
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life technologies
RPMI 1640 Medium	Gibco, Life technologies
RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot)	Gibco, Life technologies

4.1.6.2 Zellkulturmedium

Medium	Zusammensetzung
Cybrid Medium	DMEM 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 mg/mL Streptomycin 10% (w/v) FKS, dialysiert MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren (1x), Gibco™ 150 µg/ml Uridine
Einfriermedium	RPMI 1640 10% DMSO 40% FKS
<i>Live Cell</i> Medium	RPMI 1640 (ohne Phenolrot) 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 mg/mL Streptomycin 10% (w/v) FKS 25 mM HEPES
SILAC Medium	DMEM Medium für SILAC 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 mg/mL Streptomycin 10% (w/v) FKS, dialysiert 4,5g/L Glucose 0,47 mM Arginine 0,46 mM Lysine 15 mg/L Phenolrot
Transfektionsmedium	OPTI-MEM

Zellkulturmedium	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 mg/mL Streptomycin 10% (w/v) FKS
------------------	--

4.1.7 Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
HeLa WT	Humanes Cervix Karzinom	DSMZ, Acc-57
LonP1gKD	HeLa mit Deletion in LONP1 Gen	Karen Pollecker
Pgam5 KO	HeLa mit einer Deletion in Exon 1 des Pgam5 Gens	Laura Lüdecke
Pink1 KO	HeLa mit einer Deletion in Exon 1 des Park6 Gens	Laura Lüdecke
Rho WT	unbekannter Ursprung	Serge Przedborski
Rho ⁰	unbekannter Ursprung	Serge Przedborski

4.1.8 Plasmide

Name	Insert	Vektor	Beschreibung	Nr.	Hersteller
pDB13	pPink1-His	pCDNA4/V5-His	Humanes Pink1 mit C-terminalem His-tag	#513	D. Becker
pHsPgam5-L	Pgam5-L	pCMV6-Entry	Humanes PGAM5-L für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#773	Origene NM_001170543
pHsPgam5-S	Pgam5-S	pCMV6-Entry	Humanes PGAM5-S für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#731	Origene NM_138575
pKP15	Su9-mCherry	pcDNA3.1	Su9-mCherry für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#749	K. Pollecker

pKP16	Su9-mCherry-Q115	pcDNA3.1	Su9-mCherry-Q115 für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#750	K. Pollecker
pKP17	mCherry-Q115	pcDNA3.1	mCherry-Q115 für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#751	K. Pollecker
pKP18	Su9-mCherry-DHFRds	pcDNA3.1	Su9-mCherry-DHFRds für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#756	K. Pollecker
pKP19	Su9-mCherry-DHFR	pcDNA3.1	Su9-mCherry-DHFR für Mammalia Expression (CMV-Promotor)	#757	K. Pollecker
pLL01	pGuide RNA 3.1	pX459 V2.0	CRISPR/Cas Leitsequenz Pink1 3.1	#741	L. Lüdecke
pLL05	pGuide RNA Pgam5	pX459 V2.0	CRISPR/Cas Leitsequenz Pgam5 2	#759	L. Lüdecke
pLL04	Su9-GFP-mCherry	pcDNA3.1	Su9-eGFP-mCherry Fusionskonstrukt für Mitophagie Visualisierung	#747	L. Lüdecke
pLL06	Pink1-Promotor	pGL3 Basic	Pink1 Promotor in pGL3 Basic mit Luziferase expression	#765	L. Lüdecke
pLL07	Δ -Pgam5-L	pCMV6-Entry	Humanes PGAM5-L für Mammalia Expression mit C-terminaler Deletion der PARL-Schnittstelle	#783	L. Lüdecke
pLL08	Δ -Pgam5-S	pCMV6-Entry	Humanes PGAM5-S für Mammalia Expression mit C-terminaler Deletion der PARL-Schnittstelle	#784	L. Lüdecke
pPink1-FLAG	Pink1-FLAG	Pshuttle-1-3xFlag-IRES-GFP	Humanes Pink1 mit C-terminalem 3xFLAG-Tag und hrGFP bicistronisch coexprimiert	#665	Agilent/Stratagene
pSpCas9(BB)-2A-Puro	pX459 V2.0	pX459 V2.0	Vektor mit CRISPR/Cas9 Endonuklease (CMV-Promotor)	#702	Addgene #62988

CMV-Promotor= Promotor des humanen Cytomegalovirus; CRISPR (engl.: *Clustered Regularly Interspace Short Palindromic Repeats*); Cas9 (engl.: CRISPR-associated endonuclease 9).

4.1.9 siRNA

Transkript	Hersteller	Code
Yme11l	Santa Cruz	sc-90696

4.1.10 Antikörper

4.1.10.1 Primärantikörper

Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller	Code
Actin	Maus	1:5000	NEB	3700S
Flag-Tag	Maus	1:2000	Sigma	T5168
Gapdh	Kaninchen	1:5000	NEB	2118S
Hsp60	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	SC-13966
Komplex I/ Ndufa9	Maus	1:1000	Invitrogen	459100
Komplex II/SDHA	Kaninchen	1:2000	ProteinTech	14865-1-AP
Komplex IV COX4	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	3E11
KomplexV/ F1β	Maus	1:2000	Invitrogen	A21351
LC3a/b	Kaninchen	1:1000	NEB	12741S
LonP1	Kaninchen	1:1000	Eigenes AS	GR-1047-2
mCherry	Ziege	1:2000	OriGene	AB0081-20
Mfn2	Maus	1:2000	Santa Cruz	sc-100560
P65S-Ubiquitin	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	62802
Parkin	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling	2132
Pgam5	Maus	1:1000	Santa Cruz	Sc-51588
Pink1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	6946
Tim23	Maus	1:2000	BD Bioscience	611222
Tom20	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	Sc-11415
Tom22	Maus	1:1000	Novus	N155
Tom40	Maus	1:1000	Santa Cruz	Sc-365467
Tom70	Kaninchen	1:1000	Novus	NB 110-583 47
Trap1	Kaninchen	1:2000	Eigenes AS	GR-2388-5
Yme11l	Kaninchen	1:2000	ProteinTech	11510-1-AP
α-Tubulin	Maus	1:10000	Sigma	T5168

4.1.10.2 Peroxidase-gekoppelte und Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper

Sekundär-antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller	Code
Alexa Fluor TM 350	Maus	1:200	Invitrogen	A11045
Alexa Fluor TM 350	Kaninchen	1:200	Invitrogen	A11046
Alexa Fluor TM 488	Maus	1:200	Invitrogen	A11008
Alexa Fluor TM 488	Kaninchen	1:200	Invitrogen	A11001
Alexa Fluor TM 594	Maus	1:200	Invitrogen	A11005
Alexa Fluor TM 594	Kaninchen	1:200	Invitrogen	A11012
Kaninchen IgG	Ziege	1:5000	Sigma-Aldrich	A6154
Maus IgG	Ziege	1:5000	Sigma-Aldrich	A4416
Ziege IgG	Huhn	1:5000	Origene	AP31796
				HR-N

4.1.11 Proteinstandards

Marker	Hersteller
NativeMark protein standard	Invitrogen
Roti-Mark Tricolor	Roth

4.1.12 Software

Software	Hersteller
Excel	Microsoft
Flowing Software 2	Perttu Terho, Cell Imaging and Cytometry, Turku Bioscience Centre
Graphpad prism 6	GraphPad Software
Illustrator	Adobe
Photoshop	Adobe
Serial cloner 2.0	Serial basics
Word	Microsoft
ZEN	Zeiss

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die hier verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Zellkulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet. Dafür wurden diese einmal mit 1 xPBS gewaschen und für 3 min mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium von der Kulturschale abgewaschen und vereinzelt.

Zum Aussäen einer definierten Zellzahl, wurden diese in einer 1:10 Vorverdünnung in 1x PBS mit einer Neubauer Zählkammer nach Herstellerangaben ermittelt.

4.2.2 Transfektion

Für eine transiente Plasmid-Transfektion mit Turbofect™ wurden die Zellen nach Herstellerangaben ausgesät und transfiziert. Nach 4 h wurde das Medium durch Zellkulturmedium ausgetauscht. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Experimente 48 Stunden post-Transfektion durchgeführt.

4.2.3 Pink1 und Pgam5 Knockout durch CRISPR/Cas9

Für die Generierung eines Knockoutmodells in Zellkultur wurde das Protokoll zur Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 System angewendet (Ran et al. 2013). Um einen vollständigen Pink1-Knockout zu generieren, wurde das Exon 1 des *Park6*-Gens gewählt um einen Doppelstrangbruch einzufügen. Dafür wurde eine Leitsequenz erstellt, welche an das Exon 1 bindet, von der Endonuklease Cas9 erkannt wird und dort zielgerichtet schneidet (Leitsequenz: CCGGGTCCTAAGCCGAGCGG). Für die Generierung eines Pgam5 Knockouts wurde ebenfalls eine Leitsequenz erstellt, welche im Exon1 des *Pgam5*-Gens bindet und dort einen Cas9 medierten Doppelstrangbruch erzeugt (Leitsequenz: TCTTCTCGGCCGTGGCGGTAGGG).

HeLa WT Zellen wurden mit erfolgreich kloniertem Cas9-Vektor, welcher sowohl die entsprechende Leitsequenz als auch die Cas9 kodiert, mittels Turbofect® transfiziert und nach ihrer erworbenen Puromycin-Resistenz selektiert. Die selektierten Zellen wurden anschließend so verdünnt, dass pro 96-Well 0,5 Zellen ausgesät wurden (*Single-cell dilution*). Die so gewachsenen Kolonien konnten

nach ca. zwei Wochen auf größere Platten verteilt werden. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Klons wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot und Immundekoration analysiert. Pink1 KO Klone wurden 16 h vor der Lyse zusätzlich mit 1 μM Valinomycin behandelt um das Pink1-Signal nachweisen zu können.

4.2.4 Zellbehandlung

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen für 16 h mit folgenden Substanzen behandelt:

Inhibitor	f.c.
Antimycin A	200 μM
CCCP	10 μM
Cycloheximid	50 μM
Menadion	50 μM
MG132	10 μM
Oligomycin	200 μM
Puromycin	2 $\mu\text{g/mL}$
Valinomycin	1 μM

4.2.5 Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Üblicherweise werden Proteine mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse über ein 12,5 % Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden 15-30 μg Proben in 1x Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht, zentrifugiert und auf das Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 3 h bei 35 mA mit 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

4.2.6 Blue Native -Polyacrylamid Gel Elektrophorese (BN-PAGE)

Proteinkomplexe können mittels nativer Gelelektrophorese nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden (Schägger und Jagow 1991). Dafür wurden 50 μg frisch isolierte Mitochondrien in Digitonin-Lysepuffer aufgelöst und anschließend bei

einem Klärungsschritt für 10 min, 20.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10x Probenpuffer Blue Nativ versetzt und auf ein 4-13% Polyacrylamid Gradientengel aufgetragen (Wittig et al. 2006). Die Gelkammer wurde zuvor mit gekühltem Anoden- und Kathodenpuffer befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei großen Gelen über Nacht bei 70 V und kleinen Gelen für eine Stunde bei 100 V. Dabei wurde darauf geachtet, dass während der Elektrophorese eine konstante Temperatur von 4°C eingehalten wurde. Anschließend wurden die Proteinkomplexe aus dem BN-Gel mittels Semi-Dry Blot-Methode auf eine PVDF-Membran transferiert.

4.2.7 Proteinlyse

Standardmäßig wurden Zellen dreimal mit 1x PBS auf der Platte gewaschen. Anschließend wurden diese in 1 mL PBS mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurden dann bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer aufgenommen und mittels Bioruptor-Ultraschall bei hoher Frequenz für 5 Zyklen, 30 Sekunden an und 30 Sekunden aus, aufgeschlossen. Nach einem Klärungsschritt für 5 min bei 1500 x g wurde der Überstand für weitere Analysen benutzt.

4.2.8 Proteinquantifikation mittels Bradford

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde mittels Bradford-Test bestimmt (Bradford 1976). Hierfür wurde die Bradford Reagenz Stock-Lösung im Verhältnis von 1:5 verdünnt. Jeweils 5 µL der Probe oder des Proteinstandards, welcher aus verschiedenen Konzentrationen (0-2 mg/mL) BSA bestand, wurden mit 200 µL Bradford-Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm im Mikroplattenlesegerät vermessen. Zur Konzentrationsbestimmung konnte anschließend mittels BSA-Standardreihe die Probenkonzentration berechnet werden.

4.2.9 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran elektrisch mittels semi-dry Western Blot Technik transferiert. Die PVDF-Membran wurde dafür in 100% Ethanol aktiviert

und auf drei, in Transferpuffer eingeweichten, Whatman-Papieren platziert. Anschließend wurde luftblasenfrei das SDS-Gel und drei weitere Whatman-Papiere auf die PVDF-Membran gelegt, sodass ein Blot-Sandwich aufgebaut wurde. Der Transfer dauerte 2 h bei 220 mA. Zum Anfärben der PVDF Membran wurde diese in Coomassie-Färbelösung für 5 min inkubiert und anschließend mit Coomassie-Entfärber entfärbt, sodass die Proteine visualisiert und mittels Scanner digitalisiert wurden. Nach dem vollständigen Entfärben der Membran durch 100% Ethanol wurde diese für 1 h in Blockier-Lösung inkubiert. Im Anschluss eines dreimal wiederholten Waschschrilles mit TBS-T oder DS-T wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrill mit TBS-T oder DS-T wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T oder DS-T gewaschen und durch die Benutzung des Chemilumineszenz Substrates (ServaLight EoSUltra) über eine CCD-Kamera (engl.: *charge coupled device*) entwickelt. Wo aufgeführt, wurden die Western Blot Signale mittels MultiGauge Software quantifiziert.

4.2.10 TCA-Fällung von Proteinen

Mittels 72% Trichloressigsäure (TCA) können gelöste Proteine in einer Lösung ausgefällt werden. Dafür wurde zur Probe 1/5 des eigenen Volumens mit TCA versehen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 20000 x g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und schließlich bei Raumtemperatur für 10 min getrocknet und mit 1x Lämmli aufgenommen.

4.2.11 Immunzytochemie

Für die mikroskopische Analyse von Zellen wurden 4×10^4 Zellen auf sterile Deckgläser in ein Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Diese wurden dann entweder transfiziert und/oder anschließend über Nacht mit einem Inhibitor inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen 3-mal mit 1x PBS gewaschen und mit Fixierlösung für 5 min bei 37°C fixiert und nochmals 3-mal mit 1x PBS

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei RT für 10 min permeabilisiert und für eine Stunde bei RT mit Blockierlösung inkubiert. Die Deckgläser wurden danach 3-mal mit 1x PBS gewaschen und über Nacht mit Primärantikörper inkubiert. Am Folgetag wurden die Deckgläser mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT inkubiert und anschließend mit Roti®-Mounting Medium auf dem Objektträger fixiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen.

4.2.12 Isolation von Mitochondrien aus Säugerzellen

Um Mitochondrien aus kultivierten Zellen zu isolieren wurden diese zwei Mal mit 1x PBS auf der Zellkulturplatte gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt. Diese wurden bei 800 x g für 5 min bei 4°C pelletiert und in Lösung A aufgenommen und für mindestens 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Bioruptor-Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 5 Zyklen bei niedriger Frequenz 5 Sekunden beschallt, gefolgt von einer 60-sekündigen Pause. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 x g für 5 min bei 4°C wurde der Überstand gesammelt und das Pellet nochmals mittels Bioruptor-Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Die gesammelten Überstände aus beiden Homogenisierungsschritten wurden anschließend bei 12000 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert, sodass Mitochondrien pelletierten. Das Mitochondrien-Pellet wurde in Lösung B resuspendiert und bei 2000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert um die Mitochondrien von restlichen Zelltrümmern zu separieren. Der erhaltene Überstand wurde schließlich wieder bei 12000 x g für 10 min zentrifugiert, das Mitochondrien-Pellet abermals in Lösung B resuspendiert und mittels Bradford-Assay dessen Konzentration bestimmt.

4.2.13 Zellfraktionierung

Nach der Zellernte wurden diese zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und in Lösung B für 40 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Bioruptor für 5 Zyklen bei 5 s an und 60 s aus bei einer niedrigen Frequenz aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde in Zytosol- und Mitochondrien-Fraktion getrennt, indem es über ein

Saccharose-Kissen (30% Saccharose in Lösung B) für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand entsprach der zytosolischen Fraktion, das Pellet der mitochondrialen Fraktion. Für die experimentelle Analyse wurden alle Fraktionen mittels TCA-Fällung präzipitiert und in 1xLämmli aufgenommen.

4.2.14 Live Cell Mikroskopie

HeLa-Zellen wurden mit dem pLL04 (Su9-GFP-mCherry) transfiziert. Das Medium wurde 4 h nach der Transfektion durch *Live cell* Medium ausgetauscht. Nach Beginn der *Live cell* Mikroskopie wurde das Medium mit 1 µM Valinomycin behandeltes *Live cell* Medium ausgetauscht. In einem Intervall von 5 min wurde ein Bild gemacht.

4.2.15 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels TMRE Färbung und Durchflusszytometrie

Mittels dem zelldurchlässigen Farbstoff TMRE konnten HeLa-Zellen auf ihr $\Delta\psi$ untersucht werden. TMRE kann durch seine positive Ladung in intakte Mitochondrien importieren und dort anreichern. Dafür wurden die Zellen für 20 min bei 37°C mit 0,5 µM TMRE versetztes RPMI-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte trypsiniert und zweimal mit 1x PBS gewaschen und in FACS Puffer aufgenommen. Es wurden 20.000 bis 50.000 Zellen pro Probe vermessen. Als Negativ-Kontrolle wurden zuvor Zellen mit 1 µM Valinomycin behandelt und zusammen mit den Proben vermessen. Die Ergebnisse wurden anschließend mit der Flowing Software 2 analysiert.

4.2.16 Bestimmung von Sauerstoffradikalen von Zellen mittels MitoSOX Färbung und Durchflusszytometrie

Mitochondriale Superoxid-Radikale wurden in lebenden Säugerzellen mittels MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator dargestellt. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit 100 µM Menadion für 40 min inkubiert. Menadion gehört zu der Gruppe der Vitamin-K Substanzen und führt zu der Produktion von mitochondrialem ROS. Anschließend wurden die Zellen in RPMI-Kulturmedium für 10 min bei 37°C inkubiert, welches zuvor mit 100 µM MitoSOX™ versetzt wurde.

Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS in FACS Puffer aufgenommen. Die rote Fluoreszenz wurde von 20.000-50.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie und Flowing Software 2 analysiert.

4.2.17 *In vivo* Import von [³⁵S]-markierten Reporterproteinen

Zur Analyse des mitochondrialen Imports wurde das radioaktiv [³⁵S]-markierte Su9-(70)-DHFR als Präprotein in Hasen-Retikulozytenlysate in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin/Cystein translatiert. Für jeden Importansatz wurden 500.000 Zellen zunächst in Importpuffer resuspendiert und mit 0,005 % Digitonin für 5 min bei 37 C° permeabilisiert. Anschließend wurden die Proben bei 12000 x g für 10 min pelletiert und wieder in Importpuffer resuspendiert. Die Behandlung einer Probe mit AVO vor der Importreaktion diente als Negativkontrolle. Die Importreaktion wurde durch die Zugabe des radioaktivmarkierten Su9-(70)-DHFR gestartet und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 30 C° inkubiert. Anschließend wurde die Importreaktion durch die Zugabe von 0,5 µM Valinomycin gestoppt. Damit lediglich das importierte Protein untersucht werden kann, wurde ein Teil der Proben mit 50 µg/mL Proteinase K (PK) für 30 min auf Eis inkubiert, um nicht importierte Proteine abzubauen. Der PK-Verdau wurde mit 5 mM PMSF inhibiert und alle Proben durch zweimaliges Waschen mit Importpuffer und PMSF behandelt. Das Pellet wurde zuletzt in 1xLämmli Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und digitaler Autoradiographie analysiert.

4.2.18 Pink1 Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung

HeLa-Zellen (2,4 x10⁵ Zellen) wurden mit 3 µg pCDNA4/V5-His Plasmid transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen jeweils mit DMSO oder CCCP für weitere 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels nativer Lyse (25 mM Tris/HCl pH 7,4, 80 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.5% Triton X100, 1 mM PMSF, 1 mM Imidazol), für 5 Zyklen bei 5 s an und 60 s aus mittels Bioruptor lysiert und anschließend 20 min bei 4°C und 1500 rpm auf dem Thermoschüttler vollständig aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann für 5 min bei 1500 x g, 4°C abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde dann mittels Bradford bestimmt. Das Zellysat wurde anschließend auf das mit

Lysepuffer-äquilibrierte Säulenmaterial aufgetragen. Der Ansatz wurde anschließend für 2 Stunden bei 4°C auf einem Rotator langsam verteilt. Danach wurden die Proben bei 5000 x g, 4°C für 30 s zentrifugiert und für 2 min stehen gelassen, damit sich das Säulenmaterial absetzen konnte. Anschließend wurde das Säulenpellet dreimal mit Waschpuffer gewaschen (25 mM Tris/HCl pH 7,4, 80 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM Imidazol). Das gebundene Protein wurde durch dreifache Zugabe des Elutionspuffers (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM PMSF, 250 mM Imidazol) eluiert, indem die Probe mit Elutionspuffer für 5 min bei RT und leichten Schwenken (300 rpm) auf dem Thermoschüttler inkubiert und anschließend für 30 s bei 5000 x g zentrifugiert wurde.

4.2.19 Pink1-Promotoranalyse mittels Luziferase-Assay

Der menschliche PINK1-Promotor, der einen Bereich von -3285 bis -174 (3111 bp) des Pink1 kodierenden Startkodons abdeckt, wurde mittels PCR aus menschlicher genomischer DNA amplifiziert und in den pGL3 basic Luziferase Reportervektor (Promega Biosciences) ligiert. Die Luziferase-Aktivität der transfizierten Zellen wurde mit einem Luziferase-Reporter-Assay-System (Promega; E1500) mittels Mikroplattenlesegerät gemessen. Die Luziferaseaktivität wurde auf die cotransfizierte GFP-Fluoreszenz normalisiert.

4.2.20 Massenspektrometrische Analyse des Pink1-Flag

Komplexes

Zur Analyse von Pink1-Bindepartnern wurde mittels Pink1-Komplex-Affinitätsreinigung überexprimiertes Pink1-Flag eluiert und massenspektrometrisch analysiert. Dafür wurden Pink1 KO-Zellen über einen Zeitraum von mindestens 5 Zellteilungs-Zyklen in SILAC (engl.: *stable isotope labelling with amino acids in cell culture*) Medium kultiviert, welches sich aus normalen Lys⁰/Arg⁰; mittelschwerem Lys⁴/Arg⁶ oder schwerem Lys⁸/Arg¹⁰ zusammensetzt. Die Zellen wurden mit einer Leerkontrolle (Mock) oder Pink1-Flag transfiziert und 16 h vor der nativen Zelllyse mit DMSO (Kontrolle) oder CCCP behandelt. Die Immunpräzipitation wurde mit DYKDDDK-Fab-Trap™ Agarose

nach Herstellerangaben von Chromotek durchgeführt. Die eluierten Proben wurden mit 1xLämmli ohne Bromphenolblau und Glycerin versetzt und der Massenspektrometrie (Core Facility, Uniklinik Bonn) für die quantitative massenspektrometrische Analyse übergeben.

4.2.21 Auswertung der MS Daten

Die Verarbeitung der Daten wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel durchgeführt und die Visualisierung über die Software GraphPad Prism 6 verwirklicht. Außerdem wurden zusätzliche Informationen über die identifizierten Proteine über die Proteindatenbank UniProt hinzugefügt und mögliche Interaktionen mit der Datenbank Biogrid abgeglichen (Oughtred et al. 2021).

4.2.22 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism 6 durchgeführt. Anzeigt wird der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (engl.: *standard error of the mean*, SEM) an.

5. Ergebnisse

5.1 Pink1-Proteinmenge unter zellulären und mitochondrialen Stress

5.1.1 Pink1-Detektion unter Anwendung von CCCP

Die Behandlung von Zellen mit einem Inhibitor wie CCCP führt zu der Entkopplung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und somit zu dem Verlust des kompletten mitochondrialen Membranpotenzials. Die Anwendung von Entkopplern der mitochondrialen Atmungskette wie CCCP oder Valinomycin ist eine in Laboren etablierte Methode, um Pink1 mit den gängigen Nachweismethoden zu detektieren (Matsuda et al. 2010; Narendra et al. 2008). Die zelluläre Pink1-Proteinmenge kann somit mittels SDS-PAGE/BN-PAGE und Western Blot von Zelllysaten und isolierten Mitochondrien nachgewiesen werden (Abbildung 4). Nach der Behandlung mit CCCP akkumulierte Pink1_{FL} (63 kDa). Eine Inhibierung des Proteasoms durch den Inhibitor MG132 führte zu der Akkumulierung der kürzeren 53 kDa Pink1_P-Form (Abbildung 4, A und B). Unter nativen Bedingungen konnte die Formierung von zwei hochmolekularen (engl.: *high molecular weight* (HMW)) - Komplexen von ca. 700 und 900 kDa nach CCCP-Behandlung gezeigt werden (Abbildung 4, C). Im Vergleich zur Kontrollprobe (DMSO) waren sowohl in Zelllysaten, als auch in isolierten Mitochondrien Pink1-Signale nur nach Behandlung mit CCCP detektierbar, während die korrespondierenden Ladekontrollen wie Gapdh (Zytoskelett) und Tom40 (mitochondrialer Marker) unverändert blieben (Abbildung 4, B und C).

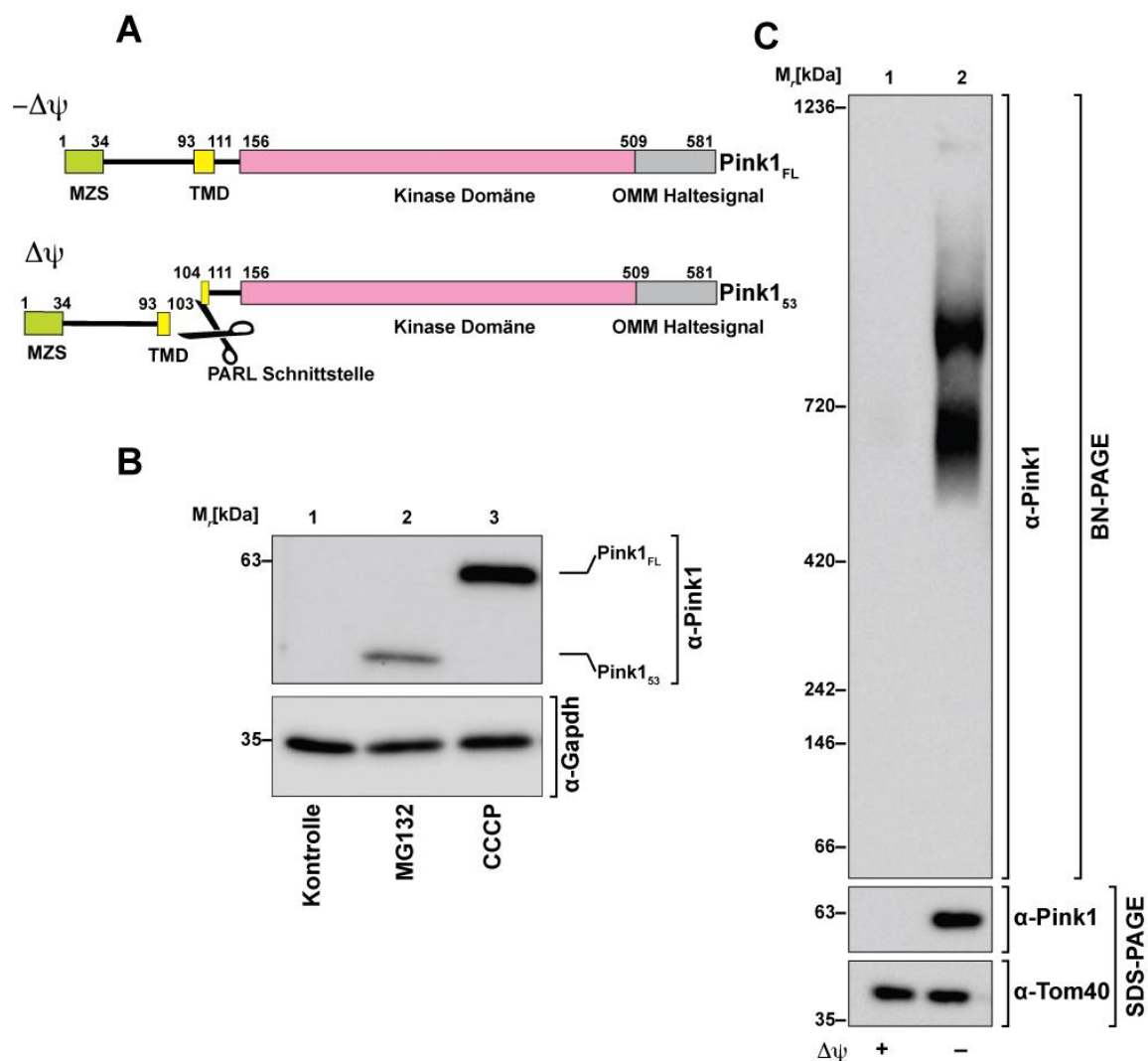


Abbildung 4: Pink1-Akkumulierung nach Inhibition des Proteasoms und Membranpotenzials.

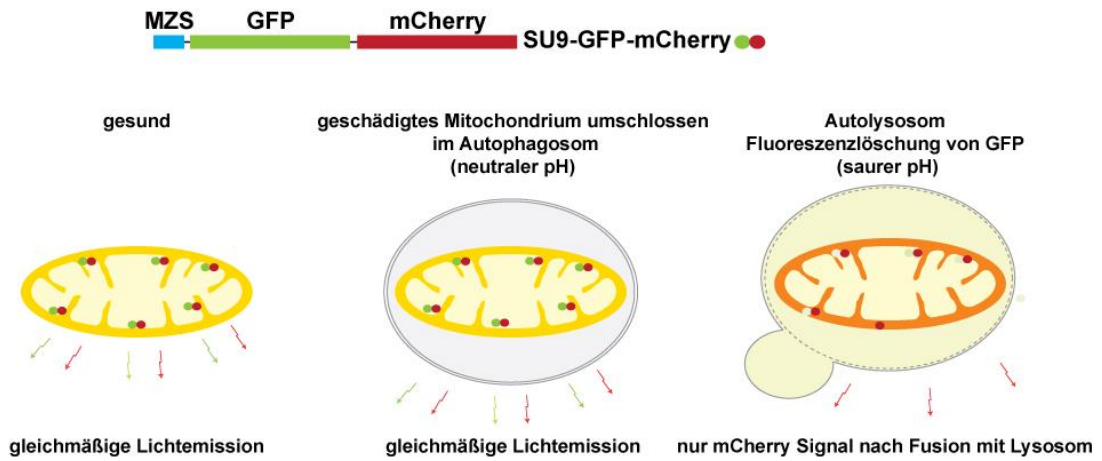
(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Pink1 in Abhängigkeit von $\Delta\psi$. Pink1-Prozessierung findet nur mit $+\Delta\psi$ statt und führt zu einer um 10 kDa verkürzten Form. (B) HeLa Zelllysate wurden nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/DMSO (Kontrolle), MG132 oder CCCP mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (C) Isolierte Mitochondrien aus HeLa-Zellen, die zuvor für 16 Stunden mit EtOH (Kontrolle, $+\Delta\psi$) oder CCCP ($-\Delta\psi$) behandelt wurden, wurden mittels nativer Gelelektrophorese (BN-PAGE) und Standard SDS-PAGE als Kontrolle aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

5.1.2 Visualisierung der Mitophagie nach verschiedenem mitochondrialem Stress

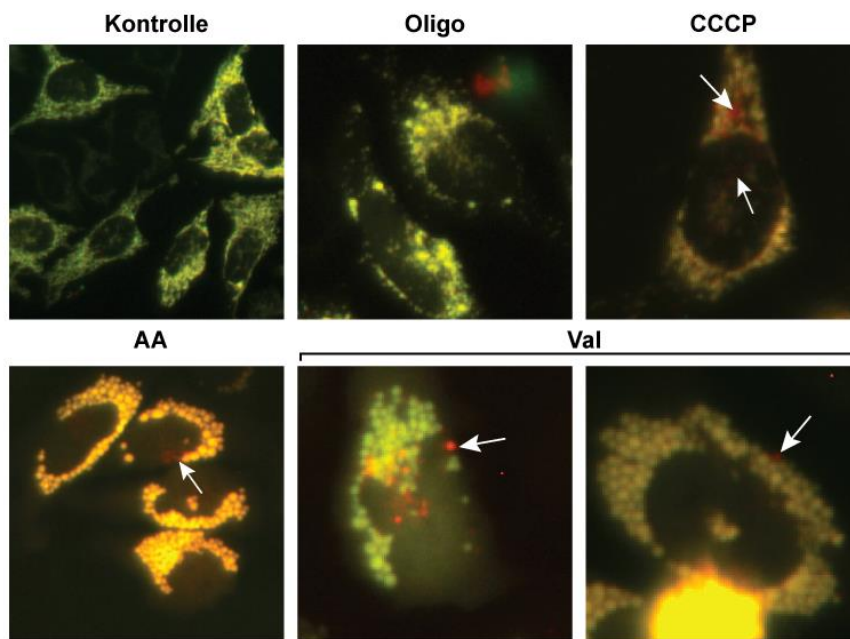
Pink1 übernimmt eine Schlüsselfunktion bei der Induktion von Mitophagie. Um den Prozess der durch Pink1 mediierten Mitophagie zu visualisieren, wurde ein Fusionsprotein erstellt (pLL04, Su9-GFP-mCherry), das mit einer mitochondrialen Zielsequenz gerichtet in die Matrix importiert und dort das fusionierte GFP und

mCherry-Protein exprimiert (Abbildung 5, A). mCherry ist als ein pH-stabiles fluoreszierendes Protein bekannt, während GFP in saurer Umgebung weniger stabil ist. Dadurch kommt es in Umgebungen mit niedrigem pH-Wert zur Fluoreszenzauslöschung, sodass weniger GFP-Signal emittiert wird (dos Santos et al. 2020). Während des Prozesses der Mitophagie fusionieren Autosomen mit den angesäuerten Lysosomen zu einem Autolysosomen, wodurch nach dieser Fusionierung ein pH-Abfall stattfindet. Ab diesem Ablaufschritt kann über das oben beschriebene Konstrukt Mitophagie visualisiert werden. HeLa-Zellen wurden mit pLL04 transfiziert und nach der Behandlung mit Pink1-induzierenden Inhibitoren über *live cell* Mikroskopie visualisiert. Die Kontrollzellen zeigten ein gleichmäßiges tubuläres mitochondriales Netzwerk, welches in der Überlagerung von GFP und mCherry gelb erschien. Die Behandlung mit allen hier verwendeten Inhibitoren zeigte nach 16-stündiger Inkubation eine deutliche Fragmentierung der Mitochondrien, nach Antimycin A und Valinomycin sogar deutliche, runde mitochondriale Fragmente (Abbildung 5, B). In einigen Zellen wurden nach Inhibitoren-Behandlung zusätzlich einige Bereiche visualisiert, in denen eine GFP-Fluoreszenzauslöschung stattgefunden hat (Abbildung 5, B aufgezeigt durch die Pfeile). Da Zellen unterschiedlich auf verschiedene Interventionen reagieren, die angesäuerten Bereiche unterschiedlich schnell entstehen können und das Konstrukt durch Mitophagie abgebaut werden kann, war es schwierig, den Verlust der GFP-Fluoreszenz in jeder transfizierten Zelle beobachten zu können. Deswegen wurde im weiteren Verlauf eine einzelne Zelle genauer betrachtet. Hierfür wurden HeLa-Zellen wieder mit pLL04 transfiziert und nach 48 h über *live cell* Mikroskopie visualisiert (Abbildung 5, C), wobei wiederum in einem Zeitintervall von 5 Minuten die Fluoreszenz aufgenommen wurde. Das Kulturmedium wurde nach 20 Minuten gegen ein Medium mit Valinomycin ausgetauscht. Nach kurzer Zeit konnte eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes beobachtet werden. Nach 250 Minuten zeigten sich einige, hauptsächlich rot fluoreszierende Bereiche (Abbildung 5, C markierte Region). In diesen Bereichen konnte eine eindeutige Fluoreszenzauslöschung des GFP detektiert werden, sodass angenommen werden kann, dass in diesen Bereichen eine starke Ansäuerung des pH-Wertes stattgefunden hat und dieses die Fusionierung mit den sauren Lysosomen darstellt.

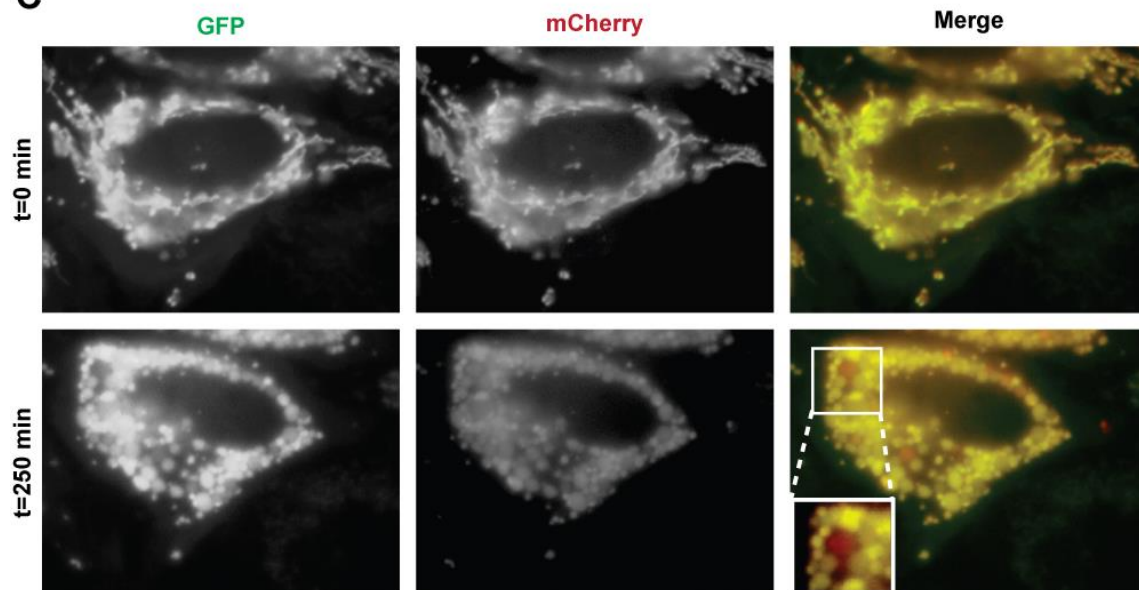
A



B



C



(Beschriftung siehe Seite 45)

Abbildung 5: Visualisierung der Pink1-induzierten Mitophagie.

(A) Schematische Darstellung des Mitophagie-Konstruktes. Eine mitochondriale Zielsequenz (Su9) wurde an die fluoreszierenden Proteine GFP und mCherry fusioniert. In zellulären Kompartimenten mit niedrigem pH-Wert kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung von GFP. (B) *Live cell* Mikroskopie von transfizierten HeLa-Zellen mit dem Mitophagie-Konstrukt. Zellen wurden für 16 h mit verschiedenen Pink1-induzierenden Inhibitoren behandelt. Die Pfeile deuten auf saure Bereiche während der Mitophagie hin. (C) Zeitlicher Ablauf der Pink1-induzierten Mitophagie nach Valinomycin-Behandlung. Zellen wurden im 5-minütigen Intervall aufgenommen und nach 20 min mit 1 μ M Valinomycin behandelt. Die Messung wurde nach 250 min beendet.

5.1.3 Pink1-Induktion durch Zellstress

Da bislang angenommen wurde, dass die Pink1-Akkumulierung immer durch ein reduziertes mitochondriales Membranpotenzial ($-\Delta\psi$) ausgelöst wird (Narendra et al. 2010), sollte in diesem Versuch analysiert werden, wodurch die Pink1 Induktion stimuliert wird. Einer der wichtigsten Komponenten der oxidativen Phosphorylierung ist die ATP-Synthese selbst. Inhibierung der F_1/F_0 -ATPase durch Oligomycin führt zu einer Störung der ATP-Produktion und spiegelt eine massive mitochondriale Fehlfunktion wider. Ein indirekter mitochondrialer Stress könnte auch durch das ER ausgelöst werden. Mitochondrien und das ER sind sowohl funktional als auch physisch verbunden (Paillusson et al. 2016). Beide Zellorganellen sind an der Calcium-Homöostase und dem Lipidmetabolismus beteiligt und formieren die sogenannten mitochondrialen-assoziierten ER-Membranen (MAM) (Vance 2014). ER-Stress hätte demnach die Voraussetzung auf Mitochondrien überzugehen und dort eine Pink1-Induktion zu verursachen. Tunicamycin-Behandlung ist ein bekannter Auslöser für ER-Stress und löst die klassische ungefaltete Proteinantwort (engl.: *unfolded protein response*, UPR) durch die Inhibierung von N-glykosidischen Protein-Verknüpfungen aus und resultiert dadurch in eine Fehlfaltung von neusynthetisierten Proteinen. Um besser zu verstehen, wodurch eine Pink1-Induktion im Einzelnen ausgelöst wird, wurden HeLa-Zellen für 16 h mit Oligomycin und Tunicamycin behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen jeweils für 0,5; 2 und 16 h mit CCCP inkubiert (Abbildung 6).

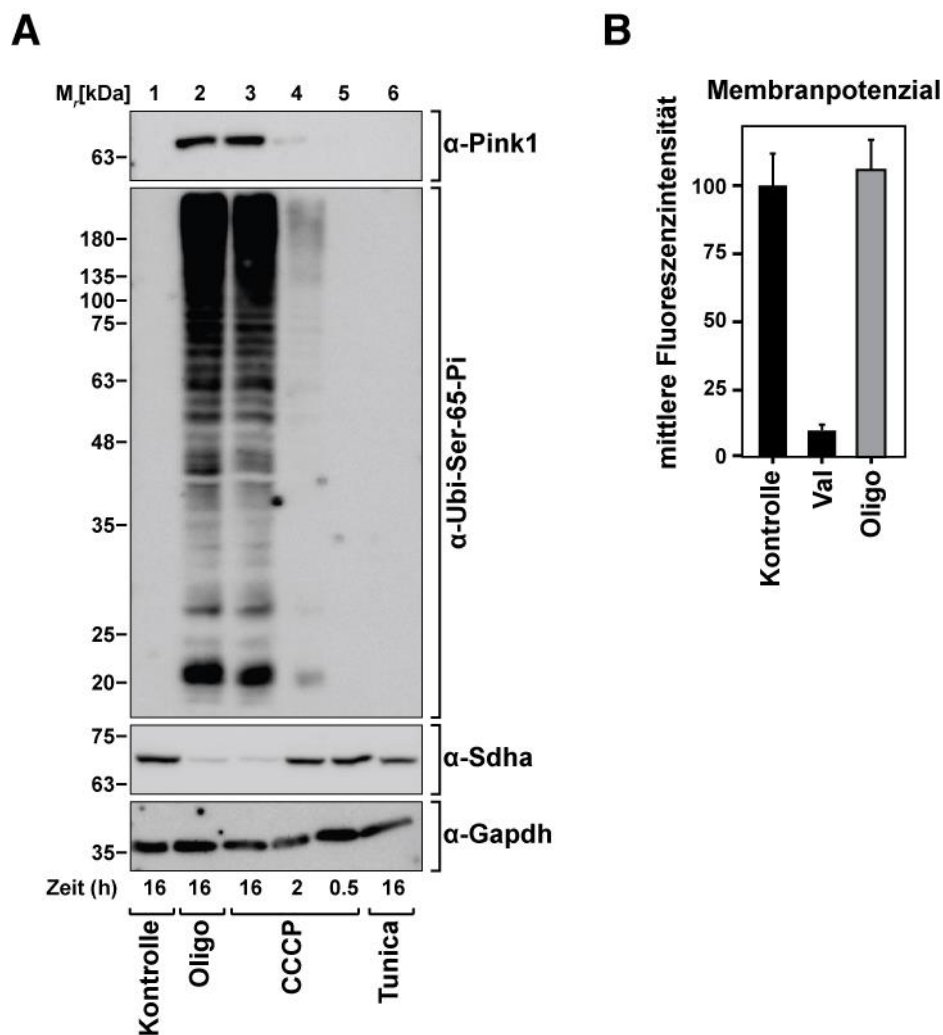


Abbildung 6: Pink1-Akkumulierung durch verschiedene Inhibitoren.

(A) HeLa-Zellen wurden mit Tunicamycin (Tunica) und Oligomycin (Oligo) für 16 h behandelt. Als Positivkontrolle wurden die HeLa-Zellen mit CCCP für 0,5; 2 und 16 h behandelt, die Negativkontrolle mit DMSO/EtOH. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. SDHA diente als mitochondriale und Gapdh als zelluläre Ladekontrolle. (B) Quantifizierung zur Analyse des $\Delta\psi$ mittels Durchflusszytometrie von HeLa WT Zellen. Zellen wurden nach 16 h Inkubation mit DMSO (Kontrolle), Valinomycin (Val) oder Oligomycin (Oligo) vermessen (n=3; Mittelwert \pm SEM).

Das Pink1-Signal stieg im zeitlichen Verlauf nach CCCP-Behandlung an, war jedoch nach 0,5 h noch nicht mittels Antikörpernachweis detektierbar. Da Pink1-spezifisch Ubiquitin phosphoryliert (Koyano et al. 2014), wurde im Zuge dieser Dissertation der Nachweis von phospho-Ubiquitin (anti-Ubi-Ser-65-Pi) als Pink1-Aktivität definiert. Ebenfalls war auch nach 0,5 h kein phospho-Ubiquitin nachweisbar. Tunicamycin führte in diesem Versuch zu keiner Pink1-Akkumulierung, jedoch leitete Oligomycin eine Pink1-Akkumulierung ein. Sowohl die 16-stündige Behandlung mit CCCP als auch die mit Oligomycin führten

außerdem zu einer starken Reduktion von SDHA, während Gapdh unverändert blieb (Abbildung 6, A). Die Bestimmung des $\Delta\psi$ durch eine TMRE-Messung zeigte, dass Oligomycin im Gegensatz zu Valinomycin nicht das $\Delta\psi$ inhibiert, sondern sogar leicht erhöht (Abbildung 6, B).

Diese Ergebnisse demonstrierten, dass die Pink1-Akkumulierung einen eher langsamen Prozess darstellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass ER-Stress keine Pink1-Induktion auslöst, jedoch durch den ATPase Inhibitor Oligomycin, auch ohne eine Reduktion des $\Delta\psi$, Pink1 akkumuliert.

5.1.4 Pink1-Akkumulierung in Cybrid Zellen

Die Pink1-Akkumulierung an der mitochondrialen Oberfläche wird durch mitochondrialen Schaden ausgelöst. Die Inhibierung der verschiedenen Atmungsketten-Komponenten zeigte jedoch, dass die Pink1-Akkumulierung nicht strikt in Reaktion zu $-\Delta\psi$ stattfindet (Abschnitt 5.1.3). Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden Rho⁰ Zellen auf ihr Pink1-Level untersucht (Abbildung 7). Rho⁰-Zellen enthalten keine funktionale mitochondriale DNA und können nur bedingt eine oxidative Phosphorylierung von ATP durchführen (Schubert et al. 2015). Als Pink1-Akkumulierungskontrolle wurden sowohl Rho WT-Zellen als auch Rho⁰ Zellen für 16 h mit Valinomycin kultiviert. Unter dieser Bedingung konnte Pink1 in beiden Zell-Typen mittels Western Blot nachgewiesen werden, jedoch mit einem starken Unterschied in der Signalintensität. Die Rho⁰ Zellen zeigten eine deutliche Verringerung des Pink1-Levels nach Behandlung mit dem Inhibitor. Korrespondierend dazu wurde ein schwächeres phospho-Ubiquitin (Ubiquitin-Ser65Pi) Signal detektiert, obwohl die mitochondriale Proteinmenge, dargestellt durch die MPP-Kontrolle, in allen Proben vergleichbar war (Abbildung 7, A).

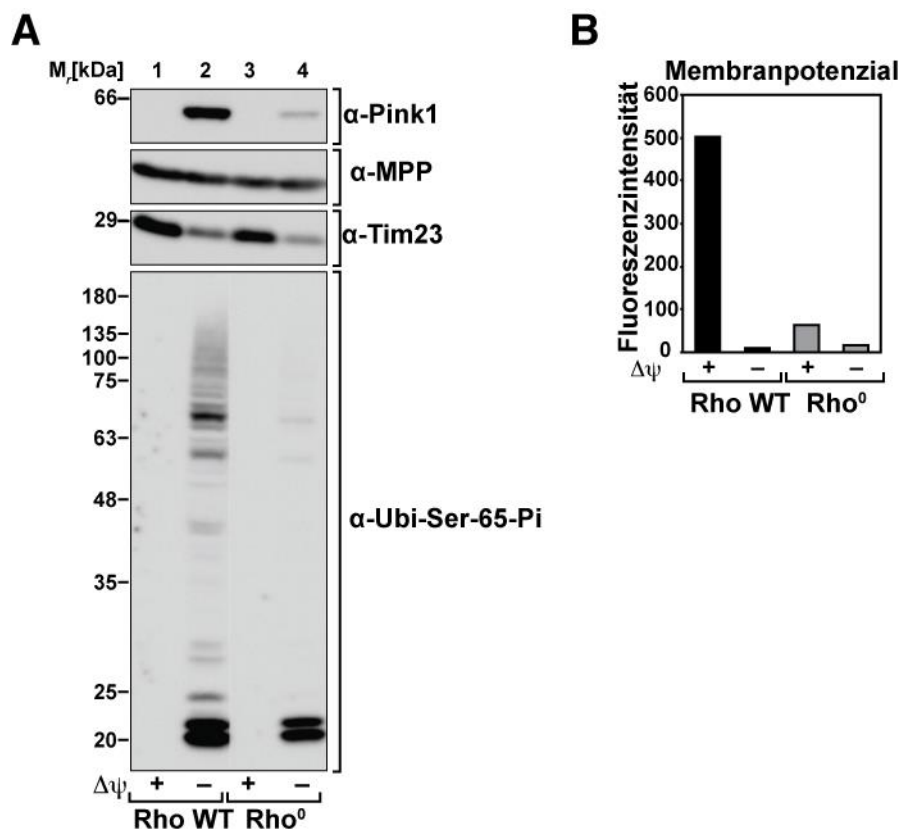


Abbildung 7: Effekt auf die Pink1-Akkumulierung in mitochondrialer DNA defekten Rho⁰ Zellen.

Rho WT und Rho⁰ Zellen wurden für 16 h mit Valinomycin behandelt gefolgt von: A) Zellyse und Analyse des Pink1-Niveaus durch Western Blot und Immundekoration. MPP Dekoration diente als mitochondriale Ladekontrolle, Tim 23 zur Visualisierung von Mitophagie. B) Quantifizierung der TMRE-Analyse von Rho WT und Rho⁰-Zellen nach 16 h Valinomycin-Behandlung mittels Durchflusszytometrie.

Auch das Membranpotenzial war in Rho⁰ Zellen deutlich verändert. Im Unterschied zu der behandelten Probe lag das Membranpotenzial im Vergleich zum WT deutlich reduziert vor (Abbildung 7, B). Diese Beobachtung spiegelte sich im Western Blot nicht wider. Hier war bei +Δψ wie im WT kein Pink1-Signal detektierbar.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Pink1 teilweise unabhängig des Membranpotenzials akkumuliert, welches durch die Atmungskettenkomplexe reguliert wird. Zudem weisen Rho⁰ Zellen generell weniger Pink1 auf, wodurch in diesem Zelltyp auch weniger Pink1-medierte Mitophagie ausgeführt werden kann, um geschädigte Mitochondrien abzubauen.

5.1.5 Proteinaggregate unabhängige Pink1-Induktion

Proteinaggregate stehen im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen (Chiti und Dobson 2017; Ross und Poirier 2004), wobei teilweise noch unklar ist, ob diese als Ursache oder als Begleitsymptom auftreten. Um den Einfluss von mitochondrialen und zellulärem Proteinstress bzw. zur Aggregation-tendierenden Proteine auf das Pink1-Level zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Aggregat-Typen genauer analysiert. Die Zellen wurden zum einen mit einem Konstrukt, das amorphe Aggregate bildet und zum anderen mit einem Konstrukt, welches amyloide Aggregate bildet, transfiziert und in der Anwesenheit oder Abwesenheit des Membranpotenzials untersucht.

Amorphe Aggregattypen werden unter Versuchsbedingungen durch das murine, zytosolische Protein Dihydrofolatreduktase (DHFR) ausgelöst. Hierzu wurden drei Punktmutationen (Cys7Ser, Ser42Cys und Arg49Cys), die dessen korrekte Faltung verhindern (Bruderek et al. 2018), in die DHFR-Sequenz eingebaut, sodass ein instabiles, zur Aggregation-tendierendes Protein entsteht (DHFR_{ds}; ds=destabilisiert). Zusätzlich wird das Konstrukt durch eine N-terminale Zielsequenz (Su9) mitochondrial exprimiert und über ein C-Terminal lokalisiertes mCherry visualisiert (mtDHFR_{ds}-mCherry). Das korrespondierende zytosolische Fusionskonstrukt (DHFR_{ds}-mCherry) und das nicht aggregierende mitochondriale Fusionsprotein (mtDHFR-mCherry) wurden als Kontrollen verwendet.

Amyloide Aggregate können unter Laborbedingungen über die Verwendung des Huntingtin Proteins induziert werden, das eine sich wiederholende Glutamin Aminosäuren Reihenfolge besitzt (Martindale et al. 1998). Die zur Aggregation führende Mutation weist eine häufige Abfolge der Aminosäure Glutamin (Q115) auf, die durch eine immer wiederkehrende Abfolge dreier Nukleotide kodiert wird. Die hier verwendeten Konstrukte waren sowohl i) ein mitochondrial lokalisiertes mit einer Su9-Zielsequenz (mtQ115) und ii) das zytosolische (cQ115) jeweils fusioniert mit mCherry. Als Kontrolle iii) wurde die nicht-aggregierende Variante mit der Su9-Zielsequenz und mit mCherry fusioniert (mtQ25).

Die Überlastung der mitochondrialen QC durch Proteinstress stellt einen mitochondrialen Stresszustand dar, welcher möglicherweise eine Pink1-Akkumulation auslösen kann. Aufgrund dessen wurden die Effekte der verschiedenen Konstrukte auf das Pink1-Level genauer untersucht. Dafür wurden

HeLa-Zellen für 48 Stunden transfiziert, anschließend lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

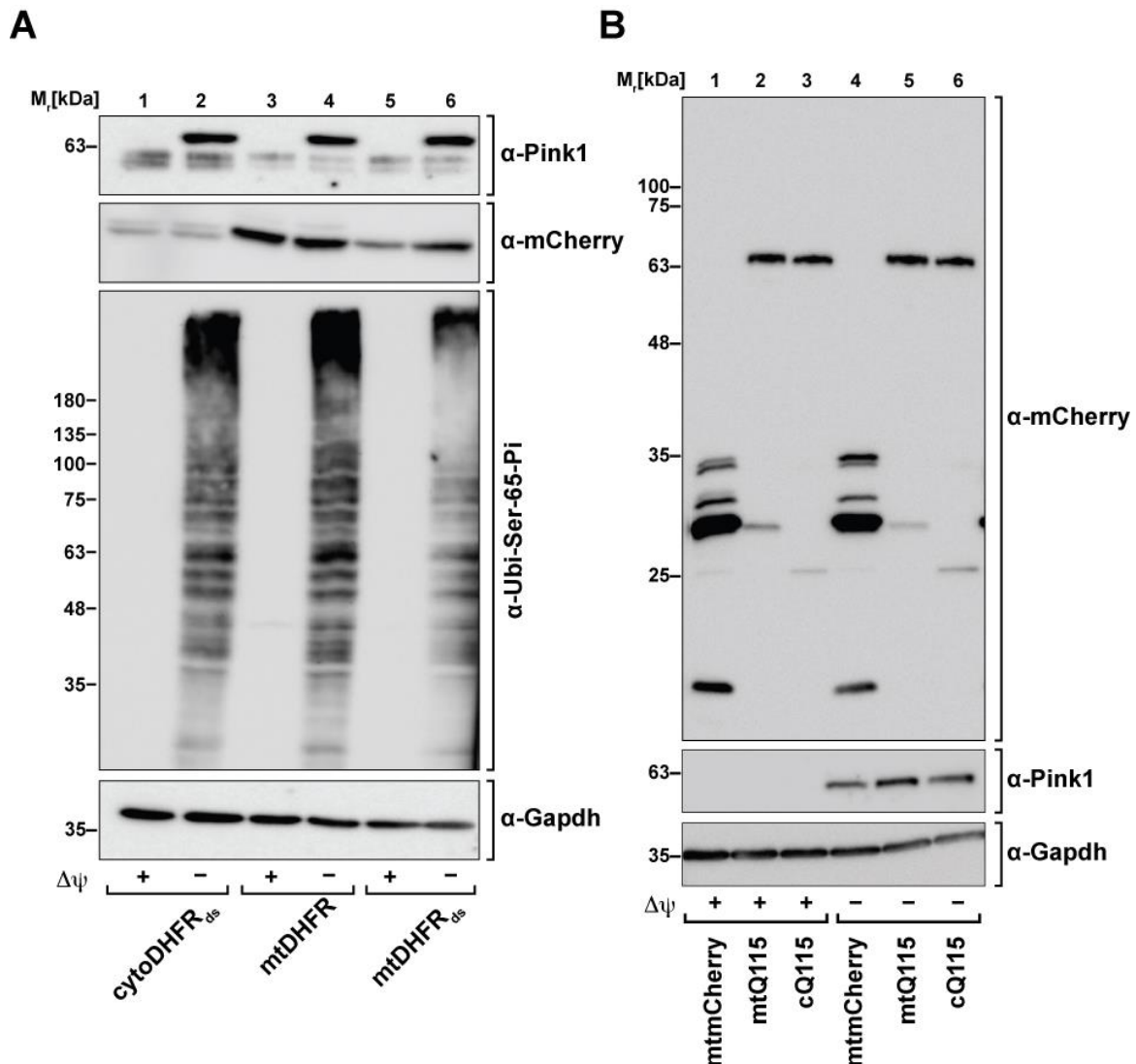


Abbildung 8: Effekt von Proteinstress auf Pink1.

(A) HeLa WT Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, welche zur Bildung von amorphen Aggregaten führen. Dafür wurde zum einem mit einem zytosolischen (cytoDHFRds), einem mitochondrialen (mtDHFRds) destabilem Konstrukt oder einem mitochondrialen stabilen Konstrukt (mtDHFR) transfiziert und mit CCCP inkubiert. Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. ds = destabilisiert; mt= mitochondrial. (B) HeLa WT Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, welche zur Bildung von amyloiden Aggregaten führen. Dafür wurde zum einem mit einem zytosolischen (cQ115) oder mit einem mitochondrialen (mtQ115) Konstrukt transfiziert und mit CCCP inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen außerdem mit mitochondrialem mCherry (mtmCherry) transfiziert. Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. C = zytosolisch; mt = mitochondrial. Gapdh diente als zelluläre Ladekontrolle.

Die Expression und korrekte Sublokalisierung der Fusions-Konstrukte konnte über die Detektion des mCherry Signals mittels Fluoreszenzmikroskopie bereits bestätigt werden (Pollecker et al. unpublished). Die DHFR-Fusionskonstrukte besitzen ein ähnliches Molekulargewicht von 45 kDa während das kurze mtQ25

Konstrukt im Vergleich zu den cQ115 und mtQ115 von ca. 60 kDa, mit ca. 30 kDa deutlich kleiner ist. Pink1-Signale konnten bei allen Proben, die zuvor mit CCCP behandelt wurden, mit einer vergleichbaren Intensität detektiert werden. Weder die Konstrukte, die zu amyloiden Aggregaten führen, noch die, die amorphen Aggregaten ausbilden, zeigten unter unbehandelten Bedingungen eine Pink1-Akkumulierung (Abbildung 8). Zusätzlich ist die Pink1-Proteinmenge zwischen den Aggregattypen und deren Kontrollen vergleichbar und nicht durch die mitochondrialen Aggregate erhöht. Daher scheinen mitochondriale Aggregate und der darauffolgende mitochondriale Stress keine Pink1-Akkumulierung auszulösen.

5.2 Abbau von Pink1

5.2.1 Regulierung des Pink1-Levels durch mitochondriale

Proteasen

Das aktuelle Modell der Pink1-Regulierung bezieht sich auf einen konstanten Pink1-Umsatz, bei welchem Pink1 konstitutiv exprimiert, importiert, prozessiert und anschließend abgebaut wird (Deas et al. 2011; Greene et al. 2012; Jin et al. 2010). Welche Protease hauptsächlich für den Abbau von Pink1 verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert. Zwei mögliche Proteasen, welche für die Regulierung des Pink1-Levels unter Kontroll- und Stressbedingungen verantwortlich sein könnten, sind die IMM-lokalisierte Protease Yme111 und die Matrix-lokalisierte Protease LonP1. Eine siRNA-medierte Herabregulation der Yme111 Expression zeigte keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Pink1, ebenso wenig auf dessen Aktivität, die sich im Phosphorylierungs-Verhalten von Ubiquitin widerspiegelt (Abbildung 9, A). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von CCCP nicht nur zur Pink1-Akkumulierung, sondern auch mitochondriale Proteine wie CoxIV, LonP1 oder Tim23 verringerten sich in ihrer Proteinmenge, während die zytosolische Ladekontrolle unverändert blieb.

Ein genetischer ‚*knockdown*‘ von LonP1 zeigte ebenfalls keine stärkere Akkumulierung der Pink1-Proteinmenge im Western Blot, sondern sogar eine verminderte (Abbildung 9, B). Somit regulieren weder die Protease Yme111 noch LonP1 die Pink1-Proteinmenge über dessen Abbau.

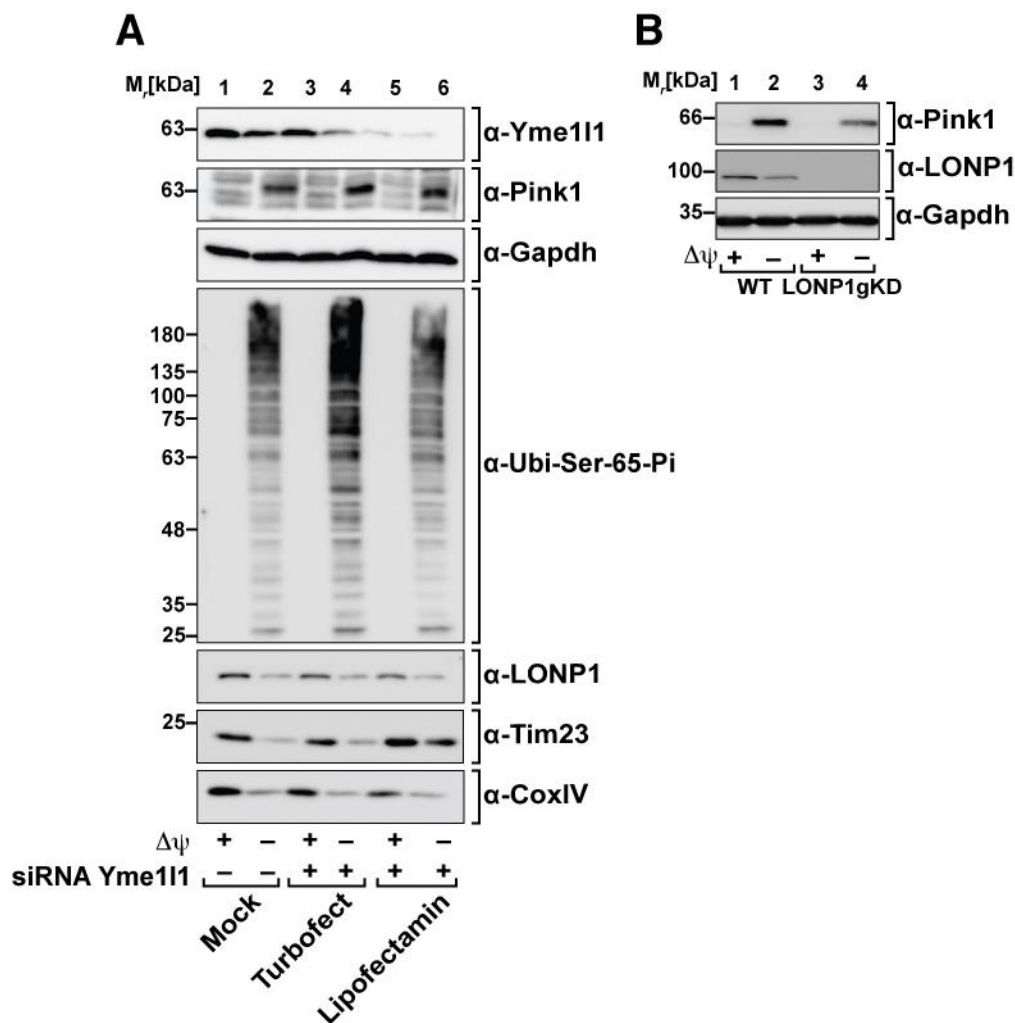


Abbildung 9: Effekt von der Depletion mitochondrialer Proteasen auf Pink1.

(A) siRNA-mediierter Knockdown der inneren mitochondrialen Membran lokalisierten Proteinase Yme111. Die Zellen wurden entweder mit Turbofect oder Lipofectamin transfiziert. HeLa WT Zellen wurden vor der Lyse für 16 h mit EtOH (Kontrolle) oder CCCP behandelt und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (B) Genomischer Knockdown der Matrix lokalisierten Proteinase LonP1 in HeLa WT Zellen. Zelllysate wurden nach einer 16-stündigen Inkubation mit EtOH (Kontrolle) oder CCCP mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

5.2.2 Regulierung des Pink1-Levels durch das Proteasom

Das aktuelle Regulierungsmodell von Pink1 suggeriert den Abbau der erfolgreichen importierten und prozessierten Pink1_P-Form bei +Δψ durch das Proteasom (Yamano und Youle 2013). Das Proteasom ist ein zytosolischer Proteinkomplex, der über seine multikatalytische Proteasefunktion die zum Abbau markierten Proteine abbaut (Budenholzer et al. 2017; Etlinger und Goldberg 1977). Wie bereits in Abbildung 4 B gezeigt, führte eine Inhibierung des Proteasoms durch MG132 zur Akkumulierung der Pink1_P-Form, allerdings zeigte diese keine phosphorylierende Aktivität durch den fehlenden Nachweis von phospho-Ubiquitin.

Pink1_{FL} dagegen akkumuliert nicht durch die Proteasominhibierung (Abbildung 10, A). Eine Quantifizierung der Pink1_{FL}- und Pink1_P-Signale zeigte zudem auf, dass die Proteinmenge nach CCCP-Behandlung nicht der nach Proteasominhibierung entsprach, sondern sogar um fast 50% reduziert war (Abbildung 10, B).

Da unter Normalbedingungen der partielle Import und die Prozessierung von Pink1 angenommen wird, stellte sich die Frage, ob das Voll-längen-Pink1_{FL} nach CCCP-Induktion und gleichzeitiger Inhibierung des Proteasoms stärker akkumuliert. Dafür wurden HeLa-Zellen für 0, 4, 8 und 24 Stunden jeweils mit CCCP oder gleichzeitig mit CCCP und MG132 behandelt und analysiert. Dabei konnte eine zeitlich verlaufende Akkumulation von Pink1 durch die CCCP-Behandlung allein detektiert werden (Abbildung 10, D-F). Die gleichzeitige Behandlung mit CCCP und MG132 führte zudem dazu, dass das Pink1-Signal nach einer Langzeitbehandlung durch MG132 etwas stärker akkumuliert, korrespondierend zu dessen Aktivität durch den Nachweis von phospho-Ubiquitin. Das mitochondriale Membranpotenzial war jedoch nicht durch die 24-stündige Behandlung von MG132 beeinträchtigt (Abbildung 10, C). Zusammenfassend zeigt sich, dass unter Normalbedingungen die Hemmung des Proteasoms nicht zur Akkumulation von Pink1_{FL} führt, sondern lediglich die prozessierte Form vom Proteasom abgebaut wird. Die Proteasom-inhibierende Chemikalie MG132 führt auch nach Langzeitbehandlung nicht zu Veränderungen des Membranpotenzials, jedoch eine zeitgleiche Behandlung mit CCCP und MG132 für 24 Stunden erhöht den Pink1_{FL}-Spiegel leicht und steigert dessen Aktivität.

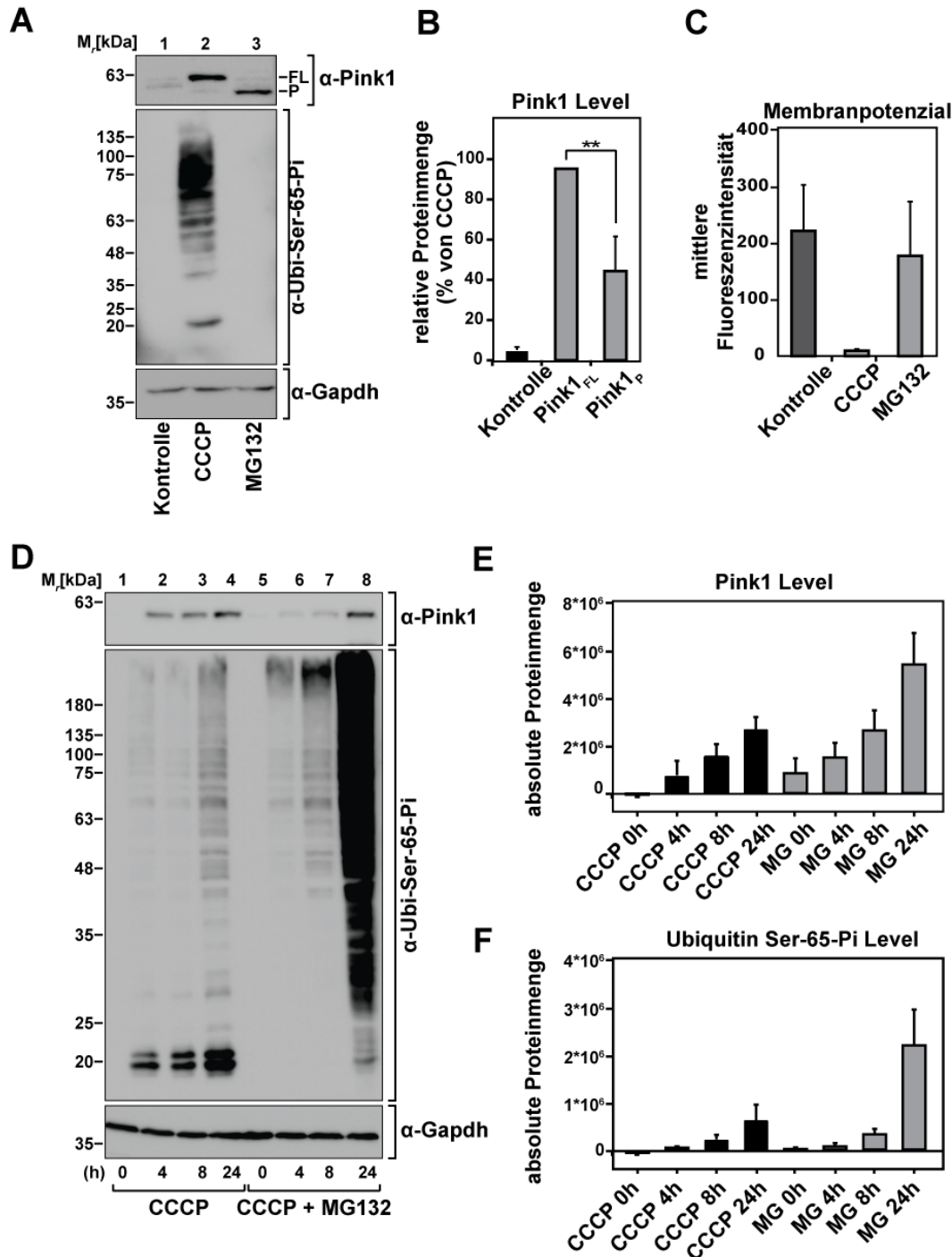


Abbildung 10: Effekt der Inhibierung des Proteasoms auf die Pink1-Akkumulierung.

(A) Pink1-Akkumulierung nach Proteasominhibierung. HeLa-Zellen wurden für 16 h mit DMSO/EtOH (Kontrolle); CCCP oder MG132 behandelt, lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (B) Quantifizierung des Pink1-Levels nach DMSO- (Kontrolle), CCCP- und MG132-Behandlung. Dargestellt wurde der Mittelwert und SEM von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$; $**p=7,2 \cdot 10^{-3}$). (C) TMRE Färbung zur Analyse des $\Delta\psi$ mittels Durchflusszytometrie von HeLa WT Zellen nach 16 h MG132-Behandlung ($n=3$; ns = nicht signifikant). (D) Zeitliche Analyse der Pink1-Akkumulierung nach CCCP und CCCP mit MG132-Behandlung. HeLa-Zellen wurden für 0, 4, 8 und 24 h mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt und anschließend lysiert. Pink1-Akkumulierung wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (E) Quantifizierung des Pink1-Levels und (F) Quantifizierung des phospho-Ubiquitin Levels nach CCCP oder CCCP und MG132-Behandlung ($n=3$). Um den zellulären Pink1-

Umsatz genauer zu überprüfen, wurde mittels CCCP in HeLa-Zellen die Pink1_{FL}-Akkumulierung für 16 Stunden induziert und anschließend mit Cycloheximid die Translation von neusynthetisierten Proteinen für unterschiedliche Zeitpunkte inhibiert (Abbildung 11).

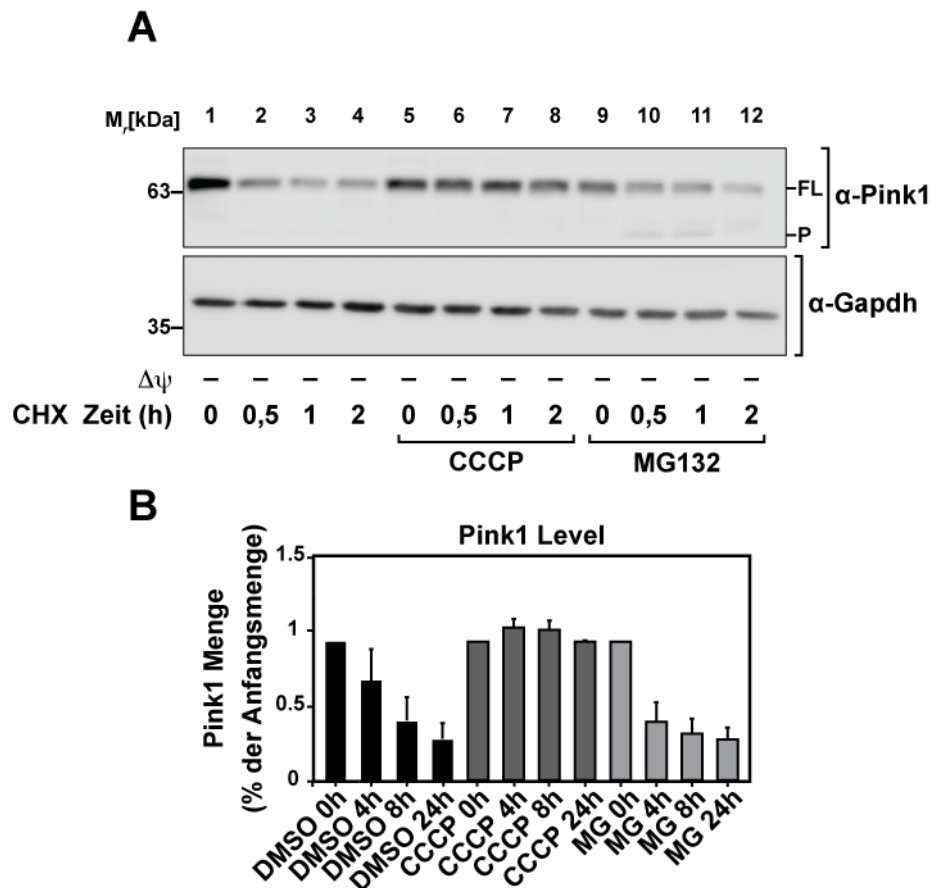


Abbildung 11: Degradation von endogenem Pink1.

(A) Pink1 wurde in HeLa WT Zellen für 16 h mit CCCP induziert. Anschließend wurde für die angegebenen Zeiträume die Translation mit Cycloheximide (CHX) inhibiert. Wo gekennzeichnet, wurden die Zellen zu der CHX-Behandlung zusätzlich weiterhin mit CCCP oder MG132 behandelt. (B) Quantifizierung des Pink1-Levels. Pink1-Level wurden gegen Gapdh normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert und SEM (n=3).

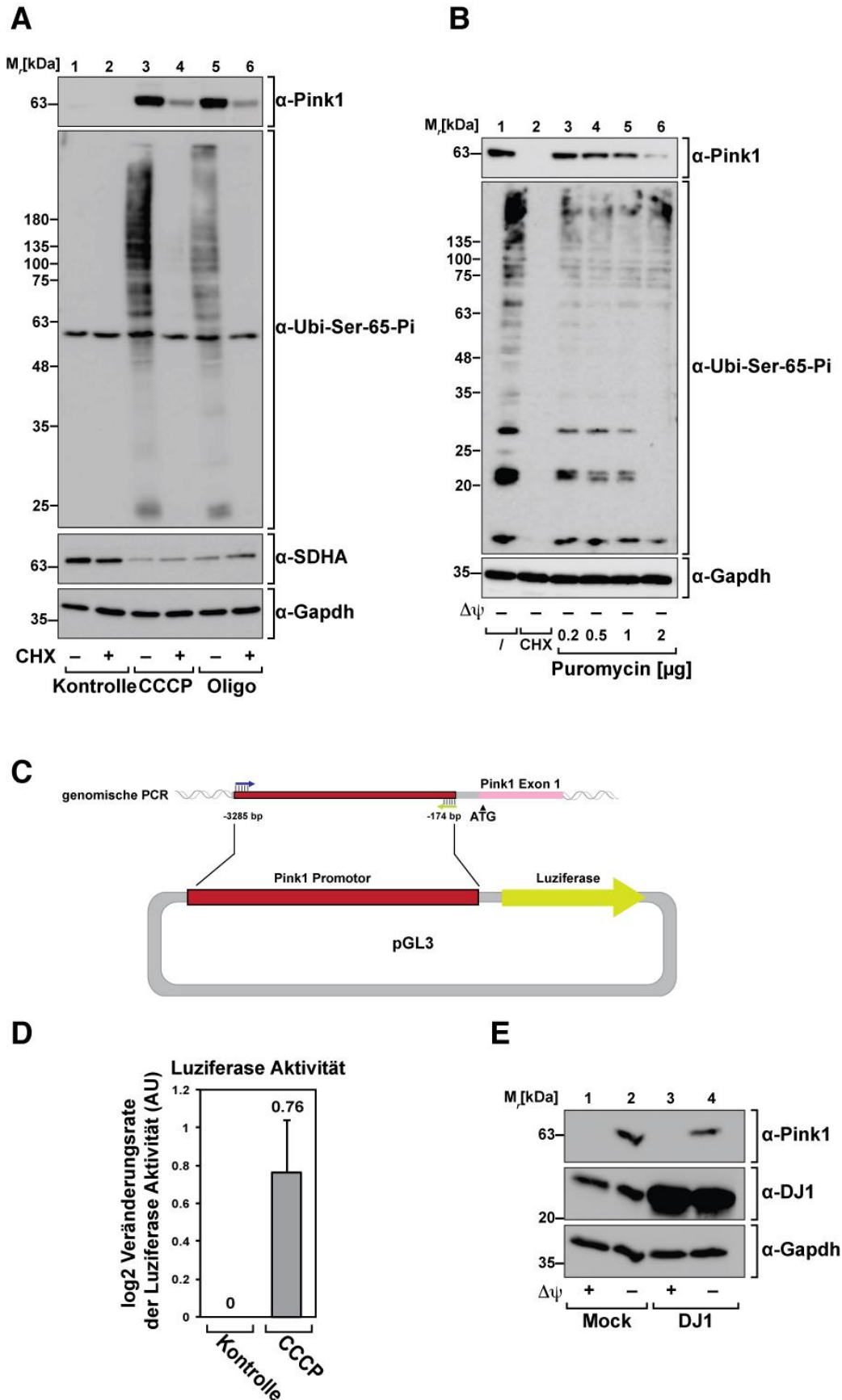
Über den Zeitraum von zwei Stunden nahm die Signalstärke von Pink1 um ca. 30 % ab. Eine simultane Behandlung mit CCCP und CHX führte dazu, dass das $\Delta\psi$ inhibiert und gleichzeitig die Protein-Neusynthese gehemmt wird. Das Ergebnis verdeutlicht, dass Pink1_{FL} während des dargestellten Zeitraums nicht abnahm, sondern auf einem konstanten Level verblieb. Die gleichzeitige Inhibierung des Proteasoms und der Proteinneusynthese führte dazu, dass eine geringe Menge Pink1_P über die Zeit akkumulierte und das Pink1_{FL}-Signal vergleichbar zur DMSO-

behandelten Kontrolle an Signalstärke abnahm. Diesbezüglich baut das Proteasom zumindest einen kleinen Anteil (Pink1_P) der Pink1-Menge in den zwei Stunden CHX-Behandlung ab. Die Depletion des $\Delta\psi$ durch CCCP führte zu einem Gleichgewicht der Pink1-Menge, das weder neusynthetisiert noch abgebaut wird.

5.2.3 Regulation der Pink1-Expression

Die durch mitochondrialen Stress induzierte Pink1-Akkumulierung scheint nicht vollständig über die Verminderung des Abbaus während der Mitophagie reguliert zu sein. Ein weiterer Abschnitt in der gesamten Proteinregulation bildet die Proteinexpression selbst. Aufgrund dessen wurde die Proteinbiosynthese von Pink1 weiterhin untersucht.

Wie im vorherigen Experiment gezeigt, entspricht die Umsatzrate von Pink1_P nicht der Menge von Pink1_{FL} (Abbildung 10, A und B). Um diesen Proteinmengenunterschied genauer zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von Pink1 näher betrachtet. Dafür wurde nach CCCP-Behandlung die Proteintranslation mit verschiedenen Inhibitoren gehemmt. Zunächst wurde die Elongation der Translation durch Cycloheximid (CHX) inhibiert und im Weiteren die Termination der Translation mit Puromycin.



(Beschriftung siehe Seite 58)

Abbildung 12: Effekte von Inhibitoren der zellulären Proteintranslation auf die Pink1-Expression.

(A) Effekt auf die Inhibierung der Elongation der Translation durch Cycloheximid. HeLa-Zellen wurden mit DMSO/EtOH (Kontrolle), CCCP, Oligomycin für 16 Stunden mit oder ohne die Anwesenheit von Cycloheximid kultiviert. (B) Effekt auf die Inhibierung der Termination der Translation durch Puromycin. HeLa-Zellen wurden mit CCCP und CHX oder Puromycin für 16 Stunden kultiviert. Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (C) Schematische Darstellung der Erstellung des Pink1 Promotor Plasmids. Pink1 Promotor Region (- 3285 bis -174 vor Pink1 kodierendem ATG) wurde mittels genomische PCR in das pGL3 basic Plasmid kloniert. Dieses kodiert keinen eigenen Promotor für die Luziferase. (D) Pink1 Promotor Analyse mittels Luziferase Assay. HeLa WT Zellen wurden mit einem Pink1 Promotor Plasmid transfiziert und mit CCCP/EtOH (Kontrolle) kultiviert. Über die Luziferase Lumineszenz wurde die Pink1-Expression analysiert. (E) Überexpression von DJ1, einem mutmaßlichem Transkriptionsfaktor für Pink1. HeLa WT Zellen wurden mit pCDNA DJ1 Plasmid transfiziert und mit DMSO/CCCP inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Wie in Abbildung 12 A dargestellt, akkumulierte Pink1 als mitochondriale Stressantwort auf die Behandlung mit den Inhibitoren CCCP und Oligomycin, jedoch war die Signalstärke nach zusätzlicher Behandlung mit CHX stark reduziert. Zudem war nicht nur die Proteinmenge von Pink1 nach CHX-Behandlung vermindert, auch dessen Aktivität in Form von der Phosphorylierung des Ubiquitins, gemessen als Ubi-Ser-65-Pi-Signal, war deutlich reduziert. Gleichzeitig war das SDHA-Signal nach Behandlung mit CCCP und Oligomycin verringert. Eine gleichzeitige Inkubation mit CCCP und Puromycin zeigte einen ähnlichen Effekt auf die Pink1-Proteinmenge (Abbildung 12, B). Nach Behandlung mit 2 µg Puromycin konnte ebenfalls eine Reduktion des Pink1-Levels und dessen Aktivität detektiert werden, wenn auch der Effekt etwas geringer ausfiel als durch die Behandlung mit CHX.

Auf Basis dessen konnte gezeigt werden, dass die stress-induzierte Pink1-Akkumulierung auf Expressionsebene zusätzlich reguliert wird. Deswegen wurde im Folgenden genauer untersucht, welcher Schritt der Proteinbiosynthese als Regulierungsebene für Pink1 agiert. Dafür wurde die Proteintranskription mittels Luziferase basierendem Promotor-Assay studiert, indem die Nukleotidsequenz des Pink1-Promotors in den Reportervektor kloniert und in HeLa-Zellen exprimiert wurde (Abbildung 12, C). Um die Pink1-Expression zu induzieren, wurde das $\Delta\psi$ der Zellen mittels CCCP-Behandlung ausgelöscht. Die Luziferaseaktivität wurde in den entsprechenden Zelllysaten in Form von Lumineszenz gemessen. Als Kontrolle wurde die Luziferaseaktivität gegen die co-transfizierte GFP-Fluoreszenz normalisiert. Nach CCCP-Behandlung der Zellen wurde im Vergleich zur DMSO

behandelten Probe, eine Erhöhung der Luziferaseaktivität um ~70% ermittelt (Abbildung 12, D). Die Erhöhung der Luziferaseaktivität entspricht in diesem Versuchsaufbau der Pink1-Expression und ist proportional zu dessen Menge. Schlussfolgernd zeigte sich, dass die Pink1-Akkumulierung über die Expression, beziehungsweise auf der transkriptionellen Ebene, ausgelöst wird.

Zur weiteren Analyse der Pink1-Regulierung wurde das *Parkinson disease protein 7* (DJ1) als ein möglicher Transkriptionsfaktor genauer betrachtet, da DJ1 in früheren Studien als ein mutmaßlicher Transkriptionsfaktor für Pink1 beschrieben wurde (Requejo-Aguilar et al. 2015). Eine Überexpression von DJ1 unter Kontrollbedingungen führte weder zu einer Pink1-Akkumulierung noch wurde ein erhöhtes Pink1-Signal nach $-\Delta\psi$ detektiert (Abbildung 12, E).

Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass die stress-induzierte Pink1-Akkumulierung zusätzlich über dessen *de novo* Synthese reguliert wird und DJ1 als möglicher Transkriptionsfaktor ausgeschlossen werden kann.

5.2.4 Zusammenfassung der Auswirkungen verschiedener zellulärer Inhibitoren

Im Zuge dieser Dissertation wurde mit Hilfe zellulärer Inhibitoren die Regulation von Pink1 untersucht. Zusammenfassend wurde durch die jeweiligen Inhibitoren folgendes in Bezug auf das Pink1-Level beobachtet:

Tabelle 2: Zelluläres Verhalten von Pink1 nach Zugabe verschiedener Inhibitoren

Substanz	Inhibition von:	Verhalten von Pink1
CCCP	mitochondriales Membranpotenzial ($\Delta\psi$)	Pink1 _{FL} akkumuliert stark
MG132	Proteasom	Pink1 _P akkumuliert schwach
Antimycin A	Komplex III der Atmungskette	Pink1 _{FL} akkumuliert stark
Oligomycin	Komplex V der Atmungskette	Pink1 _{FL} akkumuliert stark
Tunicamycin	Proteinreifung im ER	kein Pink1
CCCP+ CHX	Translation und $\Delta\psi$	weniger Pink1 _{FL} Akkumulierung
CCCP + Puromycin	Translation und $\Delta\psi$	weniger Pink1 _{FL} Akkumulierung

5.3 Herstellung und Charakterisierung der Pink1 KO-Zelllinie

Um nähere Aussagen über die Regulierung von Pink1 treffen zu können, wurde mittels CRISPR/Cas9 eine gerichtete Pink1 *knock-out* (KO) HeLa-Zelllinie generiert. Hierfür wurde eine Leitsequenz erstellt, die das Exon1 der Pink1-Gensequenz bindet, sodass dort zielgerichtet durch die Endonuklease Cas9 geschnitten wird (Abbildung 13, A). Der so generierte Doppelstrangbruch der DNA wird durch den zelleigenen Reparaturmechanismus geschlossen, welcher jedoch die herausgeschnittene Sequenz nicht reparieren kann, da keine Reparatursequenz vorliegt (Ran et al. 2013). Nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit einem Cas9-Plasmid, der die klonierte Leitsequenz enthält, wurden diese mit Puromycin selektiert und anschließend vereinzelt. Die vereinzelt Klone wurden auf die Anwesenheit des Pink1-Proteins mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Da Pink1 unter basalen Bedingungen nicht mittels Antikörperdetektion nachweisbar ist, wurden die Zellen vor der Lyse für 16 h mit CCCP behandelt. Somit konnte ein Klon bestimmt werden, der weder ein Pink1-Signal noch das Pink1-spezifische phospho-Ubiquitin aufwies (Abbildung 13, B). Gleichzeitig zeigte die Analyse von isolierten Mitochondrien nach CCCP-Behandlung des Pink1 KOs keine detektierbaren Signale nach der elektrophoretischen Auftrennung der nativen Proteinkomplexe über eine BN-PAGE (Abbildung 13, C). Diese Beobachtung bestätigt, dass der Pink1 KO keinen funktionalen Pink1-Komplex ausbilden kann. Eine Abbruch-PCR mit der genomischen DNA des Pink1 KO und Primern, welche das komplette Pink1 Exon 1 flankieren, zeigte zudem kein Signal für eine erfolgreiche Amplifizierung des Exon 1 in den Pink1 KO-Zellen im Vergleich zum WT (Abbildung 13, D).

Zusammenfassend konnte ein vollständiger Pink1 KO in HeLa-Zellen generiert werden, welcher auch die funktionalen Charakteristika von Pink1 unterbindet. So kann keine für die Mitophagie essenzielle Phosphorylierung des Ubiquitins

stattfinden und auch kein funktionaler Pink1-Komplex während der Mitophagie ausgebildet werden.

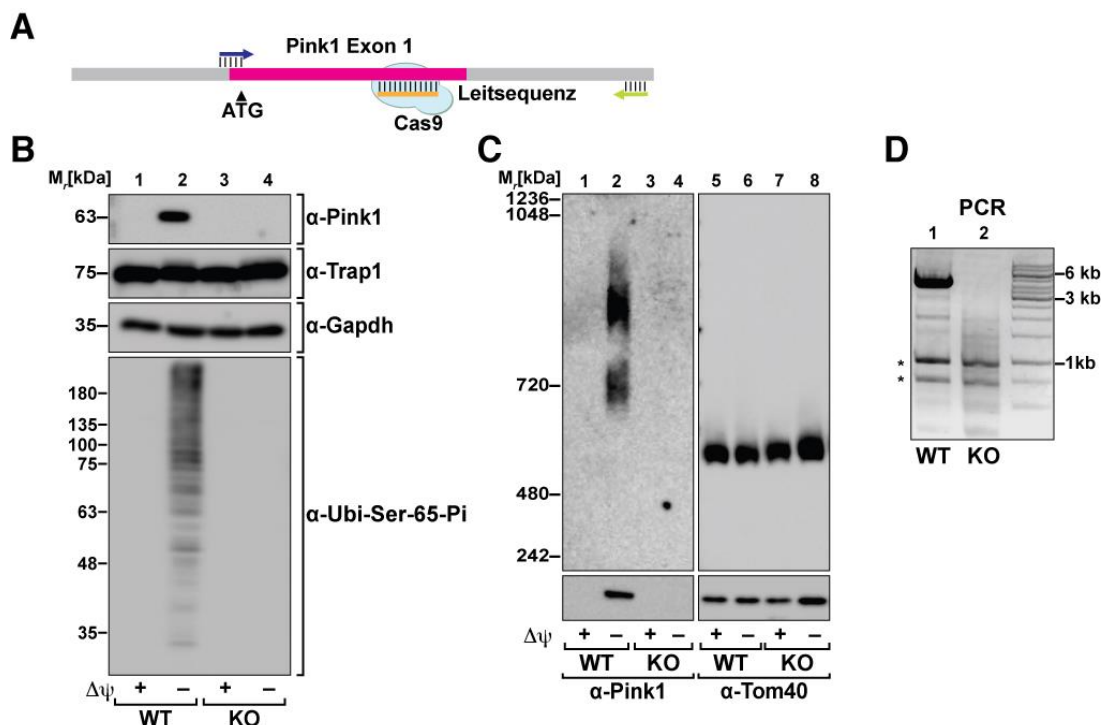


Abbildung 13: CRISPR/Cas9 vermittelter Pink1 Knockout.

(A) Schematische Darstellung der gezielten Modifizierung des Pink1 (*Park6*) Exon 1 mittels CRISPR/Cas. Die Leitsequenz (orange) bindet am Ende des Exon 1 (pink) und wird von der Endonuklease Cas9 (blau) erkannt, sodass zielgerichtet geschnitten wird. In lila und grün wurden die für (D) genutzten Sequenzierungsprimer dargestellt. (B) Analyse des Zelllysates von HeLa WT und Pink1 KO-Zellen, welches für 16 h mit EtOH/CCCP inkubiert wurde, mittels SDS-PAGE und Western Blot. Zur Bestätigung des Pink1 Knockouts wurde mit anti-Pink1 und anti-Ubi-Ser65Pi immunodekoriert, als Ladekontrolle diente anti-Gapdh. (C) Analyse von isolierten Mitochondrien von HeLa WT und Pink1 KO-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/CCCP mittels BN-PAGE/SDS-PAGE und Western Blot. (D) Gelelektrophorese einer Kontroll-PCR von genomischer DNA von HeLa WT und Pink1 KO-Zellen. Die in (A) schematisch dargestellten Sequenzierungsprimer flankieren einen Bereich von 4132 bp welcher mittels PCR in WT-Zellen amplifiziert werden kann.

5.3.1 Morphologie von Pink1 KO-Zellen

Für eine weitere Charakterisierung der Pink1 KO-Zellen wurde die Integrität des mitochondrialen Netzwerks mittels Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Abbildung 14). Als mitochondriales Markerprotein wurde die F1 β Untereinheit der ATP-Synthase verwendet. Das F1 β -Signal zeigte sowohl bei den WT als auch bei den Pink1 KO-Zellen unter Kontroll-Bedingungen ein gleichmäßiges tubuläres Netzwerk. Die nach Valinomycin-Behandlung typische Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks war sowohl in WT als auch in den Pink1 KO-Zellen sichtbar. Die Färbung von phospho-

Ubiquitin (Ubi-Ser-65-Pi) zeigte sich deutlich in den WT Zellen nach $-\Delta\psi$ durch Valinomycin, welche im Pink1 KO unter den gleichen Bedingungen nicht nachweisbar war. Allerdings war das detektierte phospho-Ubiquitin Signal nicht mitochondrial, sondern im gesamten Bereich der Zelle lokalisiert.

Die Integrität des mitochondrialen Netzwerks ist durch den Verlust von Pink1 unter Kontrollbedingungen nicht beeinflusst. Pink1 KO-Zellen weisen auch in der Immunfluoreszenz nach Valinomycin-Behandlung kein phospho-Ubiquitin Signal auf und entsprechen somit einem funktionalen Pink1 KO-Model.

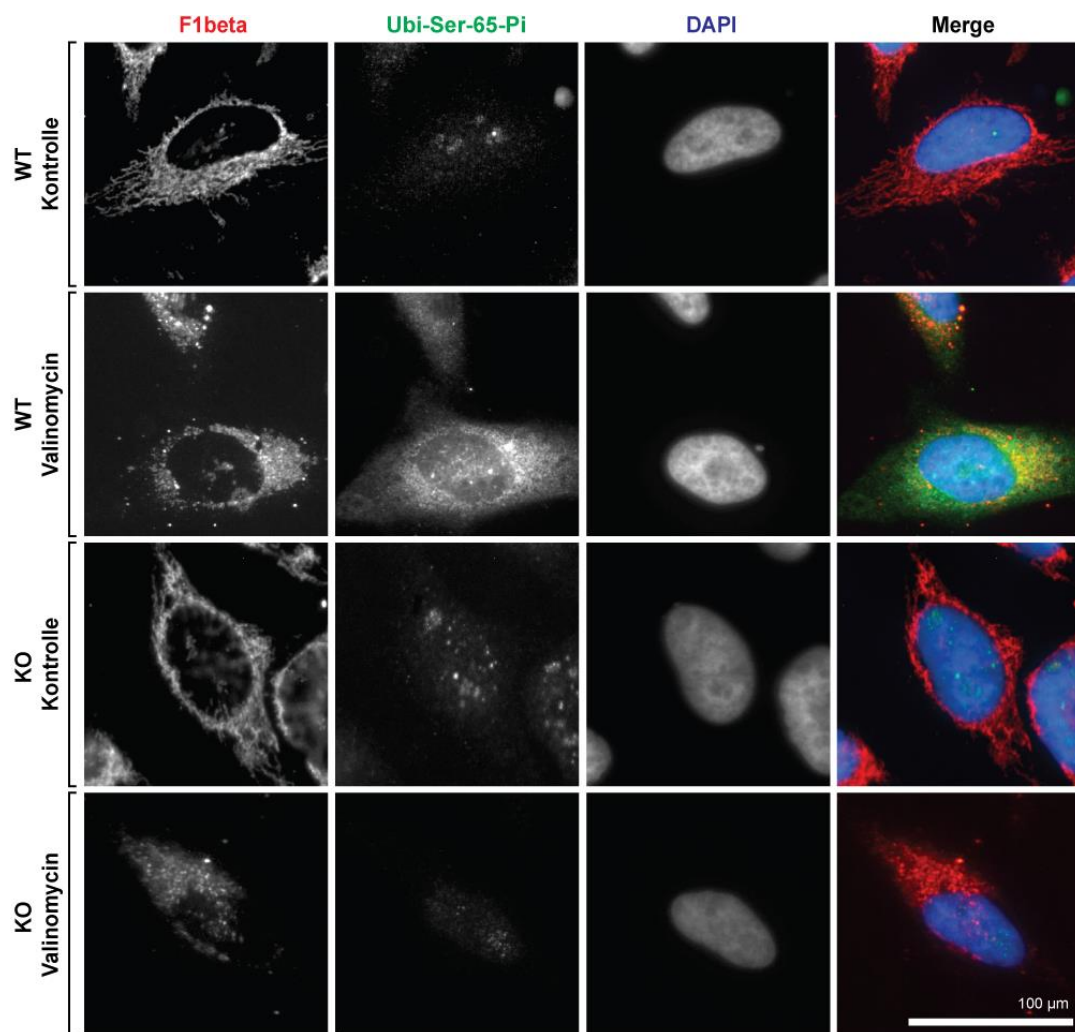


Abbildung 14: Morphologie der Pink1 Knockout Zellen.

Immunfluoreszenz-Analyse von fixierten HeLa WT und Pink1 KO-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/Valinomycin. Als Pink1 KO-Kontrolle wurden die Zellen mit anti-Ubi-Ser-65-Pi dekoriert (grün). Zusätzlich wurden die Zellen mit dem mitochondrialen Marker F1 β (rot) und der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt; Skala: 100 μ m.

5.3.2 Einfluss der Pink1 KO-Mutante auf mitochondriale Funktionen

Um den Einfluss eines Pink1 KO auf mitochondriale Funktionen zu untersuchen wurde zunächst das mitochondriale Membranpotenzial gemessen. Dafür wurden die Zellen mit dem positiv geladenen Farbstoff Tetramethylrhodaminmethylester (TMRE) gefärbt, da TMRE die Eigenschaft besitzt, bei einem intakten $\Delta\psi$ über die positive Ladung gerichtet in die Mitochondrien zu lokalisieren (Crowley et al. 2016). Als Negativkontrolle wurden die Zellen zuvor für 16 h mit Valinomycin behandelt und mittels Durchflusszytometrie vermessen. Die Messung der TMRE-Fluoreszenz zeigte, dass unter Kontrollbedingungen die Pink1 KO-Mutante signifikant weniger mitochondriales Membranpotenzial generiert als der WT. Der Effekt der vollständigen Inhibierung des Membranpotenzials durch Valinomycin war in den Pink1 KO-Zellen vergleichbar zum WT (Abbildung 15, A).

Als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung können ROS entstehen, welche mitunter mitochondrialen Stress und Zellschaden verursachen können (Murphy 2009). Um den ROS-Gehalt in der Pink1 KO-Mutante zu vermessen, werden die Zellen mit MitoSOX™ inkubiert, einem Farbstoff, der speziell durch Superoxidradikale oxidiert wird und dadurch fluoresziert. Der so in den Mitochondrien oxidierte fluoreszierende Farbstoff kann mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Menadion behandelt. Menadion ist ein Vitamin K-Derivat, das zur Produktion von Superoxidradikalen führt (Criddle et al. 2006). Unter Normalbedingungen zeigte die Vermessung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes keinen Unterschied zwischen WT und KO-Zellen. Nach Menadion-Behandlung wurde in den Pink1 KO-Zellen allerdings eine niedrigere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den WT-Zellen detektiert (Abbildung 15, B). Demnach reagieren die Pink1 KO-Zellen schwächer auf die Menadion-Behandlung und produzieren weniger Superoxidradikale als der WT, sind aber im unbehandelten Zustand nicht stressverändert.

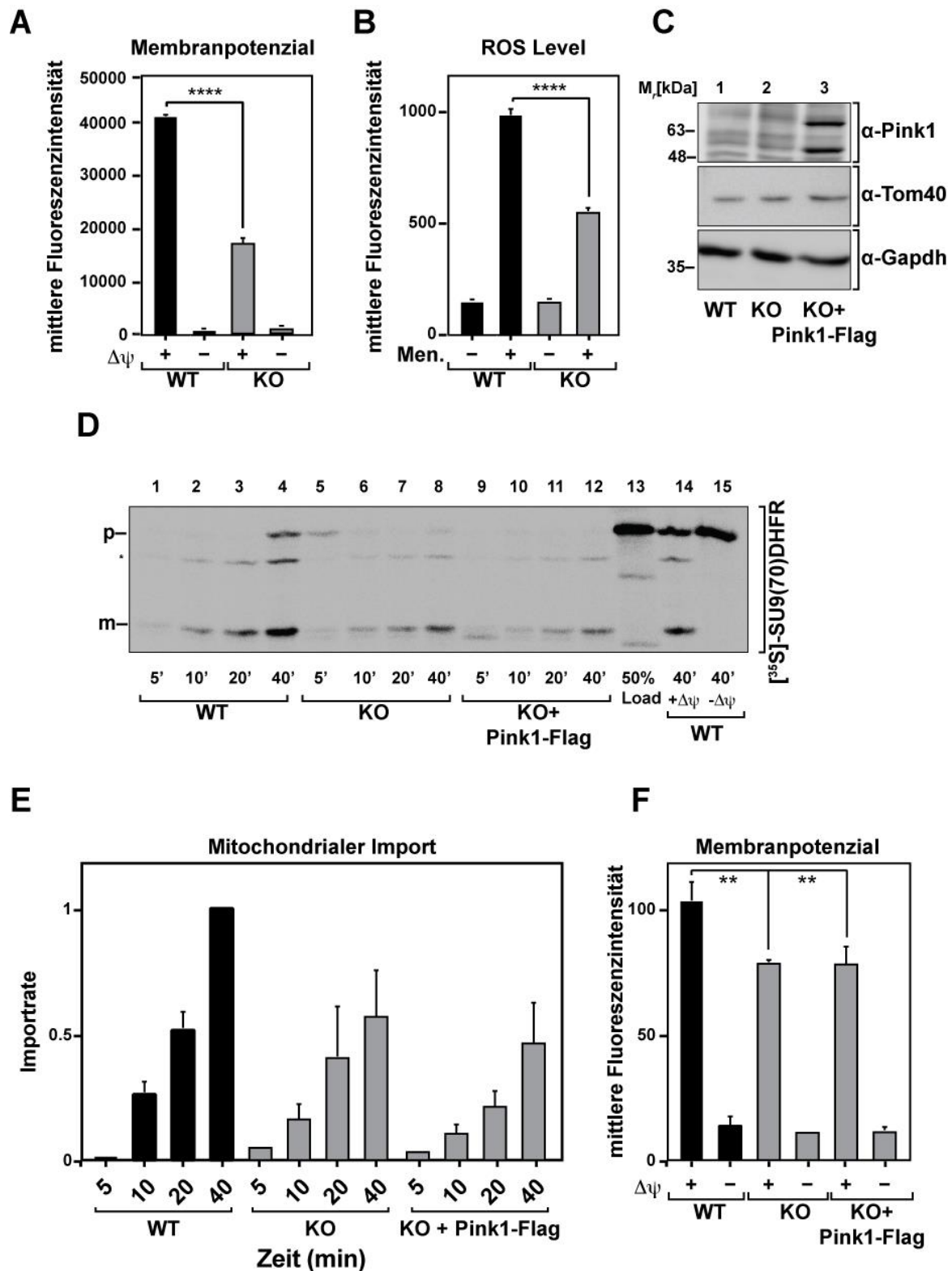


Abbildung 15: Analyse von mitochondrialem Membranpotenzial; ROS-Stress und Import-Verhalten im Pink1 KO.

(A) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials von WT (schwarz) und Pink1 KO-Zellen (grau) mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden zuvor mit dem positiv-geladenem Farbstoff TMRE gefärbt; als Negativkontrolle ($-\Delta\psi$) wurden die Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Valinomycin behandelt. Die Ergebnisse zeigen einen Mittelwert \pm SEM der TMRE-Emission in drei unabhängigen Experimenten ($n=3$); $****p=4,7 \cdot 10^{-5}$. (B) Bestimmung des ROS-Niveaus in WT (schwarz) und Pink1 KO-Zellen

(grau). Die Zellen wurden mit dem Mitochondrien-spezifischen Superoxid Farbstoff MitoSOX™ ROT Reagenz angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen zuvor für 20 min mit 100 µM Menadion inkubiert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert ± SEM der Emission von MitoSOX™ in drei unabhängigen Experimenten (n=3); ***p=1,7*10⁻⁴. (C) Transfektionskontrolle anhand eines Western Blots von den in (D) eingesetzten Zellen. Endogenes Pink1 im WT ist nicht detektierbar ohne Stimulus. (D) Ganzzell-Import des artifiziellen Präproteins Su9(70)DHFR in WT, Pink1 KO und Pink1 KO transfiziert mit Pink1-Flag. Zellen wurden mit Digitonin permeabilisiert und anschließend mit dem [³⁵S]-Met/Cys-markierte Su9(70)DHFR inkubiert. Der Import wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Nicht importiertes Protein wurde mit Proteinase K verdaut (Proben 1-12). Als Kontrollimport wurde in intakte (+Δψ) und importgehemmte (-Δψ) WT Zellen für 40 Minuten das Präprotein importiert (Proben 14 und 15). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und durch digitale Autoradiographie detektiert. Load: Eingesetzte Menge des Präproteins. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit C. Runz durchgeführt. (E) Analyse der Importrate von drei unabhängigen Versuchen (n=3) von HeLa WT, Pink1 KO und Pink1 KO transfiziert mit Pink1-Flag. Dargestellt ist die Importrate über die Zeit, der Zeitpunkt t=40 min der WT Zellen wurde dabei auf 1 gesetzt und der Mittelwert ± SEM dargestellt. (F) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials von WT (schwarz), Pink1 KO-Zellen (hellgrau) und Pink1 KO-Zellen transfiziert mit Pink1-Flag (hellgrau) mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden zuvor mit dem positiv-geladenen TMRE-Farbstoff gefärbt; als Negativkontrolle (-Δψ) wurden die Zellen mit 1 µM Valinomycin behandelt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert ±SEM der TMRE Emission in drei unabhängigen Experimenten (n=3); **p<5*10⁻³.

5.3.3 Reduzierter *in vivo* Proteinimport von [³⁵S]-markierten Reporterprotein in Pink1 KO Zellen

Mitochondrien besitzen zwar ihr eigenes Genom, kodieren jedoch von den über 1500 mitochondrialen Proteinen lediglich 13 selbst (Anderson et al. 1981). Die restlichen nuklear kodierten Proteine müssen nach der zytosolischen Translation in die Mitochondrien importiert werden. Sind Zellen geschädigt, insbesondere das Δψ, welches die treibende Kraft des mitochondrialen Imports ausmacht, können Proteine schlechter oder nicht vollständig importiert werden und akkumulieren als mitochondriale Präproteine im Zytosol. Da ein funktionierender Proteinimport für eine physiologisch intakte Zelle von essentieller Bedeutung ist, wurde dieser für die in Abbildung 15, A bereits beschrieben, membranpotenzialveränderte Pink1 KO-Ziellinie genauer betrachtet. Zusätzlich wurde exogenes Pink1-Flag in die Pink1 KO-Zellen transfiziert, um einen möglichen Wiederherstellungs-Effekt zu messen. Zunächst wurden von jeder Kondition 500.000 Zellen mit Digitonin permeabilisiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen jeweils mit einem AVO-Mix inkubiert, um den mitochondrialen Import effizient zu blocken (-Δψ). Anschließend wurden die radioaktiv-markierten Reporterproteine für die angegebenen Zeiträume importiert. Nicht importierte Proteine (Präprotein, p) wurden mittels Proteinase K (PK)-Verdau abgebaut (Abbildung 15, D).

In allen drei Konditionen (WT, Pink1 KO und Pink1 KO wiederhergestellt mit Pink1-Flag) konnte das Reporterprotein in Zeitabhängigkeit importieren. Allerdings zeigte die Pink1 KO-Mutante eine geringfügig verlangsamte Importrate im Vergleich zum WT (Abbildung 15, E). Vergleichsweise war nach 40-minütiger Inkubation im Pink1 KO lediglich ~50% des Reporterproteins importiert. Zudem zeigte eine Pink1-Flag Überexpression in der Pink1 KO-Mutante keinen Wiederherstellungs-Effekt auf die verminderte Importrate der Mutanten. Eine Membranpotenzialmessung durch TMRE verdeutlichte, dass eine Pink1-Flag Überexpression in den Pink1 KO-Zellen keinen Einfluss auf das verminderte $\Delta\psi$ hat und nicht das ursprüngliche WT $\Delta\psi$ anpassen kann (Abbildung 15, F).

Aufgrund dessen scheint die reduzierte Importrate in der Pink1 KO-Mutante eine Folge des erniedrigten Membranpotenzials zu sein, die durch exogenes Pink1-Flag nicht wiederhergestellt werden kann.

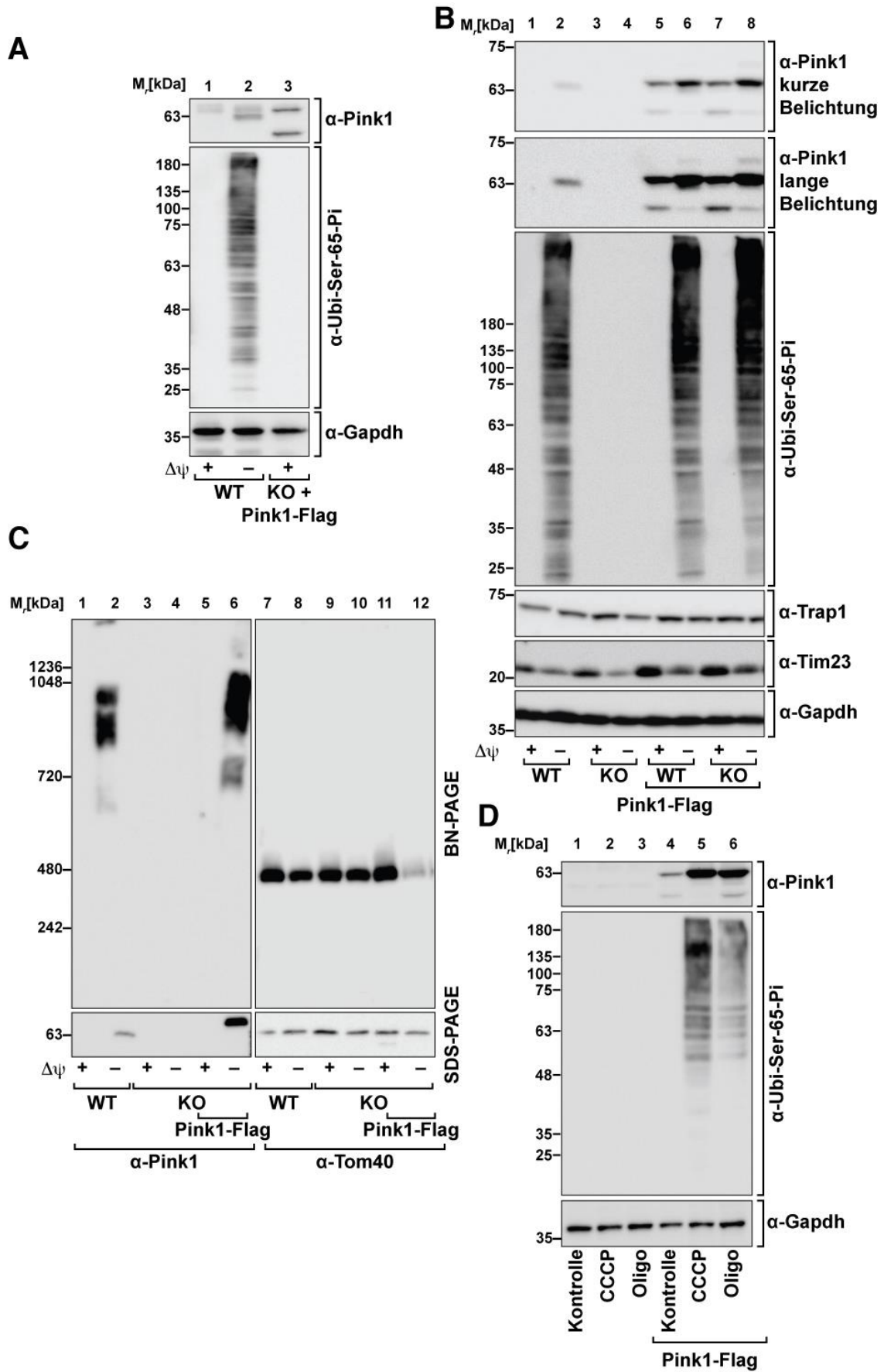
5.3.4 Wiederherstellung der Pink1 KO-Mutanten mit exogenem Pink1

Eine Pink1 KO-Zelllinie ist durch das Fehlen von Pink1 beeinträchtigt, geschädigte Mitochondrien für den autophagischen Abbau vorzubereiten. Die verminderte Regulierung geschädigter Mitochondrien hat langfristige Folgen auf die Zellhomöostase, sodass sich ein Knockout Zell-Modell besonders gut eignet, um Pink1-vermitteltes Parkinson besser zu verstehen und gegebenenfalls anhand von zellulären Veränderungen frühzeitig zu erkennen.

Da wie zuvor bereits erwähnt eine Pink1-Flag Überexpression im Pink1 Knockout keinen Effekt auf dessen Importverhalten und $\Delta\psi$ zeigte, wurden Zellysate mittels SDS-PAGE und Western Blot nochmals näher betrachtet. Hierbei wurde untersucht, welchen Einfluss das exogene Pink1-Flag auf Proteinebene einnimmt. Die Pink1-Flag Überexpression führt im Western Blot zu zwei detektierbaren Banden. Eine Bande mit höherem Molekulargewicht entspricht Pink1_{FL} und die andere mit niedrigerem Molekulargewicht die der Pink1_P-Form. Jedoch liefen beide Formen aufgrund des Flag-Tags auf einem etwas höheren Molekulargewicht als die endogenen Pink Formen. Dabei zeigte sich, dass eine Pink1-Überexpression im Pink1 KO keine Aktivität in Form der Phosphorylierung von Ubiquitin aufwies

(Abbildung 16, A). Um auszuschließen, dass das Überexpressionskonstrukt keinen zellulären Effekt auf die Induktion von Mitophagie aufweist, wurden die Zellen nach der Transfektion zusätzlich mit CCCP behandelt. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot konnte eine vergleichbare Pink1-Aktivität, in Form des phospho-Ubiquitins Signals, zwischen WT und KO ermittelt werden (Abbildung 16, B). Nach Auflösung des $\Delta\psi$ akkumulierte hauptsächlich Pink1_{FL}, sowohl im KO als auch im WT. Das exogene Pink1-Flag zeigte somit nach mitochondrialem Stress in Form von Aufhebung des $\Delta\psi$ eine funktionale Aktivierung. Um festzustellen, ob das exogene Pink1 auch den funktionalen Pink1-Komplex in den Pink1 KO-Zellen ausbildet, wurden für die jeweiligen Konditionen die Mitochondrien isoliert und über eine BN-PAGE analysiert (Abbildung 16, C). WT Zellen bilden nach CCCP-Behandlung einen HMW (engl.: *high molecular weight*)-Komplex, welcher das endogene Pink1 inkorporiert. In isolierten Mitochondrien von Pink1 KO-Zellen mit Pink1-Flag Überexpression ($-\Delta\psi$) konnte ebenfalls der typische HMW-Komplex von Pink1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die korrespondierende SDS-PAGE kein Pink1-Signal in der Pink1 KO mit Pink1-Flag Überexpressionsprobe im unbehandelten Zustand. Des Weiteren wurde untersucht, ob das exogene Pink1, ebenso wie das endogene Pink1, $\Delta\psi$ -unabhängig in der Anwesenheit von Oligomycin aktiviert wird. Dafür wurden Pink1 KO-Zellen mit Pink1-Flag transfiziert und für 16 h mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Es konnte bestätigt werden, dass ebenso wie das endogene Pink1, das exogene Pink1-Flag nach Oligomycin stärker akkumulierte und ebenfalls aktiv war, dargestellt durch das phospho-Ubiquitin-Signal (Abbildung 16, D).

Zusammenfassend konnte die Pink1 KO-Mutante mit einem exogenen Pink1-Konstrukt wiederhergestellt werden, allerdings nur nach Pink1-induzierenden, mitochondrialem Stress (siehe dazu Kapitel 5.1.3). Das überexprimierte Pink1_{FL}-Flag ist somit unter Kontrollbedingungen weder funktional, noch formt es einen an den Mitochondrien lokalisierten Komplex.



(Beschriftung siehe Seite 70)

Abbildung 16: Pink1-Wiederherstellung in Pink1 KO-Zellen.

(A) CCCP-behandelte Zelllysate von HeLa WT und Pink1-Flag transfizierte Pink1 KO-Zellen, die mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden. (B) HeLa WT und Pink1 KO wurden jeweils mit Pink1-Flag transfiziert und mit EtOH oder CCCP behandelt. Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (C) Analyse von isolierten Mitochondrien von HeLa WT, Pink1 KO und Pink1 KO-Zellen transfiziert mit Pink1-Flag nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/CCCP mittels nativer Gelelektrophorese (BN-PAGE) /SDS-PAGE und Western Blot. (D) Pink1 KO-Zellen und Pink1 KO-Zellen mit Pink1-Flag transfiziert, wurden nach 16-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren lysiert. Zelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

Um zu bestätigen, dass das exogene Pink1 nur nach einem Stimulus die typische Pink1 Funktionalität einnimmt, wurden Pink1-Flag transfizierte Pink1 KO-Zellen mit CCCP behandelt und fixiert. Diese konnten anschließend mittels Immunfluoreszenz analysiert werden. Da das Pink1-Flag Plasmid GFP-coexprimiert konnten transfizierte Zellen mittels GFP-Fluoreszenz erkannt werden und spezifisch nach dem Wiederherstellungs-Effekt des exogenen Pink1-Flag untersucht werden (Abbildung 17). Pink1 KO-Zellen, die Pink1-Flag positiv waren, zeigten im nichtbehandelten Zustand eine normale, physiologische Morphologie des mitochondrialen Netzwerks, welches anhand der mitochondrialen Kontrollen F1 β (Abbildung 17, A) oder HSP60 (Abbildung 17, B) sichtbar war. Diese Zellen wiesen in der Immunfluoreszenz kein Signal für das Pink1-spezifisch phosphorylierte Ubiquitin auf. Nach Valinomycin-Behandlung fragmentierte das mitochondriale Netzwerk und phospho-Ubiquitin Signal war detektierbar. Das exogene Pink1-Flag Signal war unter Kontrollbedingungen nicht an den Mitochondrien detektierbar, sondern vielmehr punktuell im Zytosol verteilt. Nach der Valinomycin-Behandlung jedoch, konnte das Pink1-Flag an den Mitochondrien lokalisiert detektiert werden. Auch in der Immunfluoreszenz-Analyse konnten die vorangegangenen Ergebnisse aus Abbildung 16, dass das exogene Pink1-Flag hauptsächlich aktiviert und an den Mitochondrien lokalisiert vorliegt, nachdem die Zellen mit einem Inhibitor behandelt wurden, zusätzlich bekräftigt werden.

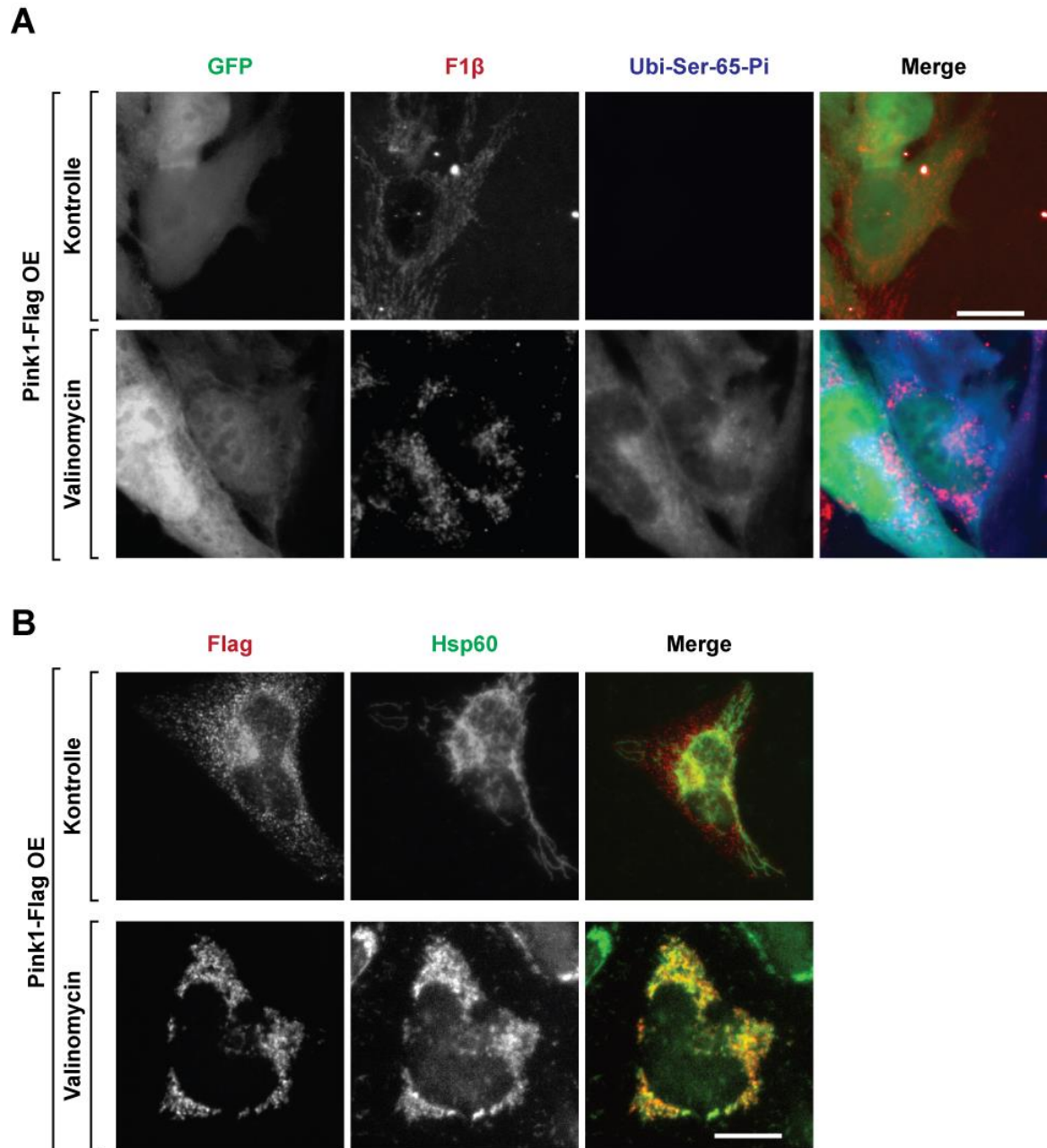


Abbildung 17: Morphologisches Verhalten von exogenem Pink1-Flag.

Immunfluoreszenz-Analyse von fixierten und mit Pink1-Flag transfizierten Pink1 KO-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/Valinomycin. (A) Durch die GFP co-expression wurden Pink1-Flag positive Zellen detektiert (grün). Zusätzlich wurde die Aktivität von Pink1-Flag mit anti-Ubi-Ser-65-Pi (blau) und als mitochondrialer Marker F1 β detektiert (rot). (B) Das exogene Pink1-Flag wurde mittels anti-Flag (rot) visualisiert. Als mitochondrialer Marker wurden die Zellen mit Hsp60 angefärbt (grün); Skala: 50 μ m.

5.5 Identifikation von PINK1 Interaktoren mittels SILAC Immunpräzipitation

Die meisten Analysen zu Interaktionspartnern von Pink1 und dessen Komplexpartner, die zusammen mit Pink1 möglicherweise den HMW-Komplex ausbilden, wurden unter Normalbedingungen durch eine Immunpräzipitation des überexprimierten Pink1 durchgeführt (Geisler et al. 2010; Rakovic et al. 2011; Weihofen et al. 2008). Wie zuvor jedoch dargestellt, bildet Pink1 erst nach mitochondrialem Schaden dessen aktive Form aus, die zur Induktion der Mitophagie führt. Um die Fragestellung nach den Interaktionspartnern von Pink1 genauer zu adressieren, wurden sowohl Interaktionspartner von Pink1 unter Kontrollbedingungen, als auch nach 16-stündiger Inkubation mit CCCP analysiert. Dafür wurden Pink1 KO-Zellen in unterschiedlichen SILAC-Medien (supplementiert mit leichten, mittleren oder schweren Aminosäuren) kultiviert und mit Pink1-Flag oder Mock transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit DMSO oder CCCP für 16 h behandelt und nativ lysiert. Die Proteinmenge der Lysate wurde mittels Bradford bestimmt und zu gleichen Teilen auf die anti-Flag-Agarose verteilt. Über die anti-Flag Agarose wurden die Pink1-Flag Komplexe isoliert und anschließend über Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 18, A). Die Mock Probe diente als Kontrollansatz, um Hintergrundbindungen durch Proteininteraktionen mit der Flag-Agarose zu identifizieren. Diese Werte wurden für die weitere Analyse sowohl von der DMSO als auch von der CCCP-Probe subtrahiert.

Um die erfolgreiche Pink1-Flag Affinitätsaufreinigung zu bestätigen, wurde die Isolation des Pink1-Flags über Western Blot in der Elutionsfraktion verifiziert (Abbildung 18 ,B). Als Negativkontrolle diente Gapdh, welches nicht an der anti-Flag Agarose bindet und dementsprechend fast vollständig im Überstand (DF= Durchfluss) detektierbar war.

Nach der massenspektrometrischen Analyse der Proben, wurden die Daten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel weiter analysiert. Dabei wurde zunächst die Abundanz der Mock Proben von den DMSO und CCCP behandelten Proben der Messung korrespondierend subtrahiert. Falls nach Mock-Korrektur ein negativer Wert oder generell keine Abundanz gemessen wurde, wurde zur

weiteren Auswertung mit einer Minimalabundanz (80000 für DMSO und 25000 für CCCP) gerechnet. Anschließend wurden die DMSO Triplikate und CCCP Triplikate untereinander jeweils nach der höchsten Abundanz von Pink1 normalisiert. Weiterhin wurde zur Darstellung ein Anreicherungsquotient zwischen den CCCP- und DMSO-Abundanzen berechnet und zur Vereinfachung als \log_2 -fold change dargestellt. Dieser wurde in den aufgeführten Auswertungen zur Interpretation und Visualisierung der Daten herangezogen.

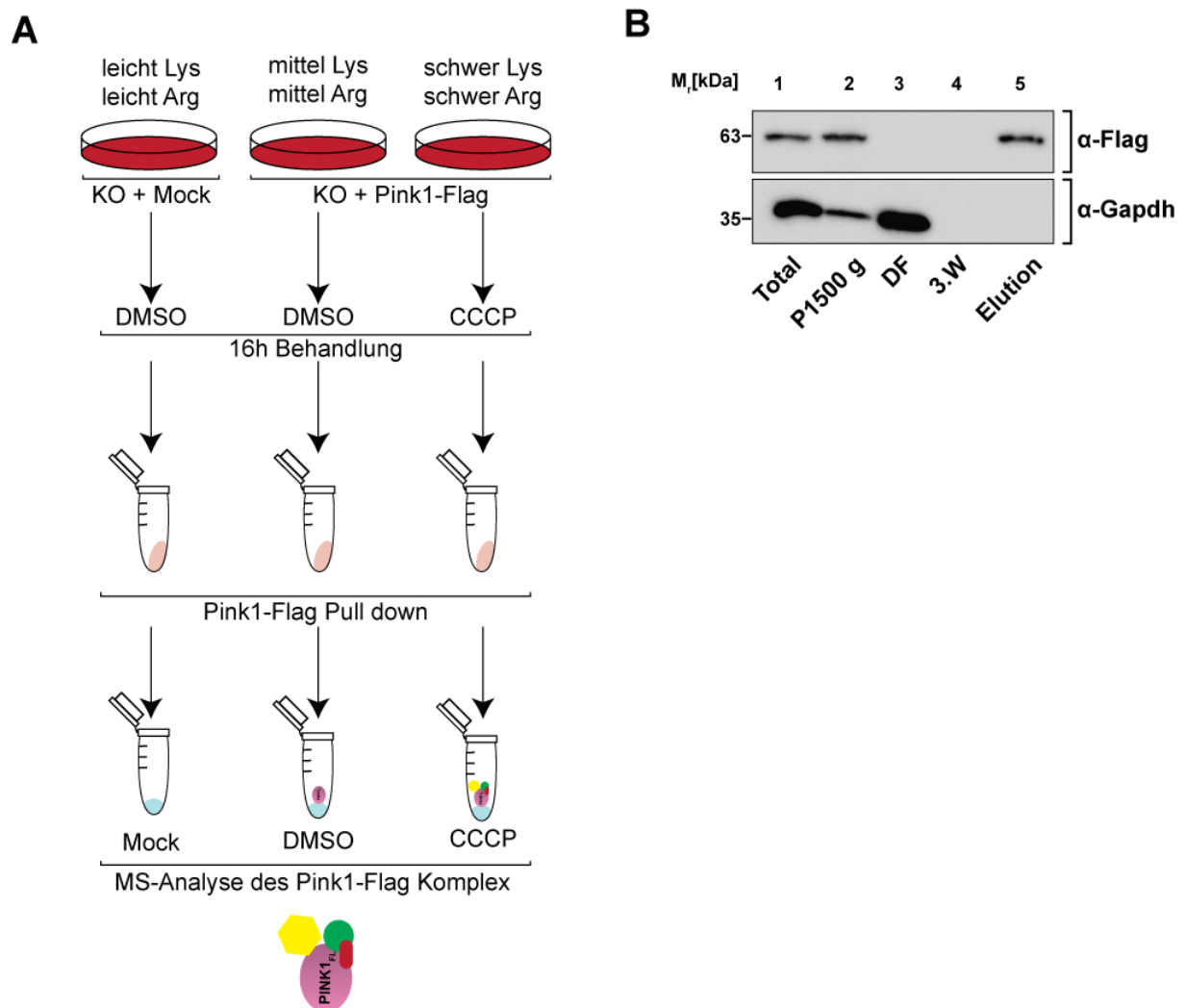


Abbildung 18: Arbeitsablauf für die quantitative massenspektrometrische Analyse des Pink1-Komplexes

(A) Schematischer Arbeitsablauf für die Untersuchung der Bindepartner von Pink1 in Zellen mit und ohne mitochondrialen Stress. Pink1 KO-Zellen wurden in SILAC Medium mit unterschiedlich schweren Lysin- und Arginin-Isotopen kultiviert. Nach der Transfektion mit Pink1-Flag/Mock wurden die Zellen für 16 h mit CCCP/EtOH (Kontrolle) behandelt und anschließend lysiert. Der native Pink1-Flag komplex wurde mittels Flag-Trap Agarose gebunden, eluiert und mittels quantitativer MS analysiert. (B) Aufreinigung von Pink1-Flag mit intaktem $\Delta\psi$. Kontroll-Analyse zur Pink1-Flag Aufreinigung mittels SDS-PAGE und Western Blot. Total, Pellet nach 1500 g Zentrifugation, Durchfluss (DF), letzte Waschfraktion (3.W) und Eluat (Elution) wurden nach Pink1-Flag analysiert. Gapdh diente als Kontrolle.

Insgesamt wurden ~680 Proteine identifiziert, die mit Pink1-Flag interagieren. Aufgrund der technischen Durchführung des Versuchs, wurden alle identifizierten nuklearen Histone aus der weiteren Analyse exkludiert, da eine Interaktion zwischen Pink1 und dieser Proteingruppe durch die Lokalisation in der Zelle ausgeschlossen werden kann. Nach Abzug der ermittelten Mock-Abundanz erhielten ca. 140 Proteine sowohl in der DMSO, als auch in der CCCP-Gruppe eine negative Abundanz, sodass kein Anreicherungsquotient gebildet und diese ebenfalls für den weiteren Verlauf der Datenanalyse ausgeschlossen wurden. Demnach wurde mit ca. 530 Proteinen die weitere Analyse durchgeführt. Von den 530 identifizierten Proteinen hatten insgesamt ca. 360 Proteine einen Anreicherungsquotienten kleiner als 0, was auf eine affinere Bindung zu DMSO-behandelten Pink1 hinweist und ca. 170 Proteine größer als 0 und somit affiner mit dem CCCP-behandelten Pink1. Zusätzlich konnten ca. 60 Proteine nur nach DMSO-Behandlung identifiziert werden und ca. 25 Proteine nur nach CCCP-Behandlung. Für diese Proteine konnte ebenfalls kein Anreicherungsquotient gebildet werden, jedoch stellt gerade diese Proteingruppe mögliche reale Interaktionspartner dar und sind gesondert gelistet (Tabelle 3 und Tabelle 4 zeigen eine Auswahl der gefundenen Proteine, vollständige Tabelle s. beigefügte Excel Blatt 4 und 5). In der Tabelle 3 und Tabelle 4 sind zum einen die Namen und Uniprot ID gelistet, aber auch die zelluläre Lokalisierung der identifizierten Proteine. Zur weiteren Analyse wurde der log₂ des Medians der Proteinabundanz von Proteinen, die nur in einer Kondition gefunden wurden, aufgeführt und die Abundanz von Pink1 (fett) zum Vergleich mitgelistet. Zusätzlich ist aufgeführt, ob die gefundenen Proteine bereits in der Biogrid Datenbank als potenzielle Pink1-Interaktoren gelistet wurden.

Auffällig war, dass Myosin-Proteine, die zu der Gruppe der Zytoskelettproteine gehören, die höchste Abundanz aufwiesen und somit stark affin an Pink1 unter Kontrollbedingungen binden. Außerdem wurden zwei mitochondriale Proteine mit einer ähnlichen Abundanz wie Pink1 detektiert. Zum einen das OMM Protein Sam50 und zum anderen das OMM Protein Pgam5. Auf letzteres wird im Zuge dieser Arbeit noch näher eingegangen (siehe Kapitel 5.6 Pink1 und Pgam5).

Tabelle 3: Auszug der identifizierten Proteine, die ausschließlich nach DMSO-Behandlung binden.

Angegeben sind Name, Uniprot ID, Beschreibung und intrazelluläre Lokalisation (Lok.), der log2(Abundanz) des Medians und die Übereinstimmung mit der Biogrid Datenbank. ZSK= Zytoskelett, Z= Zytosol, N= Nukleus, M= Mitochondrien, ER= endoplasmatisches Retikulum und „Andere“. F= gefunden (engl.: *found*) oder N= nicht gefunden

Name	Uniprot ID	Beschreibung	Lok.	log2 Median Abundanz	Biogrid
MYH9	P35579	Myosin-9	ZSK	33,297	F
MYO1C	O00159	Unconventional myosin-1c	ZSK	28,872	F
MYO1E	Q12965	Unconventional myosin-1e	ZSK	28,565	N
MYH10	P35580	Myosin-10	ZSK	28,503	F
DBN1	Q16643	Drebrin	Z	27,993	F
MYO1F	O00160	Unconventional myosin-1f	ZSK	27,821	N
PGAM5	Q96HS1	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	M	26,768	F
PINK1	Q9BXM7	Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	M	26,699	F
MYO1B	O43795	Unconventional myosin-1b	andere	26,555	F
LMNB1	P20700	Lamin-B1	N	26,339	F
SAM50	Q9Y512	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	M	25,752	F
TMOD3	Q9NYL9	Tropomodulin-3	ZSK	25,642	N
MPRIP	Q6WCQ1	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	ZSK	25,582	F
ILF2	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	N/Z	25,564	N

Die in Tabelle 4 gelisteten Proteine, die nur nach CCCP-Behandlung detektiert wurden, zeigen eine diversere Gruppierung, die sich hauptsächlich aus zytosolischen, zytoskelett und nuklearen Proteinen zusammensetzt.

Tabelle 4: Identifizierte Proteine, die ausschließlich nach CCCP-Behandlung binden.

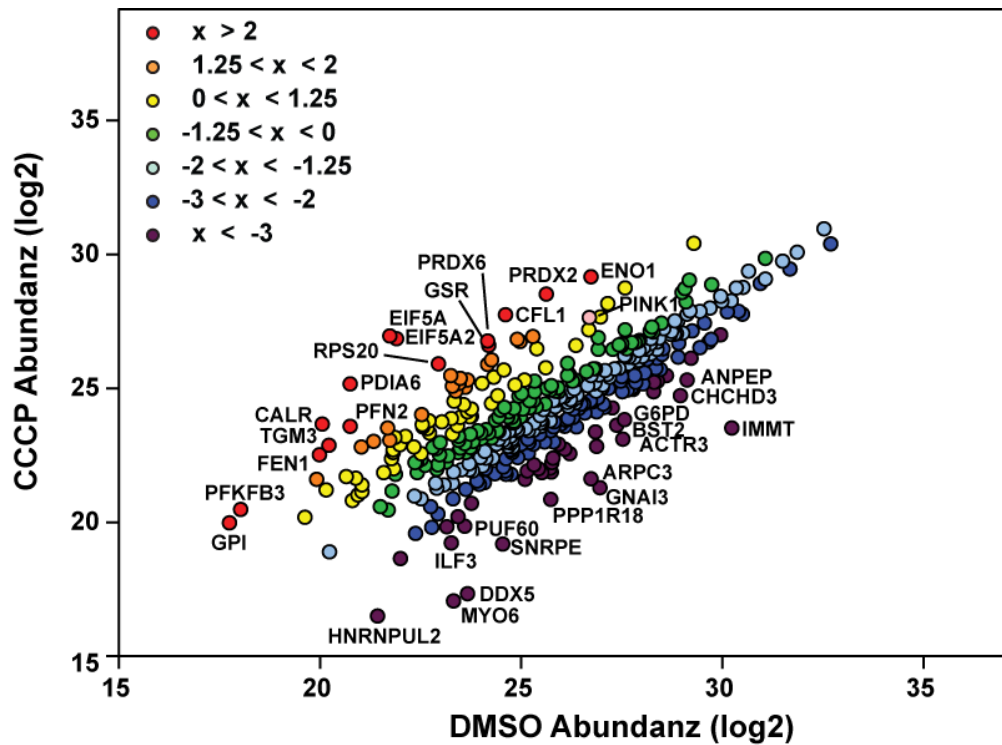
Angegeben sind Name, Uniprot ID, Beschreibung und intrazelluläre Lokalisation (Lok.), der log2(Abundanz) des Medians und die Übereinstimmung mit der Biogrid Datenbank. ZSK= Zytoskelett, Z= Zytosol, N= Nukleus, M= Mitochondrien, ER= endoplasmatisches Retikulum und „Andere“. F= gefunden (engl.: *found*) oder N= nicht gefunden

Name	Uniprot ID	Beschreibung	Lok.	log2 Median Abundanz	Biogrid
EIF4B	P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Z	27,400	F
PINK1	Q9BXM7	Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	M	27,652	F
PPM1B	O75688	Protein phosphatase 1B	Z	25,804	N
RBM10	P98175	RNA-binding protein 10	ER	25,705	N

Ergebnisse

ARG1	P05089	Arginase-1	Z	24,677	N
CSRP2	Q16527	Cysteine and glycine-rich protein 2	N	24,268	N
NME2P1	O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase	andere	24,072	F
TPM3	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	ZSK	23,995	N
BLMH	Q13867	Bleomycin hydrolase	Z	23,646	N
LDHA	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	Z	23,377	F
TPM1	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	ZSK	23,330	N
ITPRID2	P28290	Protein ITPRID2	Z	23,082	N
EIF5AL1	Q6IS14	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	Z	23,007	N
ARPC1B	O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	ZSK	22,960	N
FYN	P06241	Tyrosine-protein kinase Fyn	ZSK	22,814	N
SERPIN B12	Q96P63	Serpin B12	Z	22,521	N
YWHAG	P61981	14-3-3 protein gamma	andere	22,425	F
CDC42	P60953	Cell division control protein 42 homolog	andere	22,257	N
IDH1	O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	andere	21,997	N
RBM5	P52756	RNA-binding protein 5	N	21,573	N
LUZP1	Q86V48	Leucine zipper protein 1	N	21,306	F
ENO2	P09104	Gamma-enolase	Z	21,303	F
TUBB6	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	ZSK	21,173	F
TWF1	Q12792	Twinfilin-1	ZSK	20,731	N

Die Affinitätsänderung der identifizierten Pink1-Interaktionspartner nach CCCP-Behandlung wurde mittels Dot-Blot, welcher den Änderungsquotienten der jeweiligen Proteine darstellt, visualisiert (Abbildung 19). Anhand des Änderungsquotienten wurden die Proteine in sieben verschiedene Gruppen unterteilt (Abbildung 19). Diese zeigten zusammenfassend folgende Verteilung der Änderungsrate: 15 Proteine waren stark angereichert (rot) und 18 Proteine waren nach CCCP-Behandlung um das 2-fache angereichert (orange). Unter Kontrollbedingungen (DMSO) hingegen binden 42 Proteine (lila) stark affin, 89 Proteine (dunkelblau) waren mindestens um das Zweifache angereichert, 125 Proteine waren leicht angereichert (hellblau). 56 Proteine (gelb) und 105 Proteine (grün) zeigten eine relative Mengenveränderung von + 1,25 bis -1,25 und binden nur leicht stärker oder schwächer nach CCCP-Behandlung an Pink1-Flag. Pink1-Flag selbst weist nach CCCP-Behandlung einen Änderungsquotienten von 0,95 auf (hier in der Farbe Pink) und ist somit um fast das Doppelte angereichert.



Verteilung der log2 Ratios (CCCP/DMSO)

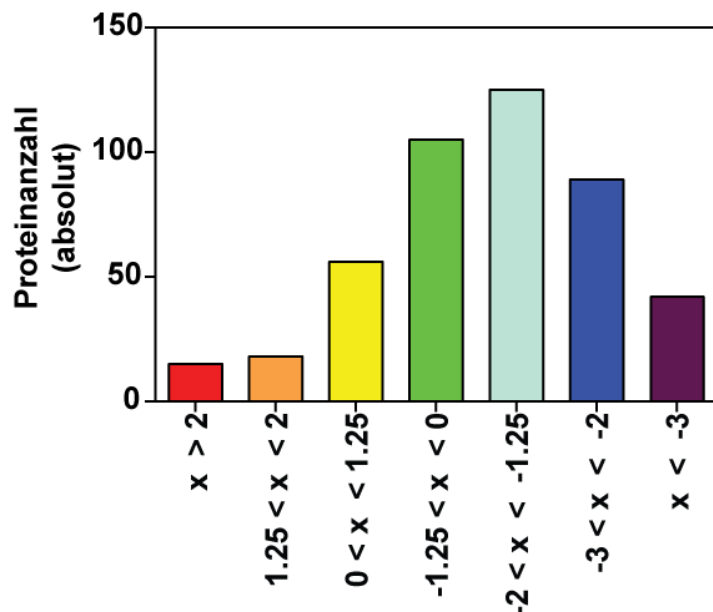


Abbildung 19: Affinitätsveränderung von Pink1-Interaktionspartnern nach CCCP-Behandlung.

Änderung der Proteinabundanz (log₂) der gebundenen Pink1-Interaktoren in quantitativer MS Analyse in Pink1-Flag überexprimierten Pink1 KO-Zellen nach CCCP-Behandlung. Zellen wurden in SILAC-Medium kultiviert. Das Verhältnis der Proteinabundanz wurde in Relation zur DMSO-behandelten Proteinabundanz kalkuliert. 15 Proteine zeigten eine sehr starke Affinität zu Pink1 (rot), 18 Proteine eine starke (orange) nach CCCP-Behandlung. 56 Proteine (gelb), 105 Proteine (grün) und 125 Proteine (hellblau) galten als unverändert bis leicht erhöht in sowohl CCCP als auch DMSO-behandelten Zellen. 89 Proteine (dunkelblau) waren affiner zu Pink1 nach DMSO-Behandlung, 42 Proteine (lila) sogar sehr stark affin. Ausgeschlossen aus dieser Verteilung sind alle Proteine, die exklusiv in einer der beiden Konditionen gemessen wurden und sind als Liste beigefügt.

Da Pink1 einen Proteinkomplex an den Mitochondrien nach CCCP-Behandlung ausbildet, wurde nicht nur die Proteingruppe näher betrachtet, die ausschließlich nach CCCP detektiert wurde, sondern auch Proteine mit einem Änderungsquotienten von $> \log(2)$ (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Identifizierte Proteine, die nach CCCP-Behandlung mit einer $\log(2)$ Verhältnis größer als 2 binden.

Angegeben sind Name, Uniprot ID, Beschreibung und intrazelluläre Lokalisation (Lok.), der \log_2 (Abundanz) des Medians. ZSK= Zytoskelett, Z= Zytosol, N= Nukleus, M= Mitochondrien, ER= endoplasmatisches Retikulum und „Andere“.

Name	Uniprot ID	Beschreibung	Lok.	\log_2 Median Abundanz
EIF5A	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Z und N	26,969
EIF5A2	Q9GZV4	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	Z	26,872
PDIA6	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	ER	25,179
CALR	P27797	Calreticulin	ER	23,675
CFL1	P23528	Cofilin-1	N	27,769
RPS20	P60866	40S ribosomal protein S20	Z	25,935
PRDX2	P32119	Peroxiredoxin-2	Z	28,527
PFN2	P35080	Profilin-2	ZSK	23,588
TGM3	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Z	22,887
PRDX6	P30041	Peroxiredoxin-6	andere	26,779
FEN1	P39748	Flap endonuclease 1	M	22,530
PFKFB3	Q16875	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	Z	20,489
ENO1	P06733	Alpha-enolase	Z	29,175
GSR	P00390	Glutathione reductase, mitochondrial	M	26,605
GPI	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	Z	19,989
RCC2	Q9P258	Protein RCC2	N	25,490

Die gelisteten Proteine aus Tabelle 5 bilden durch ihren Änderungsquotienten nach CCCP-Behandlung eine Proteingruppe, die besonders affin mit Pink1 bindet. Zusammen mit der Proteingruppe, welche ausschließlich nach CCCP-Behandlung detektiert wurde, bilden diese potenzielle Kandidaten, die in der Komplexformierung während mitochondrialem Stress beteiligt sind.

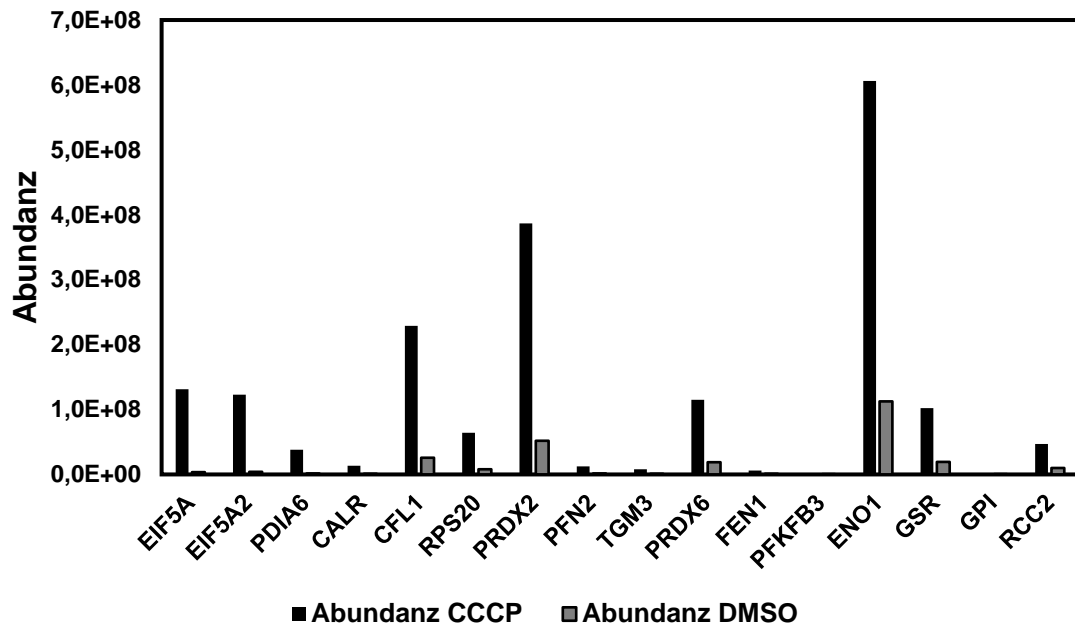


Abbildung 20: Vergleich der Proteinabundanz der identifizierten Proteine mit einem Anreicherungsquotienten $\log(2)$ größer als 2.

Die Abundanz der Proteine mit einem Anreicherungsquotienten $\log(2)$ größer als 2 wurden vergleichsweise zwischen DMSO- und CCCP-Behandlung dargestellt. Schwarz stellt die Abundanz der CCCP-Behandlung und grau nach DMSO-Behandlung des jeweiligen Proteins, dar.

Unter Stressbedingungen waren besonders stark Translationsinitiationsfaktoren (z.B. EIF4B, EIF5A, EIF5A2), aber auch Translationelongationsfaktoren wie EEF1A2, EEF1B2 und EEF1D angereichert. Ebenso auch ENO1 und ENO2 als Komponenten der Glykolyse.

Zur weiteren Analyse der identifizierten Proteinpartner nach der quantitativen massenspektrometrischen Analyse wurden alle gefundenen Proteine mit einem Änderungsquotienten kleiner als -1 für die Kontrollbedingungen und größer als +1 nach mitochondrialem Stress durch CCCP untersucht. Die identifizierten Proteine wurden mittels der Datenbank Uniprot anhand ihrer intrazellulären Lokalisation kategorisiert (Abbildung 21).

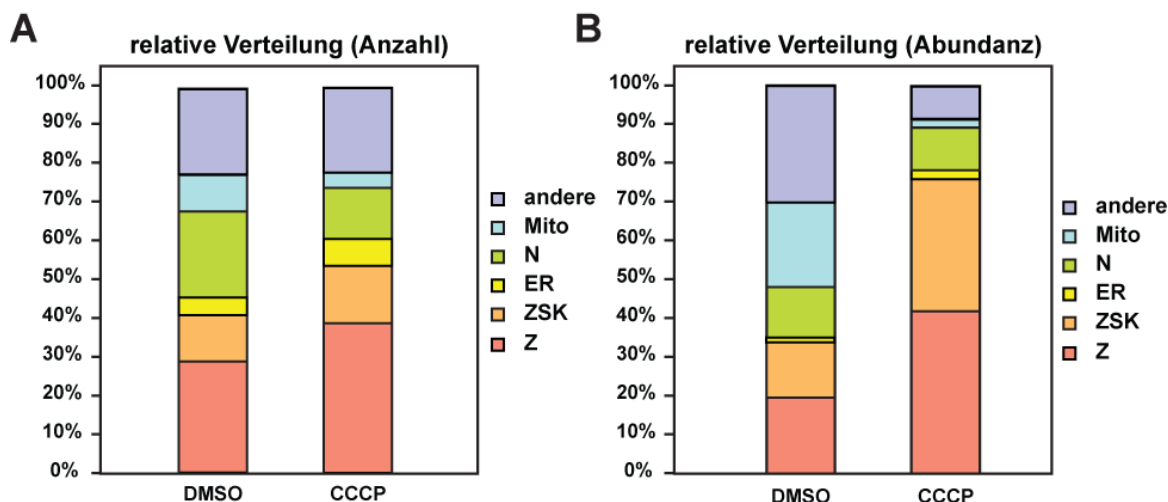


Abbildung 21: Änderung der zellulären Lokalisation der Proteinanzahl und Abundanz nach CCCP-Behandlung.

Die Balkendiagramme veranschaulichen die relative Verteilung der Proteinanzahl (A) bzw. Abundanz (B) in den jeweiligen zugeordneten zellulären Lokalisationen nach mitochondrialem Stress. Die aufgeführten Werte beziehen sich ausschließlich auf Proteine, die eine relative Änderung (\log_2 -fold change) von -1 (DMSO) bzw. +1 (CCCP) aufwiesen. ZSK= Zytoskelett, Z= Zytosol, N=Nukleus, M= Mitochondrien, ER= endoplasmatisches Retikulum und „andere“.

Der Vergleich der relativen zellulären Proteinverteilung nach CCCP-Behandlung zeigte auf, dass sich die Anzahl an gebundenen mitochondrialer, nuklearer und Zytoskelettproteine reduzierte. Die relative Menge an gebundenen ER-Proteinen veränderte sich kaum. Jedoch zeigte die Anzahl an gebundener zytosolischer Proteine einen Anstieg nach mitochondrialem Stress, von 21% auf 31%. Ebenso erhöhte sich die Anzahl der gebundenen Proteine, die der Gruppe „Andere“ zugeordnet sind nach CCCP. Diese Gruppe umfasst alle restlichen intrazellulären Kompartimente wie z.B. Golgi, Lysosomen und Peroxisomen und Proteine, die nicht genau einem Kompartiment zugeteilt werden konnten. Wird die relative Verteilung der Gesamtabundanz der jeweiligen Kategorien nach DMSO oder CCCP-Behandlung betrachtet, zeigen sich deutlichere Unterschiede (Abbildung 21, B). Für die Berechnung der Gesamtabundanz wurde die Summe aller Abundanzen einer Kategorie zugeteilten Proteine berechnet. Nach CCCP-Behandlung banden zytosolische Proteine mit 42% deutlich affiner an Pink1 als mit DMSO (19%). Zytoskelettproteine zeigten eine Gesamtabundanz von 33% zu knapp 15% nach DMSO-Behandlung. Die relative Verteilung der Gesamtabundanz der mitochondrialen Proteine verringerte sich jedoch stark nach CCCP-

Behandlung von ~22% auf 2%, sodass Pink1-Flag unter mitochondrialem Stress mit weniger mitochondrialen Proteinen bindet und dieses auch weniger affin.

Zusammenfassend waren leichte Schwankungen an der subzellulären Proteinverteilung nach CCCP ersichtlich, jedoch zeigte die Gesamtabundanz der jeweiligen Kategorien deutlich stärkere Unterschiede, die sich hauptsächlich auf zytosolische Interaktionspartner als auch Zytoskelettproteine beschränkt.

Um gezielter herauszufinden, welche Proteine als reale Pink1-Interaktionspartner infrage kommen, wurde eine komparative Analyse anhand der Datenbank Biogrid durchgeführt (thebiogrid.org). Biogrid ist eine Datenbank, die Proteininteraktion nach evidenzbasierten Daten zusammenstellt. Insgesamt waren 232 Proteine von den insgesamt 640 identifizierten Proteinen bereits bei Biogrid als Pink1-Interaktionspartner notiert. Interessanterweise wurden in der hier durchgeführten Studie weder Parkin noch DJ-1 oder Mfn1/2 identifiziert, drei Proteine, die jedoch als Interaktionspartner bereits beschrieben wurden (Chen und Dorn 2013; Fedorowicz et al. 2014; Shiba et al. 2009). Allerdings konnten auch Proteine identifiziert werden, die mit einer hohen Evidenz als Pink1-Interaktoren infrage kommen. So konnten einige Proteine wie Tom40, Sam50, Pgam5 und Bag2 als übereinstimmende Kandidaten mit einer hohen Evidenz für Pink1-Flag unter Kontrollbedingungen und Pink1, HSP90, VapB und VCP unter mitochondrialem Stress ermittelt werden. Zudem stellt die intrazelluläre Lokalisation dieser Proteine eine Interaktion mit dem OMM-Protein Pink1 nicht infrage. Einige dieser Kandidaten konnten in einer anschließenden Pink1-His Affinitätsanalyse mittels Ni-NTA genauer untersucht werden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit Pink1-His transfiziert und nach einer nativen Lyse analysiert (Abbildung 22).

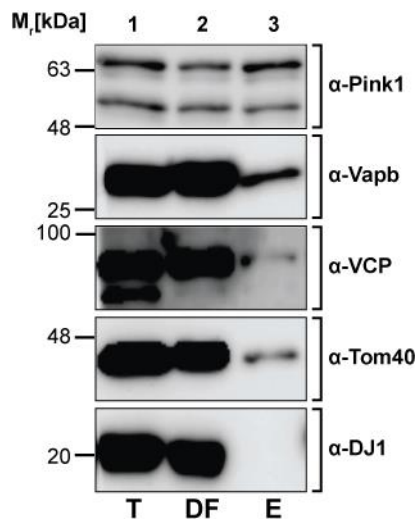


Abbildung 22: Affinitätsaufreinigung von Pink1-His.

Analyse möglicher Pink1-Interaktionspartner mittels Pink1-His Affinitätschromatografie über Ni-NTA. Total (T), Durchfluss (DF) und Elutionsfraktion (E) wurden über SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Mittels der Pink1-His Affinitätsanalyse konnten Signale von VCP, Vapb und Tom40 in der Elutionsfraktion von Pink1-His bei $+\Delta\psi$ nachgewiesen werden (Abbildung 22). Das Protein DJ-1 wurde nicht als eines der putativen Interaktionspartner in der Elutionsfraktion detektiert. Basierend darauf konnten einige Interaktionskandidaten über eine biochemische Methode als Pink1-Bindepartner bestätigt werden.

5.6 Pink1 und Pgam5

Die mitochondriale Phosphoglycerat-Mutase 5 (Pgam5) ist als ein weiteres mitochondriales Außenmembranprotein bekannt, das ebenfalls $\Delta\psi$ -abhängig von PARL prozessiert wird (Sekine et al. 2012; Yamaguchi et al. 2019). Im Gegensatz zu Pink1, welches bei intaktem Membranpotenzial prozessiert wird, wird Pgam5 bei $-\Delta\psi$ geschnitten (Cheng et al. 2021). Außerdem wurde Pgam5 als möglicher Pink1-Bindungspartner postuliert (Imai et al. 2010). In der vorangegangenen Analyse zu möglichen Pink1-Interaktionspartnern durch die massenspektrometrische Auswertung der Immunpräzipitierten Pink1-Komplexe, konnte Pgam5 ebenfalls nachgewiesen werden. Besonders auffällig war, dass Pink1 und Pgam5 mit einer sehr ähnlichen Abundanz ermittelt wurden (siehe Tabelle 3, Pink1=26,699 und Pgam5=26,768). Aufgrund dessen wurde im Folgenden die Bindung von Pgam5 auf die Pink1-Regulation genauer untersucht.

5.6.1 Gegensätzliche Prozessierung von Pink1 und Pgam5

Wie bereits zuvor erörtert, werden Pink1 und Pgam5 von der Proteinase PARL prozessiert (Sekine et al. 2012). Um einen genaueren Überblick zu erlangen, ob Pgam5 mit Pink1 um die Prozessierung von PARL konkurriert oder PARL das zu schneidende Substrat in Anhängigkeit der mitochondrialen Fitness wählt, wurden HeLa WT Zellen mit verschiedenen zellulären Inhibitoren kultiviert.

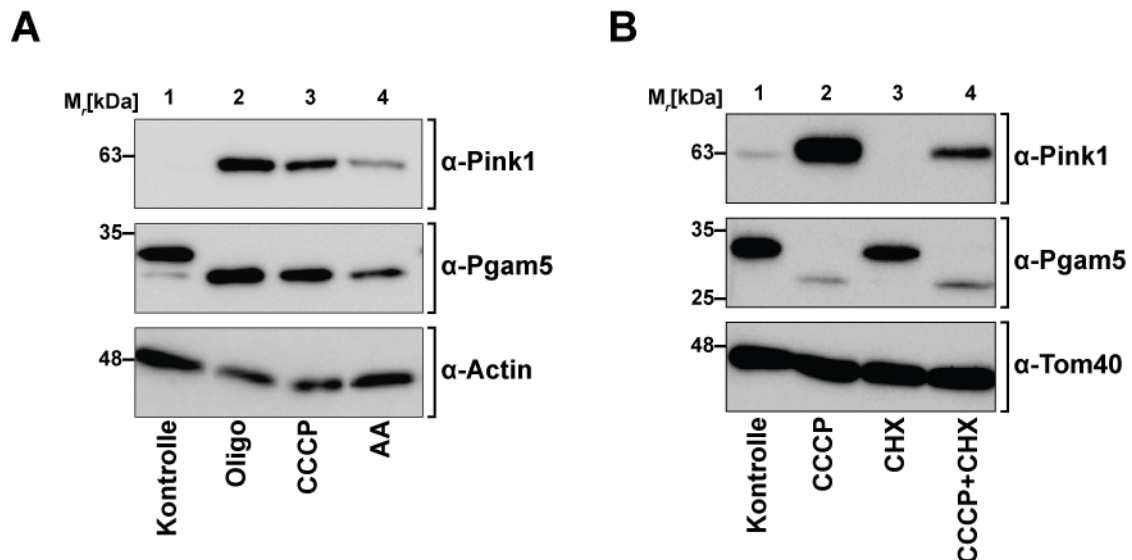


Abbildung 23: Effekt verschiedener Inhibitoren auf das Proteinlevel von Pink1 und Pgam5. (A) HeLa-Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/DMSO (Kontrolle); Oligomycin, CCCP oder Antimycin A lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Antikörperdekoration mit anti-Actin diente als Ladekontrolle. (B) HeLa-Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubation mit EtOH/DMSO (Kontrolle), CCCP, CHX oder CCCP mit CHX lysiert und über SDS und Western Blot analysiert. Antikörperdekoration mit anti-Tom40 dient als Ladekontrolle.

Unter Kontrollbedingungen war wie zuvor schon dargestellt kein endogenes Pink1 detektierbar. Pgam5-Signale waren zum einen als eine größere 32 kDa und eine kleiner 28 kDa Form nachweisbar. Eine eindeutige Pink1-Akkumulierung konnte durch die Inhibitoren Oligomycin, CCCP und Antimycin A gezeigt werden. Interessanterweise war die 32 kDa Form von Pgam5 unter den Pink1-induzierenden Konditionen nicht mehr nachzuweisen, während die 28 kDa Pgam5 Signale akkumulierten (Abbildung 23 ,A). Da der Pgam5 gerichtete Antikörper beide Isoformen (Pgam5-L und Pgam5-S) erkennt, stellte sich zunächst die Frage, ob Pgam5-L durch die Pink1-induzierenden Inhibitoren zu Δ Pgam5-L prozessiert oder ob von der gleichgroßen Pgam5-S Isoform mehr exprimiert wird. Durch eine simultane CHX und CCCP-Behandlung konnte allerdings gezeigt werden, dass die die Akkumulierung von der 28 kDa Pgam5 Form im Vergleich zur CCCP-Probe

nicht vermindert wurde (Abbildung 23, B). Daher wird in Abhängigkeit von Pink1-induzierenden Substanzen Pgam5-L zu Δ -Pgam5-L prozessiert.

Pgam5 wird gegensätzlich zu Pink1 prozessiert, wobei dieser Prozess, genauso wie die Pink1-Akkumulierung, nicht strikt in Abhängigkeit von $\Delta\psi$ erfolgt, sondern eher in Abhängigkeit zur Pink1-Akkumulierung selbst, da auch mit dem Inhibitor Oligomycin eine Pgam5 Prozessierung stattfindet.

5.6.2 Pink1 und Pgam5 Interaktion

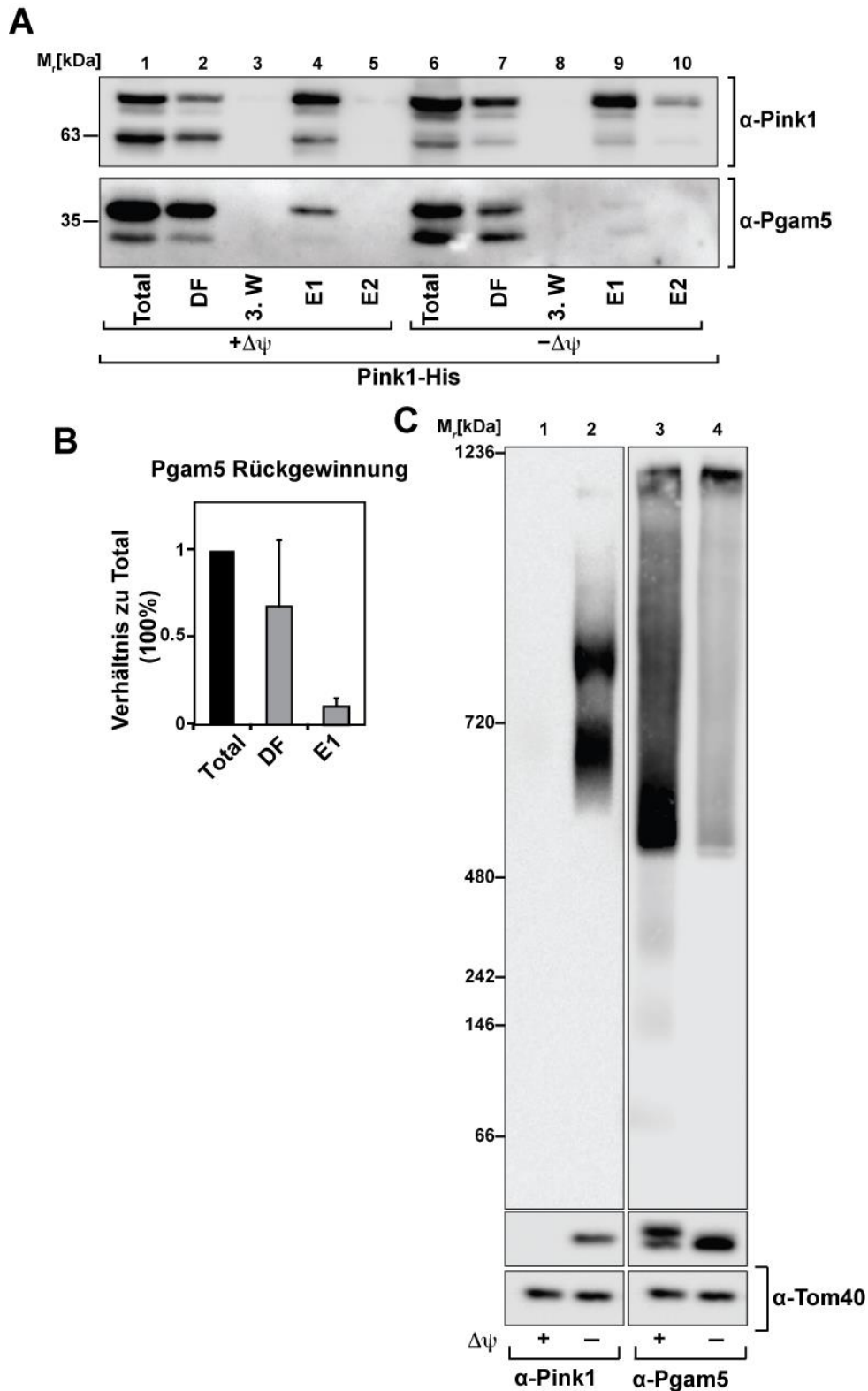
Um eine physische Interaktion zwischen Pink1 und Pgam5 nachzuweisen, wurde ein Pink1-Fusionsprotein gekoppelt mit einem His-Tag in HeLa WT Zellen exprimiert. Anschließend wurde dieses mittels Ni-NTA Agarose nativ gebunden, sodass mögliche Interaktionspartner im Komplex bleiben. Gleichzeitig wurde dieser Versuch zum einen unter Kontrollbedingungen und zum anderen mit $-\Delta\psi$, durch die Zugabe von CCCP durchgeführt.

Sowohl in Kontrollbedingungen als auch nach CCCP-Behandlung wurde das meiste Pink1-His in der ersten Elutions-Fraktion (E1) detektiert. Ein Pgam5-Signal wurde nur unter Kontrollbedingungen in E1 detektiert, welches hauptsächlich die 32 kDa Pgam5-L Isoform darstellt (Abbildung 24, A). Die Quantifizierung von drei unabhängigen Replikaten zeigte, dass ca. 10% von Pgam5-L unter Kontrollbedingungen mit Pink1-His interagiert (Abbildung 24, B).

Nachdem eine $\Delta\psi$ -abhängige Interaktion zwischen Pink1 und Pgam5 sowohl nach MS-Analyse als auch Western Blot gezeigt werden konnte, wurde weiterführend die Komplexbildung beider Proteine untersucht. Pink1 bildet unter nativen Bedingungen bei $-\Delta\psi$ zwei HMW-Komplexe. Wie Pgam5 sich unter nativen Bedingungen assembliert und ob der native Pgam5-Komplex gegebenenfalls mit dem Pink1-Komplex co-migriert, wurde mittels BN-PAGE analysiert. Dazu wurden HeLa WT Mitochondrien nach CCCP oder DMSO-Behandlung isoliert und nativ lysiert. Pgam5 bildete, im Gegensatz zu Pink1, einen Komplex aus, welcher von 480 kDa bis 1236 kDa reicht (Abbildung 24, C). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der native Pgam5 Komplex hauptsächlich unter Kontrollbedingungen gebildet wird und nach CCCP ($-\Delta\psi$) in deutlich reduzierter Menge detektierbar ist. Gleichzeitig zeigte die korrespondierende SDS-PAGE nach CCCP-Behandlung

abermals den Verlust der Pgam5-L Isoform und eine deutliche Akkumulierung des 28 kDa großen Pgam5 Signals.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte Pink1 unter Kontrollbedingungen mit Pgam5-L interagiert und dass diese Interaktion in Abhängigkeit des $\Delta\psi$ stattfindet.



5.6.3 Einfluss von Pink1 auf Pgam5

Nachdem eine Interaktion bei intaktem $\Delta\psi$ zwischen Pink1 und Pgam5 in *in vitro* und MS-basierten Versuchen gezeigt werden konnte (Abbildung 24, A), wurde zudem die physiologische Konsequenz dieser Interaktion analysiert. Dafür wurde zunächst der Einfluss von Pink1 auf Pgam5 untersucht, da Pink1 ebenso wie Pgam5, ein PARL-Substrat darstellt und bereits als kompetitives Substrat zu Pgam5 beschrieben wurde (Sekine et al. 2012; Shi et al. 2011). Dementsprechend steht in einer Pink1 KO-Zelle kein konkurrierendes Substrat zur Verfügung beziehungsweise in einer Pink1-Überexpression deutlich mehr. Für diesen Zweck wurde das Pgam5-Level in Pink1 KO-Zellen oder Zellen mit einer Pink1-Flag Überexpression nach Behandlung mit DMSO oder CCCP mittels Western Blot analysiert (Abbildung 25).

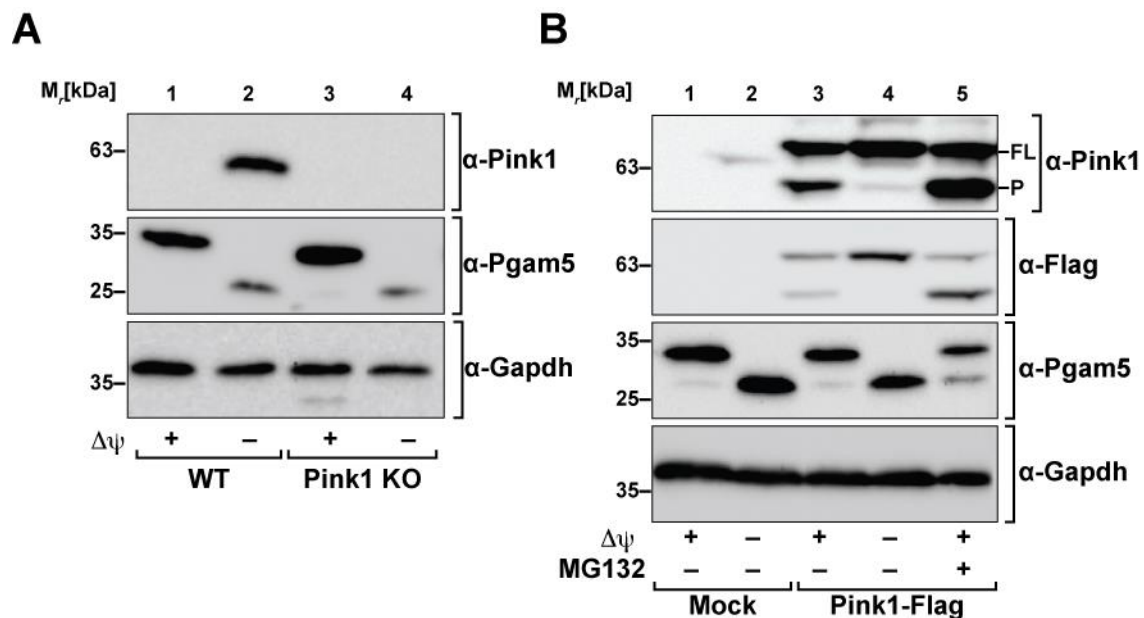


Abbildung 25: Pgam5 Expression in Pink1 KO und Überexpressions-Zellen.

(A) HeLa WT und Pink1 KO-Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubation mit DMSO/EtOH (Kontrolle) oder CCCP lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde Gapdh detektiert. (B) Pink1-Flag wurde in HeLa WT Zellen transfiziert und nach einer 16-stündigen Inkubation mit CCCP oder MG132 wurden die Zellen lysiert.

Eine Deletion des Pink1-Proteins beeinflusste nicht die zelluläre Menge von Pgam5 (Abbildung 25, A). Im Vergleich zur Kontrolle war weder die Pgam5 Prozessierung noch die Proteinmenge selbst sichtbar verändert. Eine Überexpression von Pink1-Flag hatte ebenfalls keinen eindeutigen Einfluss auf das Mengenverhalten von Pgam5 oder dessen Prozessierung (Abbildung 25, B). Wenn

Pink1 ein kompetitives PARL-Substrat wäre, müsste eine übermäßige Pink1-Expression eine Pgam5 Prozessierung mindern. Um zu differenzieren, ob Pink1_{FL} oder Pink1_P unterschiedliche Effekte auf Pgam5 ausüben, wurde durch die Behandlung mit MG132 hauptsächlich die Pink1_P-Form angereichert. Dies schien einen milden Effekt auf Prozessierung von Pgam5 zu zeigen, da etwas mehr von der 28 kDa-Form zu detektieren war. Schlussfolgernd nimmt weder das Fehlen noch das Anreichern von Pink1 einen deutlichen Einfluss auf Pgam5 oder dessen Prozessierung.

5.6.4 Charakterisierung der Pgam5-KO Zellen

Zur weiteren Analyse der physiologischen Rolle der Pink1/Pgam5-Interaktion wurde im Folgenden der Einfluss Pgam5 auf das Pink1 Proteinlevel untersucht. Hierfür wurde mittels CRISPR/Cas9 ein Pgam5 Knockout in HeLa-Zellen generiert. Wie für die Pink1 Knockout Zelllinie wurde das Exon 1 der Pgam5 Gensequenz gezielt geschnitten. Nach erfolgreicher Selektion und Vereinzelung der Klone, konnte ein Pgam5 Knockout Klon ermittelt werden (Abbildung 26, A), der auf Proteinebene keine nachweisbare Pgam5 Menge auswies.

Um zu ermitteln, welche Rolle Pgam5 in der Pink1-Regulation spielt, wurden WT und Pgam5 KO-Zellen mit CCCP behandelt, um eine Pink1-Induktion zu stimulieren. Die Zellysatanalyse zeigte auf, dass Pgam5 Knockout Zellen signifikant weniger Pink1 aufweisen als der WT (Abbildung 26, B). Korrespondierend zu der Menge an Pink1 war ebenso dessen Aktivität, detektiert über das phospho-Ubiquitin Signal, deutlich reduziert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Pink1-Menge keine erhöhte Aktivität in Form der Ubiquitin Phosphorylierung auswies. Des Weiteren wurde das $\Delta\psi$ der Pgam5 Mutanten untersucht, um die generelle mitochondriale Fitness dieser Zelllinie zu ermitteln und den Zusammenhang mit der reduzierten Pink1-Menge nachzuvollziehen. In der Pgam5 Mutanten wurde mittels TMRE-Fluoreszenzmessung kein signifikanter Unterschied im $\Delta\psi$ zum WT nachgewiesen (Abbildung 26, D).

Demnach nimmt Pgam5 einen grundlegenden Einfluss auf das Pink1 Proteinlevel und dessen Aktivität ein. Zudem ist die reduzierte Pink1-Akkumulierung in den Pgam5 KO-Zellen nicht auf eine Veränderung des $\Delta\psi$ zurückzuführen.

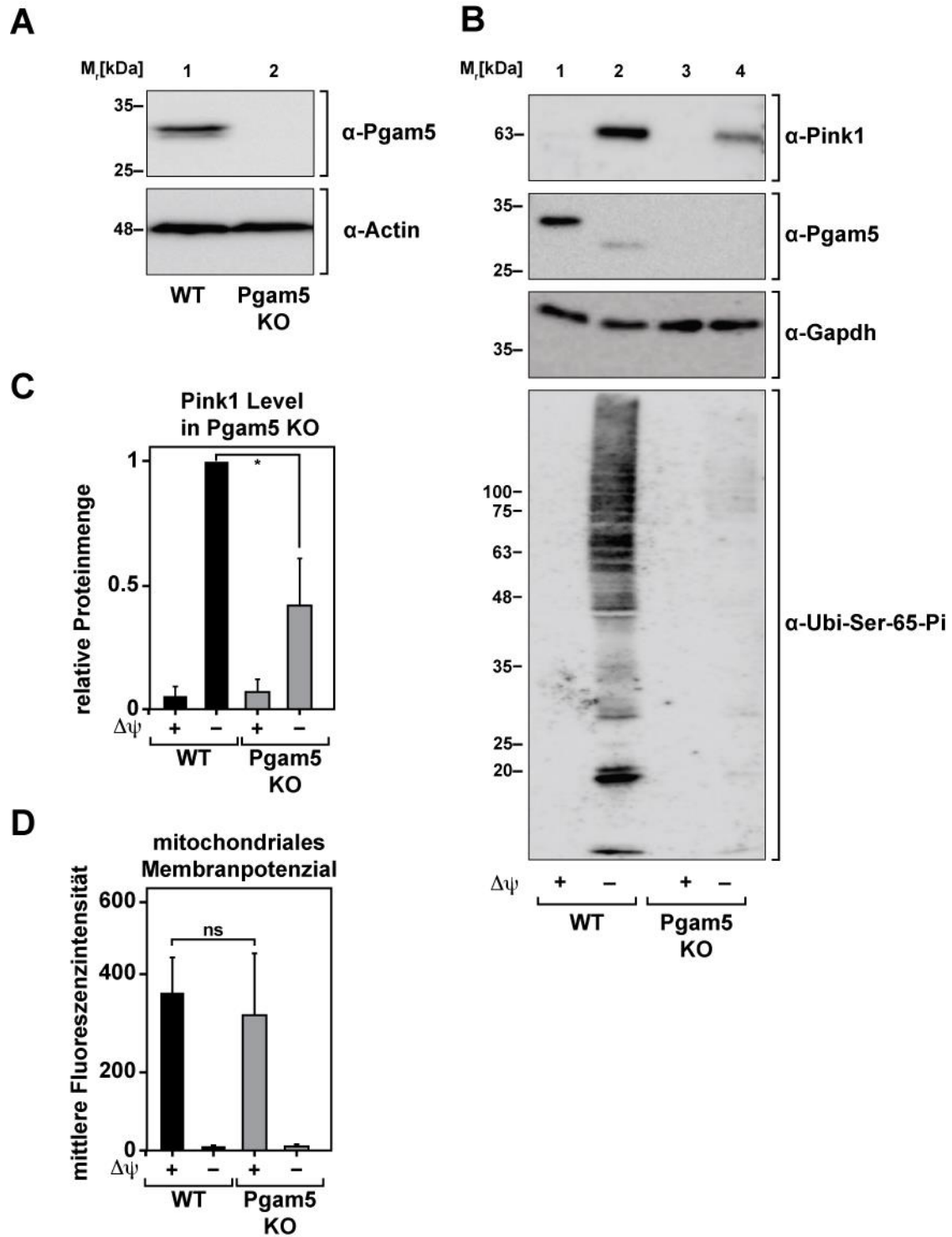


Abbildung 26: Effekt der Pgam5 Deletion auf Pink1.

(A) Verifizierung der Pgam5 KO-Zelllinie. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (B) Nach 16-stündiger Behandlung mit CCCP wurden HeLa WT und Pgam5 KO Zellysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (C) Quantifizierung des Pink1-Niveaus in Pgam5 KO-Zellen ($n=3$; $p=3,84 \cdot 10^{-2}$). (D) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels TMRE-Färbung. HeLa WT und Pgam5 KO-Zellen wurden nach der Färbung anhand von Durchflusszytometrie vermessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, als Negativkontrolle wurden diese zuvor für 4 h mit Valinomycin behandelt ($n=3$).

5.6.5 Analyse des Pgam5 KO auf die Pink1-Regulierung

Wie schon in dem vorherigen Abschnitten 5.2.2 und 5.2.3 aufgezeigt, wird das Pink1-Level sowohl auf Expressions- als auch auf Degradationsebene kontrolliert. Nachdem zusätzlich der Verlust von Pgam5 einen Einfluss auf die Menge von Pink1 ausübt, wurde dessen Rolle in der Pink1-Degradation und Expression näher betrachtet. Da das Proteasom zumindest auf die prozessierte Form von Pink1_P Einfluss nimmt, wurde im Weiterführenden untersucht, ob Pgam5 an der proteasomalen Degradation von Pink1 partizipiert. Dafür wurde mittels der Chemikalie MG132 das Proteasom in HeLa WT und Pgam5 KO-Zellen inhibiert (Abbildung 27, A). Reproduzierend zu den Experimenten aus Abschnitt 5.2.2 akkumulierte in WT Zellen Pink1_{FL} nur nach CCCP-Behandlung, während sich ein Teil der gesamten Pink1-Proteinmenge in Form von Pink1_P nach Proteasominhibierung ansammelte. Parallel dazu führte die MG132-Behandlung zu keiner Veränderung im Mengenverhalten von endogenem Pgam5 oder förderte dessen Prozessierung wie mit CCCP. Die MG132-Behandlung der Pgam5 KO-Zellen zeigte eine ebenso schwächere Bande der Pink1_P-Form wie auch eine Reduktion des Pink1_{FL}-Signals nach CCCP-Behandlung. Dieses Ergebnis demonstriert, dass Pgam5 keine Rolle in der Proteasom-vermittelten Pink1-Degradation spielt, da eine Inhibition durch MG132 in den Pgam5 KO-Zellen das Pink1_P-Level nicht ansteigen ließ.

Pgam5 wurde als ein Protein beschrieben, welches während des Prozesses der Mitophagie Pink1 an der mitochondrialen Außenmembran stabilisiert (Imai et al. 2010). Eine native gelelektrophoretische Auftrennung isolierter Mitochondrien von WT und Pgam5 KO-Zellen mit und ohne CCCP-Behandlung zeigte, dass in den Pgam5 KO-Zellen unter $-\Delta\psi$ -Bedingungen der Pink1-Komplex zunächst nachweisbar war (Abbildung 27, B). Das detektierte Pink1-Signal war jedoch deutlich schwächer als in dem korrespondierenden Lysat der WT-Zellen, lief allerdings auf dem gleichen Molekulargewicht von ca. 700 kDa. Als Ladekontrolle wurde eine SDS-PAGE mit den korrespondierenden Proteinmengen analysiert.

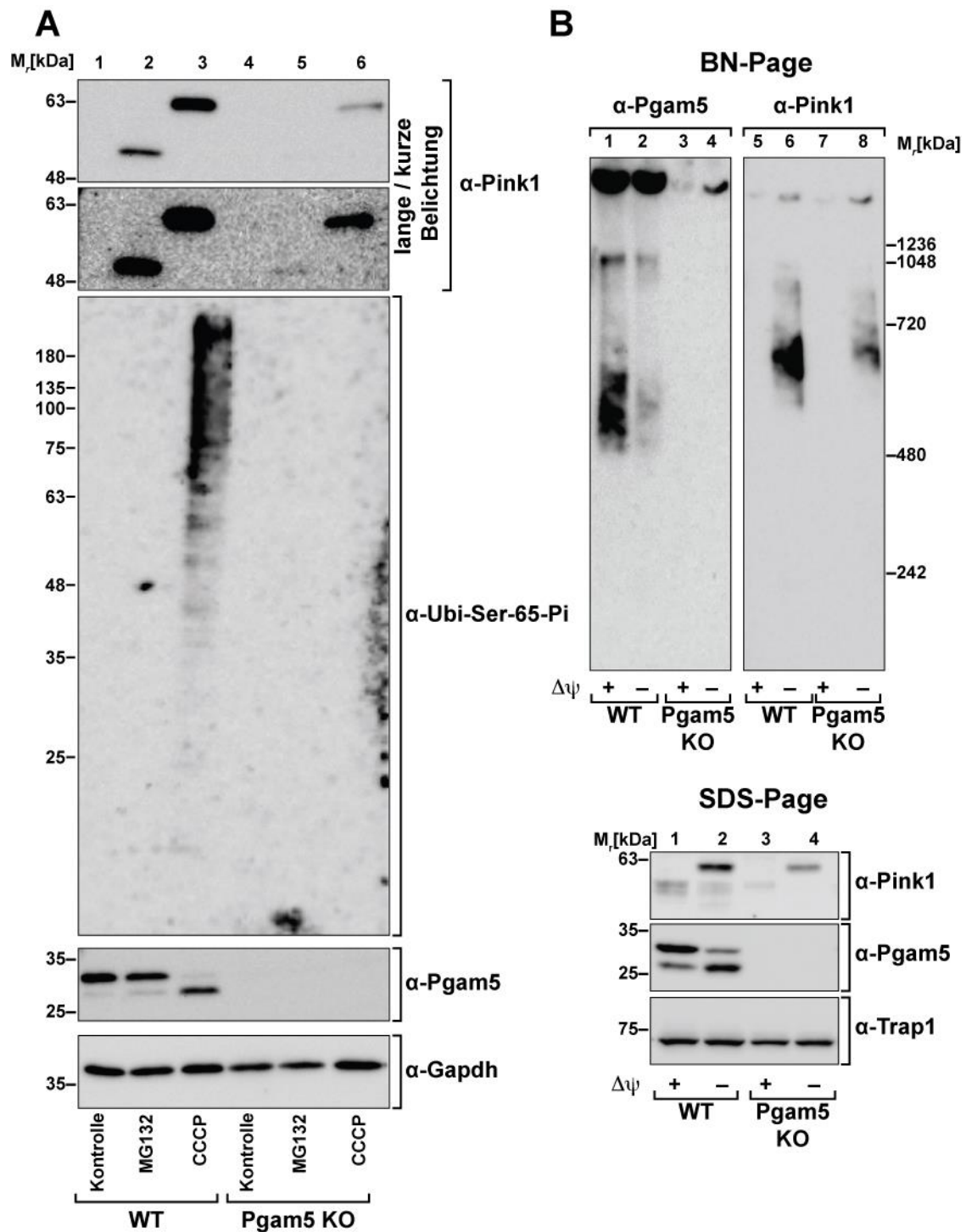


Abbildung 27: Pgam5 reguliert Pink1 auf Expressionsebene.

(A) HeLa WT und Pgam5 KO Zelllysate nach DMSO/EtOH- (Kontrolle); CCCP- oder MG132-Behandlung analysiert mittels SDS-PAGE und Western Blot. (B) BN-PAGE und SDS-PAGE von isolierten HeLa WT und Pgam5 KO-Zellen nach EtOH- (Kontrolle) oder CCCP-Behandlung.

Die eingesetzten Proteinmengen waren zwischen WT und Pgam5 KO vergleichbar, welches an der mitochondrialen Ladekontrolle Trap1 ersichtlich ist. Folglich führte der Verlust von Pgam5 in HeLa-Zellen zunächst nicht zum Fehlen

des Pink1-Komplexes, jedoch war dieser in wesentlich geringerer Menge vorhanden. Zudem wies dieser Pink1-Komplex durch das Fehlen von Pgam5 weder eine Fragmentierung auf, noch migrierte dieser auf einem geringeren Molekulargewicht als der WT Pink1-Komplex. Dies spricht dafür, dass Pgam5 nicht an der Stabilisierung des nativen Pink1-Komplexes während der Mitophagie beteiligt ist.

Da Pgam5 nicht an dem Abbau von Pink1 oder dessen Komplex Formierung und Stabilität während der Mitophagie beteiligt ist, wurde die Expression von Pink1 genauer betrachtet. Dafür wurde wieder mittels Luziferase-Promotor-Assay die Pink1-Expression untersucht.

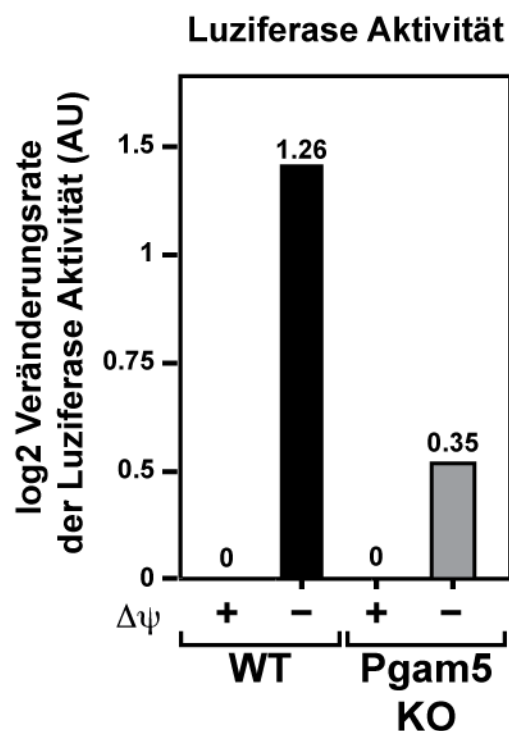


Abbildung 28: Pink1-Expression in Pgam5 KO-Zellen.

Pink1 Promotor Analyse mittels Luziferase Assay. HeLa WT und Pgam5 KO-Zellen wurden mit einem Pink1 Promotor Plasmid transfiziert und mit CCCP/EtOH (Kontrolle) kultiviert. Über die Luziferase Lumineszenz wurde die Pink1-Expression gemessen und wurde gegen das coexprimierte GFP normalisiert (n=1).

Die Luziferase Expression war ähnlich wie in Abbildung 12, D im WT nach CCCP-Behandlung deutlich erhöht. In Pgam5 KO-Zellen wurde jedoch im Vergleich zum WT unter Kontrollbedingungen und nach CCCP-Behandlung weniger Pink1 exprimiert (Abbildung 28). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass Pgam5 einen regulierenden Faktor der Pink1-Expression darstellt.

Nachdem festgestellt wurde, dass Pgam5 die Proteinexpression von Pink1 beeinflusst, wurde untersucht, ob dieser Phänotyp durch eine Überexpression von Pink1-Flag wiederhergestellt werden kann. Hierzu wurden WT und Pgam5 KO-Zellen mit exogenem Pink1-Flag transfiziert und 16 h vor der Zelllyse mit CCCP behandelt (Abbildung 29, A). Die Überexpression von Pink1 zeigte eine deutliche Verstärkung der Ubiquitin Phosphorylierung im Vergleich zum WT, obwohl die Menge an exprimierten Pink1-Flag zwischen WT und Pgam5 KO vergleichbar war. Eine Quantifizierung des Pink1-Flag Levels bestätigte, dass sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch mit CCCP-Behandlung äquivalent exogenes Pink1-Flag in beiden Zelllinien exprimiert wurde (Abbildung 29, B). Die Pink1-Aktivität in Form der Ubiquitin Phosphorylierung war jedoch in den Pgam5 Mutanten nach CCCP-Behandlung sehr stark erhöht (Abbildung 29, C).

Schlussfolgernd konnte das exogene Pink1-Flag die für Mitophagie benötigte Phosphorylierung des Ubiquitins in den Pgam5 KO-Zellen wiederherstellen und das sogar in deutlich erhöhter Menge.

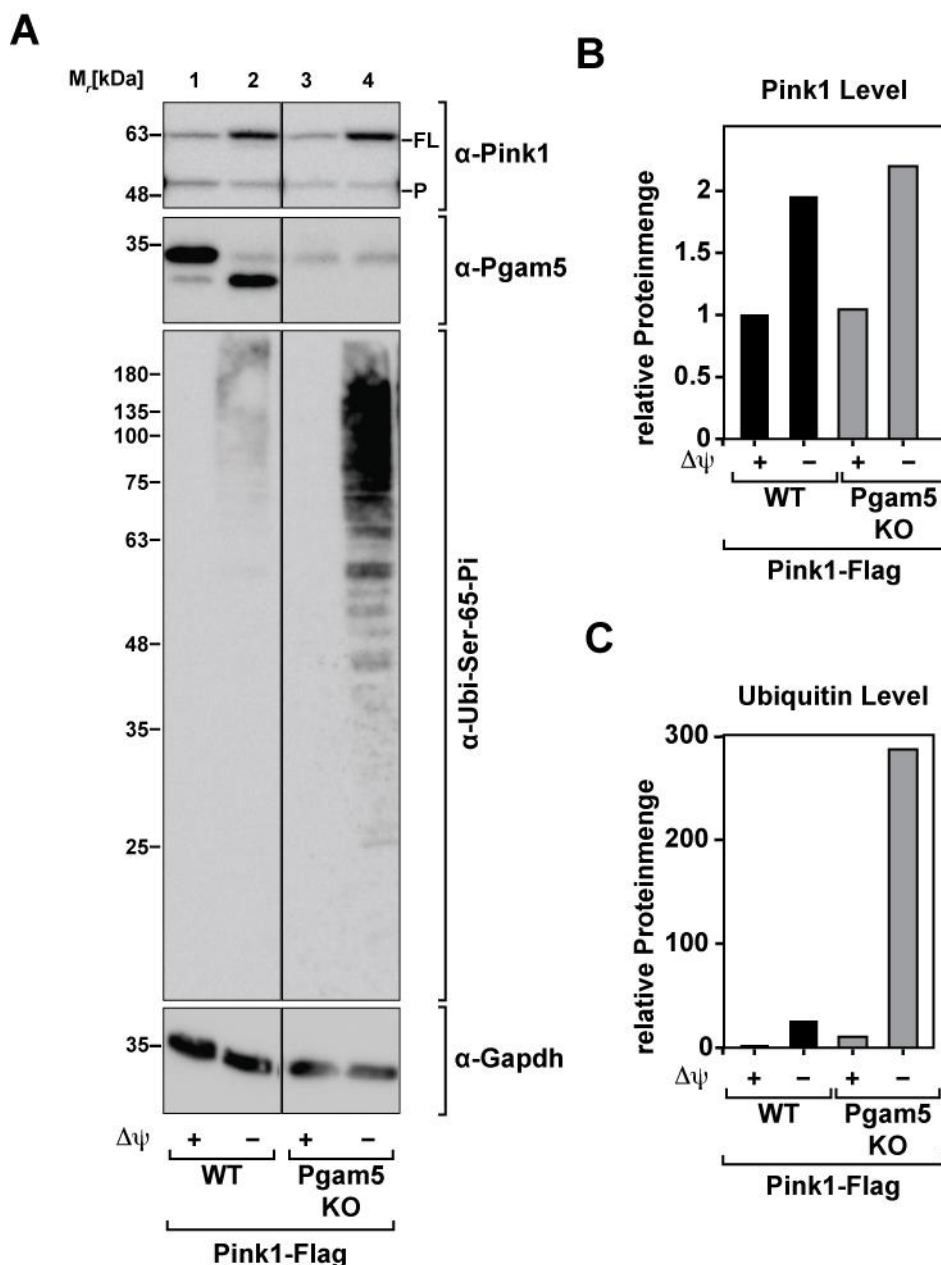


Abbildung 29: Pgam5 KO-Wiederherstellung mittels Pink1-Überexpression.

(A) HeLa WT und Pgam5 KO-Zellen wurden mit Pink1-Flag transfiziert und 16 h vor der Zellyse mit DMSO/EtOH (Kontrolle) oder CCCP behandelt. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (B) Quantifizierung des Pink1-Level in WT und Pgam5 KO nach Zellbehandlung. Proteinmenge wurde gegen GAPDH (Ladekontrolle) gemittelt (n=1). (C) Quantifizierung des phosphorylierten Ubiquitins Levels (Ubi-ser-65-Pi) in WT und Pgam5 KO nach Zellbehandlung. Proteinmenge wurde gegen GAPDH (Ladekontrolle) gemittelt (n=1).

6. Diskussion

Die Akkumulierung von Pink1 an defekten Mitochondrien ist ein zentraler Prozess der organellaren Qualitätskontrolle, die für den selektiven Abbau von defekten Mitochondrien essenziell ist und in Form von Mitophagie stattfindet. Das bisherige Model zur Regulation von Pink1 beruht auf einer konstitutiven Expression und einem schnellen proteolytischen Umsatz in gesunden Mitochondrien, wodurch der Pink1-Proteinspiegel niedrig gehalten wird (Bayne und Trempe 2019; Pickrell und Youle 2015). Dabei wird dessen Import und Prozessierung als Voraussetzung der anschließenden Degradation angenommen (Jin et al. 2010). Demnach führt eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotenzials ($-\Delta\psi$) und der damit einhergehende Importstopp zur Akkumulierung von Pink1_{FL} an der OMM. Dieser energetisch aufwendige Ablauf soll eine möglichst schnelle Pink1-Akkumulierung bei $-\Delta\psi$ ermöglichen, welches als Hauptcharakteristika für geschädigte Mitochondrien gilt (Jin et al. 2010). Dieses Regulierungsmodel weist jedoch gewisse Mängel auf. Zum einen konnte gezeigt werden, dass sowohl Pink1_{FL} als auch Pink1_P hauptsächlich an der OMM lokalisieren und im Zuge der Mitophagie Pink1 zwei hochmolekulare Proteinkomplexe ausbildet, dessen Interaktionspartner bislang unbekannt sind (Becker et al. 2012a). Zum anderen ist die Fragestellung der verantwortlichen Protease für den Abbau von Pink1 immer noch offen. Um die genauen zellulären Vorgänge näher zu beleuchten, wurde in dieser Dissertation die Regulation von Pink1 während physiologischer als auch mitochondrialer Dysfunktion untersucht.

6.1 Konditionen der Pink1-Akkumulierung bei verschiedenen mitochondrialen Schäden

In den letzten Jahren wurden diverse Stressbedingungen beschrieben, welche zu einer Pink1-Induktion führen (Jin und Youle 2013; Matsuda et al. 2010; McLelland et al. 2016; Kim et al. 2013b; Yu et al. 2021). Hauptsächlich jedoch gingen diese Stressbedingungen mit $-\Delta\psi$ einher. Im Zuge dieser Arbeit wurde mittels diverser zellulärer Inhibitoren bestimmt, unter welchen Bedingungen eine Pink1-

Akkumulierung stattfindet. Dabei konnte bestätigt werden, dass Pink1 durch die gängigen mitochondrialen Entkoppler wie CCCP, Valinomycin oder Antimycin A induziert wird. Aber auch Oligomycin führte zu einer Pink-Akkumulierung. Jedoch mindert Oligomycin, welches die mitochondriale F_1/F_0 -ATPase inhibiert, nicht $\Delta\psi$ und führt dennoch zur Pink1-Induktion. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Pink1-Akkumulierung nicht strikt nach der Reduktion des Membranpotenzials verläuft.

Im Gegensatz zu kurzzeitigem mitochondrialen Stress in Form einer Nutzung von chemischen Substanzen, wurde das Pink1-Level auch in Zellen untersucht, welche generell keine mitochondriale DNA (Rho⁰-Zellen) mehr besitzen und somit einen konstanten genetischen Defekt widerspiegeln (King und Attardi 1989; Wallace 1992). Auch in parkinsonerkrankten Patienten wurde eine erhöhte Anzahl von mitochondrialen DNA-Mutationen beobachtet, was die genetisch defekten Rho⁰-Zellen zu einem geeigneten Zellmodell machen, um die Entstehung von Parkinson zu studieren (Bender et al. 2006). Die Rho⁰-Zellen wiesen unter basalen Konditionen eine deutliche Reduktion des $\Delta\psi$ auf, zeigten allerdings keine Akkumulierung von Pink1. Dieser Phänotyp konnte in ähnlicher Weise auch in einer früheren Studie dargelegt werden. In dieser zeigten Rho⁰-Zellen ebenfalls ein vermindertes Membranpotenzial zum WT, ebenso wurde mittels qPCR signifikant weniger Pink1 als auch Parkin Transkription nachgewiesen (Gilkerson et al. 2012). Eine konstante Pink1-Anhäufung in den Rho⁰-Zellen würde zum ständigen Abbau der Mitochondrien führen, was nicht von Vorteil für den ohnehin schon geschädigten Zelltyp ist. Um ihren Energiebedarf zu decken, generieren die Rho⁰-Zellen ihre Energie hauptsächlich über die Glykolyse (Chandel und Schumacker 1999), sodass die mitochondriale Homöostase langsamer abläuft und Mitophagie somit eine eher geringere Rolle spielt. Basierend auf der Pink1-Akkumulierung nach Oligomycin-Behandlung als auch das reduzierte Pink1-Level in Rho⁰-Zellen konnte dargestellt werden, dass ein reduziertes $\Delta\psi$ nicht der alleinige Auslöser einer Pink1-Akkumulierung an Mitochondrien ist.

6.2 Etablierung der Mitophagie-Visualisierung über Fusionskonstrukt

Da es bislang keine einheitliche Analyseverfahren zur Darstellung von Mitophagie gab, wurde im Zuge dieser Arbeit ein Fusionskonstrukt etabliert, welches das gekoppelte GFP und mCherry exprimiert und über eine mitochondriale Zielsequenz (Su9) in die mitochondriale Matrix transloziert. Mit diesem Konstrukt kann *in vivo* eine Visualisierung von Mitophagie in Echtzeit dargestellt werden, da eine GFP-Fluoreszenzauslöschung in einer Umgebung mit niedrigem pH stattfindet (dos Santos et al. 2020). Dieser Prozess findet während der Mitophagie während der Fusionierung des Autophagosomen mit den sauren Lysosomen statt. Vergleichbare Konstrukte wie das kommerziell erhältliche mtQC (engl.: *mitochondrial quality control*)-Konstrukt, unterscheiden sich lediglich in der verwendeten mitochondrialen Zielsequenz. Das mtQC-Konstrukt wurde mit der Zielsequenz des Außenmembran-Proteins Fis1 generiert (McWilliams et al. 2016), ein ähnliches Fusionsprotein wurde mit dem Innenmembran-Protein Cox8 verwendet (Wang et al. 2019). Damit nur die Mitophagie und nicht versehentlich die proteasomale Degradation von Außenmembranproteinen oder andere Autophagie-Wege analysiert werden, wurde in dieser Arbeit Su9 als MTS gewählt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Zielsequenz Su9 zuverlässig in die mitochondriale Matrix transloziert (Wilkening et al. 2018). Durch das in dieser Arbeit erstellte Konstrukt konnte eindeutig gezeigt werden, dass die sonst gleichmäßig verteilten, mit einer tubulären Struktur gekennzeichneten Mitochondrien, durch die Behandlung von Pink1-induzierenden Inhibitoren mit einer schnellen und starken Fragmentierung reagierten. Interessanterweise säuerten nicht alle visualisierten Mitochondrien an, sondern einige wenige mitochondriale Bereiche in der Zelle. Dieses Phänomen könnte darauf zurückzuführen sein, dass hauptsächlich geschädigte Teilabschnitte des mitochondrialen Netzwerks fokussiert abgebaut werden, während der restliche mitochondriale Teil wieder ein physiologisches $\Delta\psi$ aufbauen kann. Das fluoreszierende Protein mKeima wechselt zum Vergleich den Anregungsbereich von 440 zu 586 nm, wenn dieses saurem Milieu exponiert ist und emittiert in beiden Fällen bei 620 nm (Katayama et al. 2011). Das Fusionskonstrukt mito-mKeima wird

durch eine Kopplung von mKeima mit der Präsequenz des IMM Proteins Cox8a ebenfalls zum Mitophagie-Nachweis genutzt. Jedoch eignet sich dieses Konstrukt nur bedingt in der Praxis, da sich der Anregungsbereich von fast 590 nm mit dem Emissionsbereich von 620 nm oft überschneidet und mit vielen gängigen Mikroskopen oder Mikroplattenlesegeräten nicht messbar ist. Allerdings konnte durch den Einsatz dieser Methode gezeigt werden, dass eine basale Pink1-medierte Mitophagie über einen Zeitraum von Tagen in Hippocampus-Neuronen der Maus stattfindet – und das ohne die Zugabe durch depolarisierende Chemikalien (Bingol et al. 2014). Dementsprechend ist die Visualisierung von Mitophagie sowohl abhängig von der zeitlichen als auch von der stressbedingten Analyse der Zellen. Unterstützend zur mikroskopischen Visualisierung von Pink1-mediierter Mitophagie können auch mitochondriale Proteinmarker, wie zum Beispiel SDHA, CoxIV oder LonP1 herangezogen werden, die, wie in dieser Arbeit gezeigt, in allen Pink1-induzierenden Konditionen stark reduziert vorliegen. Die Kombination beider Methoden, die Visualisierung über Mikroskopie zusammen mit der Reduktion von mitochondrialen Proteinmarkern, führt zu einer zuverlässigen Darstellung von Mitophagie.

6.3 Auswirkungen von Proteinstress auf das Pink1-Level

Bisweilen wurde angenommen, dass eine Pink1-Akkumulierung immer als zelluläre Antwort auf unterschiedlichen mitochondrialen Stress erfolgt (Narendra et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch belegt, dass mitochondrialer Proteinstress in Form von amorphen als auch amyloiden mitochondrialen Aggregaten zu keiner Pink1-Induktion oder einer Erhöhung des Pink1-Levels während gleichzeitiger CCCP-Behandlung führte. Dieses Ergebnis widerspricht einer Studie, die zeigte, dass eine Expression von mitochondrial-lokalisierten aggregat-anfälligen OTC (Ornithin-Transcarbamylase) Mutanten, einem Enzym, welches normalerweise am Harnstoffzyklus beteiligt ist, zu einer Pink1-Akkumulierung führte (Jin und Youle 2013; Burman et al. 2017). Diese voneinander abweichenden Ergebnisse können darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche Aggregat-Konstrukte gewählt wurden, die zudem auf unterschiedliche Weise exprimiert werden. Die hier verwendeten amorphen und

amyloiden Aggregattypen wurden mittels CMV-Promotor konstitutiv exprimiert, während eine Doxycyclin-induzierte Expression der OTC Mutanten genutzt wurde. Die Zugabe von 10 µg/mL des Antibiotikums Doxycyclin auf humane Zellen beeinflusste die mitochondriale Integrität deutlich, da die mitochondriale Translation inhibiert wurde (Dijk et al. 2020). Zum anderen könnte die artifiziell generierte OTC-Mutante im Gegenzug zum mtDHFRds oder des mtQ115-Konstruktes selbst einen spezifischen mitochondrialen Schaden verursachen, da OTC ein mitochondriales Protein ist und dadurch Einfluss auf die mitochondriale Fitness nehmen kann. Dementsprechend wäre es denkbar, dass die OTC-Mutante selbst mitochondrialen Stress auslöst, welcher unabhängig von dem eigentlich postulierten induzierten Proteinstress durch Aggregate entsteht und dadurch zur Pink1-Akkumulation führt. Interessanterweise weist die OTC-Mutante kein reduziertes $\Delta\psi$ auf (Jin und Youle 2013) und induziert dennoch Pink1, was wiederum bestätigt, dass die Pink1-Akkumulation nicht streng nach der Abwesenheit von $\Delta\psi$ verläuft.

6.4 Co-Regulation des Pink1-Levels über Degradation und stress-induzierte Expression

6.4.1 Regulation des Pink1-Levels über die Degradation

Bislang wurde angenommen, dass unter Normalbedingungen der niedrige zelluläre Pink1-Spiegel durch einen schnellen proteolytischen Umsatz des konstitutiv exprimierten Proteins entsteht, während gleichzeitig das Proteasom Pink1_P abbaut (Lin und Kang 2008; Yamano und Youle 2013). Allerdings wurde in früheren Studien die Beteiligung anderer Proteasen an der Pink1-Degradation beschrieben, welche somit Einfluss auf die exakte subzelluläre Lokalisation des Pink1-Abbaus nehmen. So zeigte ein Forschungsteam die Pink1-Degradation durch die mitochondriale Matrixprotease LonP1, welches dementsprechend den vollständigen Pink1-Import in die mitochondriale Matrix bedingt (Thomas et al. 2014). In dieser Dissertation konnte hingegen gezeigt werden, dass weder die matrix-lokalisierte Protease LonP1 noch die IMM Protease Yme111 einen Einfluss auf die Pink1-Degradation ausüben. Da die Degradation von Pink1 durch LonP1

einen vollständigen Import von Pink1 in die mitochondriale Matrix voraussetzt, ist es wahrscheinlicher, dass Thomas et al. eher die Konsequenz des LonP1-*Knockdowns* und den damit einhergehenden Proteinstress als Pink1-Induktor interpretierten. In den hier dargestellten Experimenten zeigten die LonP1gKD Zellen sogar generell weniger Pink1, was auf den erst kürzlich als Alterungsmodell-beschriebenen LonP1-*Knockdown* zurückzuführen ist (Voos und Pollecker 2020; Pollecker et al. 2021). Generell belegen die Mehrheit der Studien in den letzten Jahren, dass Pink1 über die *N-End* Regel durch das Proteasom abgebaut wird (Lin und Kang 2008; Liu et al. 2017; Takatori et al. 2008; Yamano und Youle 2013). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass der Pink1-Abbau speziell an den Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und dem ER über das Proteasom stattfindet (Guardia-Laguarta et al. 2019). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass nach der Inhibierung des Proteasoms Pink1_P akkumuliert. Interessanterweise akkumulierte in allen dargestellten Versuchen nach CCCP, Valinomycin oder Oligomycin nur Pink1_{FL}, obwohl das $\Delta\psi$ nach Oligomycin-Behandlung intakt war und somit den Proteinimport zulässt. Dieses zeigt, dass die prozessierte Form im Zuge der Pink1-Induktion schnell proteolytisch abgebaut wird und eine weitere Prozessierung von Pink1_{FL} gemindert ist. Diese Schlussfolgerung konnte in einer Studie, die die Prozessierungs- und Degradationskinetik von Pink1 adressierte, unterstützt werden. Diese zeigte eine schnelle mitochondriale Prozessierung und Abbau durch das cytosolische Proteasom (Lin und Kang 2008). Eine weitere Studie zeigte zudem, dass Pink1_P lockerer als Pink1_{FL} an der OMM verankert wird und teilweise sogar in das Zytosol transloziert, was durch die Prozessierung von PARL inmitten der hydrophoben N-terminalen Region des Pink1 liegt (Deas et al. 2011). Im Zytosol soll Pink1 die E3-Ligase Parkin inhibieren, wodurch unkontrollierte Mitophagie verhindert wird (Fedorowicz et al. 2014). Diese Beobachtung war die erste beschriebene zelluläre Funktion der prozessierten Form, da zuvor davon ausgegangen wurde, dass lediglich Pink1_{FL} auf Zellregulationsebene relevant sei (Fedorowicz et al. 2014; Rüb et al. 2017). Während der Co-Behandlung mit CHX und CCCP wiesen die Degradationsraten von Pink1_{FL} keinen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrollkondition und der Proteasominhibition auf. In beiden Fällen wurde nach 16 Stunden durch CCCP-induziertes Pink1_{FL} über die Zeit abgebaut, wobei durch die zeitgleiche Inhibierung

der Translation kein weiteres Pink1 exprimiert wurde. Allerdings verlief der Pink1_{FL}-Abbau sowohl in der Kontrolle als auch in der MG132 behandelten Kondition langsam. Nach zwei Stunden waren immer noch etwa 30 % des Proteins vorhanden. Im Gegenzug dazu führt eine Co-Behandlung mit CCCP und CHX dazu, dass Pink1 in dem hier untersuchten Zeitraum von zwei Stunden nicht abgebaut wird. Eine simultane Inhibierung des Proteasoms und der Neusynthese sollte den Abbau von Pink1 verhindern, wenn dieses über das Proteasom degradiert wird. Demnach sollte das Pink1-Level unverändert bleiben und nicht vergleichbar abgebaut werden, wie in der Kontrolle. Doch genau dieser Abbau wurde in den hier durchgeführten Versuchen beobachtet, obwohl das Proteasomen inhibiert wurde. Lediglich eine schwache Pink1_P-Form war zu detektieren, welche in keiner Weise der Proteinmenge von Pink1_{FL} entsprach. Dementsprechend scheint das Proteasom lediglich teilweise an der Pink1-Regulierung und Degradation beteiligt zu sein. Für den allgemeinen Pink1-Abbau über das Proteasom muss folglich der vorherige Proteinimport und Prozessierung stattfinden, welche ein intaktes Membranpotenzial benötigen. C. Rüb (unveröffentlicht) zeigte außerdem, dass ein ATP-Mangel ebenfalls nicht den Pink1-Abbau beeinflusst, wodurch mitochondriale ATP-Abhängigen Proteasen kollektiv für den Abbau von Pink1 ausgeschlossen werden können (Voos 2013). Eine simultane Zellbehandlung mit MG132 und CCCP führte erst bei einer Langzeitinkubation von mindestens 24 Stunden zu einem leichten Anstieg von Pink1_{FL} und zu einer verstärkten Enzymaktivität von Pink1 durch die Phosphorylierung des Ubiquitins. Diese Ansammlung von Pink1_{FL} resultiert jedoch wahrscheinlich nicht durch den fehlenden Abbau des Proteasoms, sondern eher durch eine indirekte Konsequenz der Zellbehandlung. So konnte in dieser Arbeit gezielt dargestellt werden, dass durch einen geblockten Import durch CCCP-Behandlung Pink1 nicht prozessiert und dadurch nicht vom Proteasom abgebaut werden kann. Des Weiteren könnte die Langzeitinhibierung des Proteasoms und CCCP-Behandlung verstärkt Einfluss auf die Expression von Pink1 nehmen. Da Pink1_{FL} selbst nicht durch den Abbau des Proteasoms reguliert wird, scheint es einen alternativen Mechanismus, der den Pink1-Proteinspiegel reguliert, zu geben.

6.4.2 Regulation des Pink1-Levels über die Expression

Um die Pink1-Expression näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das endogene Pink1-Level nach CCCP und MG132-Behandlung näher betrachtet. In den dargestellten Experimenten zeigten sich eindeutige Mengenunterschiede in den Pink1-Spiegeln nach CCCP- und MG132-Behandlung. Signifikant mehr Pink1_{FL} konnte nach CCCP-Behandlung nachgewiesen werden, als die prozessierte Form nach Inhibition des Proteasoms, welches die *steady-state* Produktion repräsentiert. Zudem verlief der Pink1-Anstieg nach CCCP-Behandlung eher langsam und war erst nach zwei Stunden deutlich detektierbar, obwohl die mitochondriale Wirkung von CCCP bereits nach einer 15 bis 20-minütigen Inkubation eintritt (Miyazono et al. 2018). Diese Daten sprechen gegen eine ausschließliche Regulation von Pink1 über den Abbau, da über diesen Prozess die Pink1-Akkumulierung deutlich schneller stattfinden müsste (Miyazono et al. 2018). Diese Schlussfolgerung wird in dieser Arbeit durch Experimente unterstützt, in denen durch die Inhibierung des Proteasoms der Pink1-Spiegel vergleichbar schnell abnimmt, ähnlich zur Kontrollkondition. Der generelle zelluläre Spiegel eines Proteins basiert meistens jedoch nicht ausschließlich auf der Degradationsrate, sondern entspringt aus einem Gleichgewicht aus Degradation und Expression (Mohanraj et al. 2020). Da wie in Abschnitt 6.4.1 diskutiert, die Degradation nur einen partiellen Einfluss auf die Pink1 Regulation nimmt, wurde die Pink1-Expression als mögliche mitochondriale Stressantwort näher betrachtet. Sowohl die Pink1-Menge als auch dessen Aktivität in Form der Ubiquitin-Phosphorylierung sind nach gleichzeitiger Aufhebung des Membranpotenzial und Translationsinhibition durch CHX-Behandlung stark reduziert, jedoch nicht vollständig unterdrückt. Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt lediglich eine spezifische Reaktion auf die Chemikalie ist, da nach Puromycin-Behandlung ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Eine Reduktion des Pink1-Levels nach CHX-Behandlung, sowie nach Inhibierung der Transkription konnte von C. Rüb im Zuge ihrer Dissertation bestätigt werden. Beide Datensätze deuten daher darauf hin, dass Pink1 zusätzlich zur Degradation über einen transkriptionellen Induktionsmechanismus reguliert wird. Mittels Luziferase-Assay konnte diese Vermutung im Zuge der vorliegenden Arbeit belegt werden. Durch ein auf Luziferase basierendem Promotor-Assay des Pink1 Promotors war ein deutlicher

Anstieg der Luziferase nach Schädigung des $\Delta\psi$ nachweisbar. In diesem Assay entspricht die produzierte Luziferasemenge der Menge von Pink1 und bestätigt dadurch wiederum eine stressinduzierte Kontrolle des Proteins auf Expressionsebene. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten eine Reduktion der Pink1-Akkumulierung nach $-\Delta\psi$ durch Translationsinhibitoren, welche jedoch nicht durch eine Änderung im mRNA-Spiegel bestätigt werden konnte (Narendra et al. 2010; Kim et al. 2016).

Die beobachtete erhöhte Transkriptionsrate der Pink1-Expression nach mitochondrialem Schaden wirft die Frage nach einem korrespondierenden retrograden Signalweg der geschädigten Mitochondrien zum Nukleus und einen möglichen Transkriptionsfaktor oder Verstärker auf.

Das ebenfalls parkinson-assoziierte Protein DJ1 wurde als ein Pink1 regulierender Interaktionspartner durch eine Co-Immunpräzipitation von sowohl Pink1- als auch DJ1-Überexpressionskonstrukten nachgewiesen (Tang et al. 2006) und soll als Expressionsregulator für Pink1 agieren, indem es den Transkriptionsfaktor Foxo3a aktiviert (Requejo-Aguilar et al. 2015). Foxo3a wurde bereits öfter als möglicher Transkriptionsfaktor für Pink1 beschrieben. Zum einen konnte in FoxO KO-Zellen geringfügig weniger Pink1 mRNA gemessen werden (Sengupta et al. 2011), zum anderen konnte nach einer FoxO3a Überexpression in MEF Zellen eine Erhöhung des Pink1 Proteinlevels gezeigt werden (Mei et al. 2009). In dieser Arbeit wurde jedoch weder eine physikalische Interaktion von Pink1 mit endogenem DJ1 bestätigt noch eine regulierende Wirkung von überexprimiertem DJ1 auf das Pink1-Level gezeigt. Weitere Studien stellen NRF2 als einen möglichen Transkriptionsfaktor vor. Im Zuge dieser Studie konnte ebenfalls über Luziferase-basierenden Promotor Analysen ein Pink1-Anstieg nach NRF2 Überexpression gezeigt werden und ebenso eine Erhöhung der Pink1 mRNA nach Inhibierung des Membranpotenzials, wie bereits in diesem Abschnitt diskutiert (Murata et al. 2015). Eine andere Studie führte die Beteiligung des NF- κ B-Signalwegs bei der Regulierung der Pink1-Transkription auf, indem über ein ebenfalls Luziferase-basiertem Assay gezeigt wurde, dass der Pink1-Promotor unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B steht (Duan et al. 2014). Später wurde ein neuer Regulationsweg vorgeschlagen, bei dem NF- κ B die Transkription des

Autophagierezeptor p62 positiv reguliert, um die Pink1/Parkin-abhängige Mitophagie in Makrophagen als Teil einer Entzündungsreaktion zu vermitteln (Zhong et al. 2016). Die Interpretation der Ergebnisse, dass NF- κ B Pink1 selbst oder den Autophagierezeptor p62 nach mitochondrialem Schaden reguliert, deutet dennoch auf einen Zusammenhang zwischen der NF- κ B-Aktivität und Mitophagie hin. Auch die Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4 wurden als Beteiligte der Pink1-Regulation beschrieben (Bueno et al. 2018; Bouman et al. 2011). Sowohl ATF3 als auch ATF4 sind als Transkriptionsfaktoren während ER-Stress aktiv. So soll ATF3 die Pink1-Expression während eines gesunden mitochondrialen Zustandes unterdrücken (Bueno et al. 2018) und ATF4 zumindest die Expression von Parkin während ER-Stress induziert durch CCCP regulieren (Bouman et al. 2011). Letztendlich bestätigen die hier dargelegten Versuche und die hier im Abschnitt diskutierten Studien, dass das Pink1 Proteinlevel während Mitophagie stark über die Proteinexpression gesteuert wird. Bislang ist jedoch unklar, welcher Transkriptionsfaktor genau für die Regulation von Pink1 verantwortlich ist und wie die Signalkaskade der geschädigten Mitochondrien zum Nukleus abläuft.

6.5 Pink1 KO-Charakterisierung

Die Erforschung der autosomalen-rezessiven Form von Parkinson, ausgelöst durch Mutationen des Pink1-Gens, beruhen häufig auf Pink1 *Knockout* (KO) basierten Studien. Um zelluläre Mechanismen, die an der Pink1-Regulierung beteiligt sind genauer zu betrachten, wurde im Zuge dieser Dissertation ebenfalls ein zelluläres Pink1 KO Model generiert. Genauer gesagt, wurde ein genetischer CRISPR/Cas9-vermittelter Pink1 KO in HeLa-Zellen etabliert. Diese Zelllinie zeigte weder ein Pink1-Proteinlevel noch konnte dessen Aktivität in Form der spezifischen Ubiquitin Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die mitochondriale Morphologie zeigte keine auffälligen strukturellen Veränderungen, jedoch zeigten andere Studien morphologische Änderungen. So zeigte eine Studie verlängerte Mitochondrien in Pink1 KO Mäusen (Gautier et al. 2008). Über siRNA reduziertes Pink1 in HeLa-Zellen führte zu einer Fragmentierung und Kürzung der Mitochondrien. Zudem wiesen diese Zellen eine Veränderung der Cristae-Struktur auf (Exner et al. 2007). In einem mittels CRISPR/Cas9 generierten Pink1 KO in

Affen und Affenzellen wurden jedoch ebenfalls keine morphologischen Veränderungen der Mitochondrien und der mitochondrialen Proteinexpression beobachtet (Yang et al. 2022; Yang et al. 2019). Diese Variationen der mitochondrialen Morphologie durch den Verlust von Pink1 scheint bedingt durch die unterschiedlich gewählten Zellmodelle und Generierung der KO-Mutanten zu resultieren. So hat ein siRNA-medierter *Knockdown* möglicherweise einen kurzzeitigen, stärkeren Effekt auf die mitochondriale Morphologie, als eine konstante Pink1 KO-Zelllinie.

In den meisten Pink1 KO-Studien wird jedoch ein deutlicher Effekt auf das $\Delta\psi$ gemessen. Das Fehlen von Pink1 führt zu einer Reduktion des Membranpotenzials (Abramov et al. 2011; Gautier et al. 2008; Gegg et al. 2009), welches in der hier etablierten Zelllinie ebenfalls nachgewiesen wurde. Lediglich in Schweine Pink1 KO Modellen konnte kein starker Effekt eines Pink1-Verlustes auf das $\Delta\psi$ nachgewiesen werden (Wang et al. 2016). Gegg *et al.* konnten zudem zeigen, dass eine siRNA-vermittelte Pink1-Reduktion Auswirkungen auf die mitochondriale DNA nimmt, indem eine Verminderung der mitochondrialen DNA und dessen Synthese nachgewiesen wurden. Aufgrund dessen kann der Effekt auf die Atmungskette und der daraus resultierende Membranpotenzialdefekt erklärt werden. Die in dieser Arbeit generierten Pink1 KO-Zellen wiesen ein intermediäres Membranpotential auf. Möglicherweise führt ein stabiler Pink1 KO zur Ansammlung geschädigter Mitochondrien, sodass eine Kombination aus gesunden und erkrankten Mitochondrien parallel existiert.

In Pink1 KO Fibroblasten wurde zudem ein Anstieg der Produktionsrate von ROS gemessen (Abramov et al. 2011), welches in dem hier durchgeführten ROS-Stress Experiment nicht bestätigt wurde. Die hier generierten Pink1 KO-Zellen zeigten im Vergleich zum WT keine deutliche Anreicherung an ROS. Im Gegenteil führte verstärkter ROS-Stress durch die Chemikalie Menadion zu einer schwächeren Reaktion als der WT. Generell scheint der Pink1 KO-Phänotyp sich zwischen den Zelllinien zu unterscheiden – gerade im Hinblick auf die mitochondriale Morphologie. Gemeinsam ist jedoch die Reduktion des $\Delta\psi$, welches durch die verminderte Mitophagie geschädigter Mitochondrien erklärbar ist und es daher zu einer Ansammlung geschädigter Mitochondrien im Laufe des Zelllebenszyklus kommt. Das reduzierte Membranpotenzial ist wahrscheinlich auch der Auslöser für

die verminderte Importeffizienz in den Pink1 KO-Zellen, welche durch eine Überexpression von exogenem Pink1 nicht wieder hergestellt werden konnte. Jedoch scheint ein Pink1-Defizit in den Zellen zunächst zu einem eher milden Phänotyp zu führen. So zeigte eine Arbeitsgruppe an Pink1 KO Mäusen eine verstärkte mTOR vermittelte Autophagierate, was als ein Ausgleichsmechanismus zum KO-Phänotyp interpretiert wurde (Gómez-Sánchez et al. 2014). Eine weitere Forschungsgruppe stellte sogar die These auf, dass hauptsächlich die Pink1-Kinaseaktivität in Bezug auf die Phosphorylierung von wichtigen neurologischen Proteinen und nicht ihre mitochondriale Funktion für das neuronale Überleben der Zelle von entscheidender Bedeutung ist. Somit soll nur die Kinasedysfunktion unabhängig von der mitochondrialen Morphologie an der Pathogenese von Parkinson beteiligt sein (Yang et al. 2022).

Nachdem die Pink1 KO-Zelllinie in HeLa-Zellen generiert und charakterisiert wurde, konnte untersucht werden, ob eine Pink1-Überexpression den in dieser Arbeit beschriebenen Pink1 KO-Phänotypen ausgleichen konnte. Das exogene Pink1 zeigte jedoch keinen positiven Einfluss auf das Membranpotenzial und konnte den Importdefekt nicht beheben. Somit kann angenommen werden, dass der Pink1 KO-Phänotyp durch die transiente Intervention nicht zurückgeführt werden kann. Durch die Pink1-Überexpression selbst konnte keine klassische Pink1-Autoaktivierung und begleitend dazu die Phosphorylierung von Ubiquitin detektiert werden, obwohl Pink1_{FL} detektiert wurde. Sowohl die native Komplexbildung, Aktivierung und mitochondriale Lokalisierung des exogenem Pink1 erfolgten erst nach mitochondrialen Schäden, aber ebenfalls nicht strikt nach Inhibierung von $\Delta\psi$. Das überexprimierte Pink1 unter Kontrollbedingungen schien zudem weniger an die Mitochondrien zu lokalisieren und war sogar nach der Isolation von Mitochondrien nicht zu detektieren, was darauf schließen lässt, dass dieses nicht an die OMM bindet. Ebenso wie das endogene Pink1 führt CCCP, Valinomycin und Oligomycin zur Aktivierung und Anreicherung des überexprimierten Pink1-Flag. Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenfalls mit überexprimiertem Pink1 in HeLa WT-Zellen gezeigt werden, bei welchem das exogene Pink1 hauptsächlich nach CCCP-Behandlung in der mitochondrialen Zellfraktion nachweisbar war (Matsuda et al. 2010). Demnach benötigt die Zelle nicht nur das intakte unprozessierte Pink1_{FL} um Mitophagie einzuleiten, sondern

den Zusatz eines mitochondrialen Schadens. Dieser Mechanismus dient möglicherweise als Schutzfunktion, um unkontrollierte Mitophagie durch einen Pink1-Überschuss zu regulieren bzw. nach Ablauf des Abbaus geschädigter Mitochondrien diesen Prozess zu stoppen.

6.6 Pink1-Komplex Interaktionen

Pink1 nimmt je nach Grundzustand der mitochondrialen Fitness einen anderen Konformations- bzw. Aktivitätszustand ein. Strukturanalysen mittels Cryo-Elektronenmikroskopie von unphosphoryliertem *Pediculus humanus corporis* Pink1 (menschliche Körperlaus) beleuchteten die Pink1-Aktivierung genauer und zeigten, dass Pink1 während seiner Aktivierung verschiedene Formationen und Strukturprozesse durchläuft (Gan et al. 2022). In den hier dargestellten Expressionsanalysen von überexprimiertem Pink1 in HeLa-Zellen mit oder ohne mitochondrialem Membranpotenzial wurde deutlich, dass Pink1 an der OMM von geschädigten Mitochondrien einen Komplex ausbildet, welcher nach früheren Erkenntnissen aus Komponenten der Tom-Translokase gebildet wird. Diese Interaktion soll einen schnellen Re-Import nach Wiederherstellung des Membranpotenzials ermöglichen, damit ein überflüssiger Abbau der Mitochondrien verhindert wird (Lazarou et al. 2012). In den hier durchgeführten BN-PAGE Experimenten formt Pink1 zwei HMW-Komplexe nach CCCP-Behandlung, die jedoch nicht mit Tom40, dem porenformenden Bestandteil des Tom Komplexes, co-migrieren. Dieses Ergebnis widerspricht zunächst einer Komplexbildung zwischen Pink1 und dem Tom Komplex, was in vorherigen Studien ebenfalls beobachtet wurde (Becker et al. 2012a). Diese unterschiedlichen Ergebnisse scheinen sich jedoch aufgrund verschiedener experimenteller Methoden zu ergeben und unter der Annahme, dass Pink1 möglicherweise einen eher transienten Komplex mit dem Tom Komplex eingeht. Vielmehr wird Tom7 benötigt, um die Stabilität des Pink1-Komplexes zu gewährleisten (Sekine et al. 2019). Die meisten Pink1-Interaktionsstudien, ebenso wie die Pink1-Komplex Analysen, wurden unter Kontrollbedingungen mit einem exogenem Pink1 durchgeführt und nicht nach mitochondrialem Schaden, da angenommen wurde, dass eine Überexpression des Pink1_{FL} allein ausreichend ist, um Mitophagie zu induzieren

(Geisler et al. 2010; Rakovic et al. 2011; Weihofen et al. 2008). Auch wenn in BN-PAGE Analysen unter Kontrollbedingungen kein Pink1-Komplex an isolierten Mitochondrien detektiert werden konnte, so liegt das womöglich daran, dass das prozessierte Pink1_P teilweise in das Zytosol transloziert und dort Parkin inhibiert (Fedorowicz et al. 2014).

Nach einer Pink1-Flag Immunpräzipitation aus HEK-Zellen wurden bereits 2008 fünf weitere Proteine beschrieben, darunter Hsp90 und dessen Co-Chaperon CDC37, die beide mit Pink1 unter Normalbedingungen interagieren sollen (Weihofen et al. 2008). Ebenfalls zeigten Rakovic et al. in einer Interaktionsstudie von überexprimiertem Pink1 in HEK-Zellen 14 mögliche Interaktionspartner unter Normalbedingungen und identifizierten Tufm, Tubulin und einige Hitzeschock Proteine. Eine weitere Studie deutete jedoch darauf hin, dass sich der Pink1-Komplex ausschließlich aus Pink1-Dimeren zusammensetzt (Okatsu et al. 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführte massenspektrometrische Analyse zu Komplexpartnern von Pink1 adressierte die Fragestellung, ob sich Interaktionen zwischen dem mitochondrialen Status von normalen zu geschädigtem Membranpotenzial verändern und welche Proteine vorwiegend an der Formierung des HMW-Komplexes beteiligt sind.

Unter den identifizierten möglichen Interaktionspartnern wurde weder Parkin, DJ1 noch MFN1/2 detektiert, obwohl jeweils Interaktionen mit Pink1 beschrieben worden sind (Chen und Dorn 2013; Fedorowicz et al. 2014; Shiba et al. 2009). Allerdings konnte auch schon in BN-PAGE Analysen mit dem nativen Pink1-Komplex keine Co-Migration von Parkin, DJ1 oder MFN1/2 beobachtet werden. Dies schließt eine temporäre Interaktion nicht zwangsläufig aus, jedoch kommen diese Proteine nicht als stabiler Komplexpartner infrage. Der assemblierte Pink1-Komplex nach CCCP-Behandlung zeigte einige weitere nicht-mitochondriale mögliche Interaktionskandidaten. Zum Beispiel war das ER-assoziierte Protein Vapb angereichert, welches an den MAM-Kontaktstellen beteiligt ist und somit eine räumliche Interaktionsmöglichkeit zwischen Pink1 und Vapb durchaus zutreffen könnte (Vos et al. 2012). Dass Pink1 hauptsächlich an den MAM-Regionen akkumuliert, bekräftigt zusätzlich die Möglichkeit zwischen einer Interaktion von Pink1 und Vapb (Gelmetti et al. 2017). Diese Interaktion konnte im Zuge dieser Arbeit zusätzlich durch eine Pink1-Komplex Affinitätsstudie bestätigt werden.

Auch das Hitzeschock Protein Hsp90AA konnte als Interaktionspartner angereichert nach CCCP bestimmt werden, welches ebenfalls schon 2008 und 2010 von Imai et al. und Weihoven et al. identifiziert wurde und somit als ein putativer Interaktionspartner infrage kommt.

Die Interaktion mit dem Tom Komplex konnte in der massenspektrometrischen Analyse nur unter Normalbedingungen mit Tom40 nachgewiesen werden.

Erstaunlich war zudem, dass nach CCCP-Behandlung kaum mitochondriale Interaktionspartner nachweisbar waren. Besonders auffällig scheinen Proteine der Zytoskelett-Gruppe mit Pink1 unter Kontrollbedingungen eine Interaktion einzugehen, dessen Funktion in dieser Arbeit nicht näher betrachtet wurde. Zudem wurden deutlich mehr mitochondriale Interaktionspartner unter Kontrollbedingungen ermittelt, was diese Proteingruppe zu interessanten Kandidaten für weitere Interaktionsanalysen macht, aber als Komplexpartner ausschließt. Zum Beispiel wurde Sam50 ebenfalls eine Rolle in der Pink1-Regulierung zugeschrieben. So soll Sam50 mit Pink1 interagieren und dessen Prozessierung und Abbau erleichtern (Jian et al. 2018), einem Prozess der in Einstimmung mit den erhobenen Daten unter Normalbedingungen stattfindet. Das Cochaperon Bag2 wurde ebenfalls als Interaktionspartner während Kontrollbedingungen angereicherter ermittelt. Bag2 soll an der Degradation von Pink1 beteiligt sein, indem es die Ubiquitinylierung von Pink1 reduziert (Che et al. 2013). Das zytosolische Protein VCP wurde ebenfalls nach der massenspektrometrischen Analyse als ein Pink1-Interaktionspartner identifiziert und lag angereichert nach CCCP-Behandlung vor. Auch in der biochemischen Bindestudie konnte diese Interaktion bestätigt werden. VCP ist eine AAA-ATPase und bekannt dafür zum Abbau markierte Proteine dem Proteasom zu vermitteln (Dai und Li 2001; Ye 2006). Demnach ist VCP essenziell für den zellulären Umsatz von ER-Proteinen, aber auch OMM-Proteinen (Xu et al. 2011). In einer Studie zu VCP KO-Zellen stellte sich heraus, dass diese einen ähnlichen Phänotyp wie Pink1 und Parkin KO-Zellen ausbilden, der durch einen starken mitochondrialen Schaden gekennzeichnet war (Kim et al. 2013a). Zusätzlich zeigte eine weitere Forschungsgruppe eine physikalische Interaktion mittels Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischen Analyse zwischen Pink1 und VCP (Wang et al. 2018).

Auch wurde das bereits als Interaktionspartner postulierte Pgam5 (Imai et al. 2010) in der hier durchgeführten Studie unter Kontrollbedingungen identifiziert und im folgenden Abschnitt näher diskutiert.

6.7 Pgam5 und Pink1

Bereits 2010 zeigte eine Forschungsgruppe mittels Pink1-Überexpression eine Interaktion mit Pgam5 (Imai et al. 2010). Dies konnte im Zuge dieser Arbeit über *in vitro* Bindeanalysen bestätigt und zudem eine $\Delta\psi$ -abhängige Interaktion zwischen beiden Proteinen dargestellt werden. Der native Pgam5 Komplex zeigt keine Co-Migration mit dem nativen Pink1-Komplex und ist während der Mitophagie nicht mehr nachweisbar. Allerdings muss hier betont werden, dass dieser Versuch mit isolierten Mitochondrien durchgeführt wurde und eventuelle zytosolische Interaktionen und Komplexbildungen dadurch methodisch fehlen können. Sowohl Pgam5 als auch Pink1 sind als Spaltungssubstrate von der Innenmembran-Protease PARL bekannt und werden in Abhängigkeit eines mitochondrialen Schades gegensätzlich prozessiert (Sekine et al. 2012). Klassischerweise wird Pink1 unter Normalbedingungen von PARL prozessiert, wohingegen Pgam5 hauptsächlich prozessiert wird, wenn Pink1_{FL} akkumuliert, also unter Stressbedingungen (Sekine et al. 2012). Nicht nur die Prozessierung verläuft gegensätzlich, auch die Proteinfunktion ist antagonistisch. Pink1 als Kinase phosphoryliert Zielproteine, Pgam5 als Phosphatase dephosphoryliert Zielproteine. In humanen Zellen werden zwei Pgam5 Isoformen gebildet. Zum einen das 32 kDa lange Pgam5-L und das 28 kDa Pgam5-S, beide unterscheiden sich lediglich an ihrem C-terminus und werden N-terminal geschnitten (Cheng et al. 2021; Sekine et al. 2012). Dadurch entsteht wiederum ein 28 kDa großes Δ Pgam5-L und ein 25 kDa großes Δ Pgam5-S, sodass über die gängigen kommerziell erhältlichen Antikörper keine Differenzierung zwischen Pgam5-S und Δ Pgam5-L vorgenommen werden kann. Dennoch zeigte die Bindestudie, dass hauptsächlich die Pgam5-L Form bei intaktem Membranpotenzial mit Pink1 interagiert. Wie bereits angedeutet, sind beide Proteine als Substrat von der IMM lokalisierten Protease PARL beschrieben und sollen sogar als kompetitive Substrate agieren (Lu et al. 2014). Jedoch führte eine Pink1-Überexpression nicht

zu einer Minderung der Pgam5 Prozessierung und der Verlust im Pink1 KO nicht zu einer verstärkten Prozessierung. Ein siRNA mediierter Pink1 *knockdown* zeigte ebenfalls keine verstärkte Pgam5 Spaltung mittels PARL (Sekine et al. 2012). Eine kinetische Analyse der PARL Aktivität zeigte auf, dass Pink1 und Pgam5 zwar mit der gleichen Bindestelle konkurrieren, jedoch Pgam5 die höhere Affinität aufwies (Lysyk et al. 2021). Auch eine Inhibierung des Proteasoms, welche zur Akkumulierung von Pink1_P führt, zeigte einen schwachen Effekt auf die Pgam5 Prozessierung. Dabei reicherte die 28 kDa-Form leicht an, wobei diese Beobachtung eher ein Effekt der Proteasom-Inhibierung als der Anreicherung von Pink1_P ist. Pgam5 wird möglicherweise als Außenmembranprotein ebenfalls vom Proteasom abgebaut, sodass nach Inhibierung eine leichte Anreicherung stattfindet, die Pink1 unabhängig ist (Albert Neutzner et al. 2008). Diese Ergebnisse bestätigen, dass als physiologische Konsequenz der Pink1/Pgam5-Interaktion, Pink1 weder übergeordnet von Pgam5 agiert noch regulatorische Funktionen von Pgam5 übernimmt.

Demnach muss Pgam5 eine regulatorische Rolle auf Pink1 als physiologische Konsequenz ausüben. So kann spekuliert werden, dass unter Kontrollbedingungen die Interaktion mit Pgam5-L als Sicherheitsnetz gegen unkontrollierte Mitophagie dafür sorgt, dass das schwach exprimierte Pink1 unter physiologischen Bedingungen nicht autoaktiviert, indem Pgam5 durch seine Phosphataseaktivität dessen Phosphorylungsstatus bewacht. Tatsächlich wurde signifikant weniger Pink1 in den Pgam5 KO-Zellen detektiert, welche weder Pgam5-L noch die Pgam5-S Isoform exprimieren. Zudem war der native Pink1-Komplex deutlich weniger ausgebildet und die Aktivität in Form der Ubiquitin-Phosphorylierung korrespondierend zu der reduzierten Pink1-Menge vermindert. In einer Studie wurde die These aufgestellt, dass Pgam5 an der Komplex-Stabilität von Pink1 beteiligt sei (Imai et al. 2010; Zeb et al. 2021), jedoch ist der native Pink1-Komplex in den Pgam5 KO-Zellen lediglich weniger stark ausgeprägt anstatt fragmentiert oder mit geringerem Molekulargewicht. Die Pgam5 KO-Zellen bilden trotz geringerem Pink1-Level ein vergleichbares $\Delta\psi$ zum WT aus. Ebenfalls konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass Pgam5 nicht die Degradation von Pink1 inhibiert, indem es den Pink1-Komplex stabilisiert, da die Inhibierung des Proteasoms nicht zur Wiederherstellung des Pink1-Levels in den

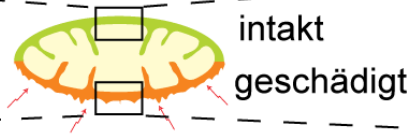
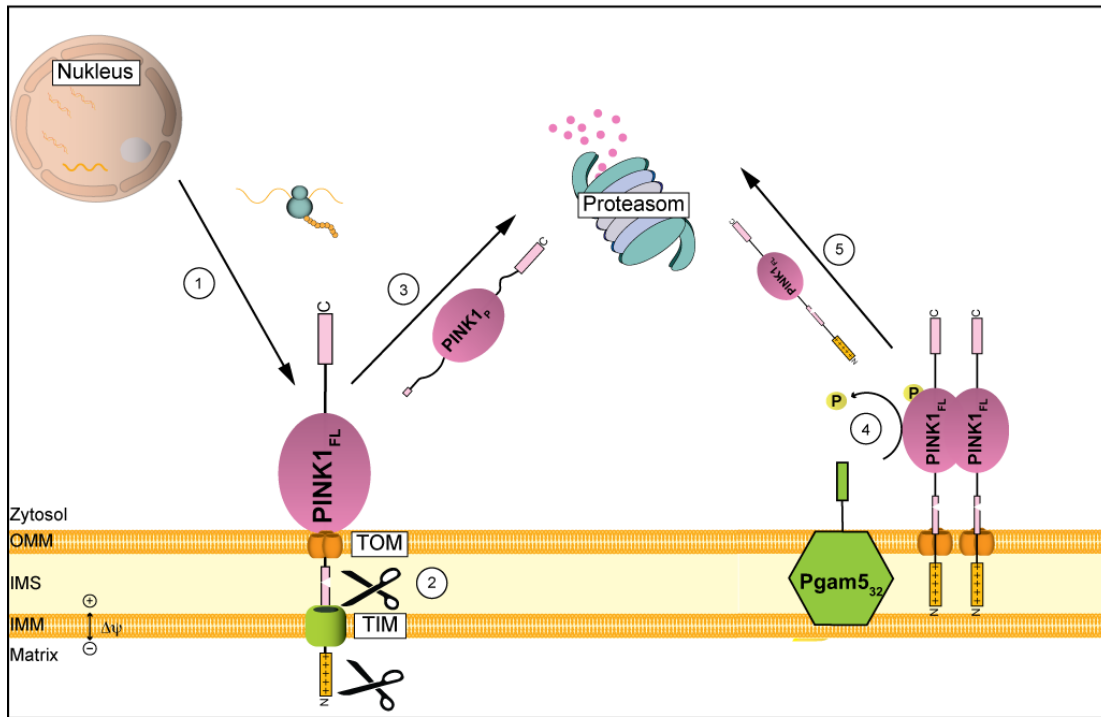
Pgam5 KO-Zellen führt. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass Pgam5 wahrscheinlich an der Expression von Pink1 beteiligt ist und nach CCCP-Behandlung möglicherweise als Expressionsverstärker dient. Dies erklärt ebenfalls, wieso im Pgam5 KO das Pink1-Level nicht vollständig fehlt. Möglicherweise reguliert Pgam5 die Pink1-Expression anhand der $\Delta\psi$ -gerichteten Prozessierung von PARL. Dementsprechend ist nicht die Prozessierung von Pgam5 abhängig von der Pink1-Akkumulierung wie zuvor erwähnt, sondern konträr, indem erst Pgam5 in Abhängigkeit des mitochondrialen Schadens prozessiert und dadurch die Pink1-Akkumulierung verstärkt wird. Unterstützend dazu zeigten weitere Studien, dass Pgam5 teilweise nach mitochondrialem Schaden ins Zytosol und den Nukleus transloziert (Bernkopf et al. 2018) und mit dem Transkriptionsfaktor FoxO3a interagiert, welcher als Transkriptionsfaktor für Pink1 bereits diskutiert wurde (Borch Jensen et al. 2017). Eine Pink1-Überexpression in den Pgam5 KO-Zellen führte in dieser Arbeit sogar zu einer verstärkten Pink1-Aktivität, obwohl das Pink1-Level quantitativ vergleichbar zum WT war. Durch die Abwesenheit von Pgam5 in Pgam5 KO-Zellen kann Pink1 unkontrolliert phosphorylieren, was durch die verstärkte Pink1-Aktivität bestätigt wird. Diese Wiederherstellung der Pink1-Aktivität durch die Überexpression von Pink1 in den Pgam5 KO-Zellen schließt zusätzlich eine Pgam5 Beteiligung an der Pink1-Komplexstabilität aus, da trotz des Fehlens von Pgam5 eine Autoaktivierung des exogenem Pink1 stattfindet. Wie bereits in diesem Abschnitt spekuliert, agiert Pgam5 durch seine Phosphatase Funktion zusätzlich auf die Pink1-Aktivität und verhindert als Sicherheitsnetz unkontrollierte Mitophagie der Pink1-Überexpression.

6.8 Neues Pink1 Regulierungsmodell und Ausblick

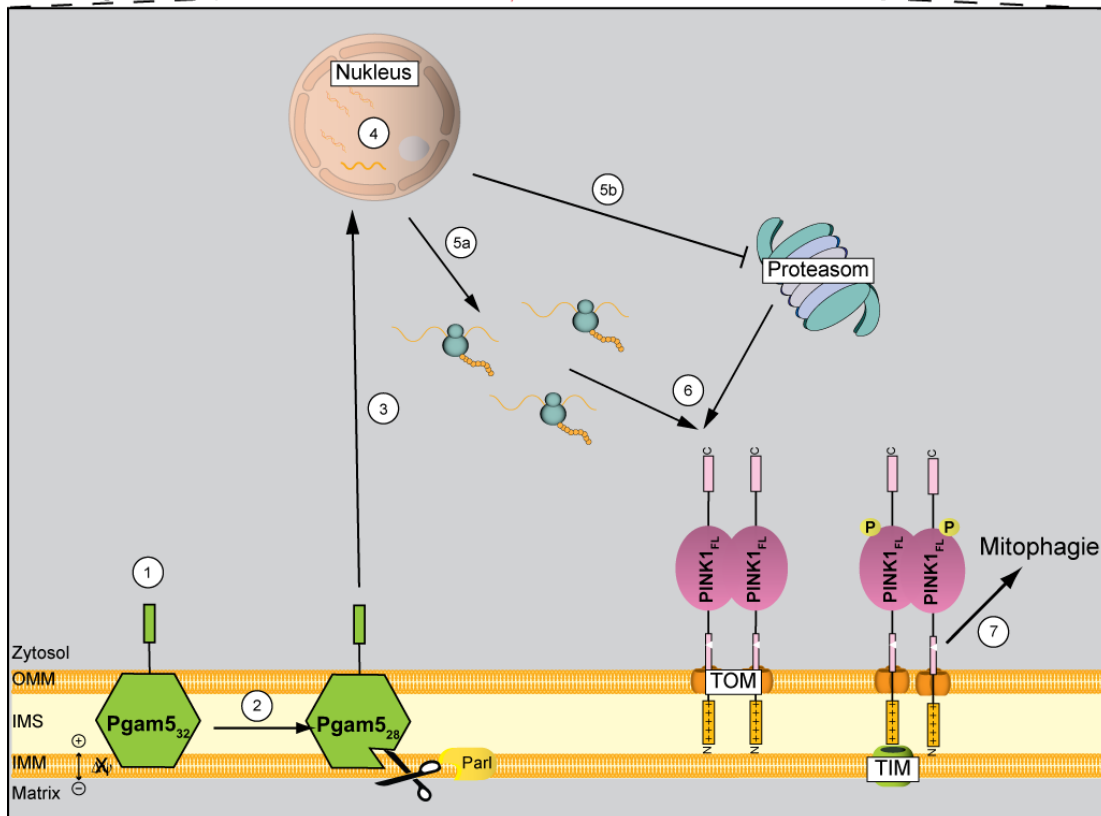
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Proteinlevel von Pink1 über mehrere Mechanismen reguliert wird, wodurch das bisherige Regulierungsmodell angepasst werden kann. Dabei muss zwischen der Regulation in intakten und geschädigten Mitochondrien differenziert werden (Abbildung 30, A und B). In intakten, unbeschädigten Mitochondrien wird Pink1 unter einer basalen Expressionsrate synthetisiert. Anschließend folgt ein partieller Import, sodass zwei proteolytische Prozessierungen durch die Protease MPP und PARL durchgeführt werden. Das verkürzte Pink1_P wird zuletzt von dem zytosolisch lokalisierten Proteasom verdaut. Gleichzeitig nimmt die OMM Phosphatase Pgam5 Einfluss auf die Pink1 Menge, um eine zufällige, unkontrollierte Mitophagie durch eine spontane Pink1-Dimer-Formierung zu verhindern. Diese beiden Prozesse zusammen sorgen für einen dauerhaften Abbau von Pink1 und wodurch die Pink1-medierte Mitophagie verhindert wird (Abbildung 30, A).

Ist die Zelle einem Pink1-induzierenden Stress ausgesetzt, wird zunächst Pgam5 zur 28 kDa schweren Form prozessiert. Diese Prozessierung könnte als zelluläres Signal eines mitochondrialen Schadens dienen und dem retrograden Signalweg von den Mitochondrien zum Nukleus partizipieren. Dort wird die Pink1-Expression über eine gesteigerte Transkriptionsrate reguliert. Gleichzeitig wird der Abbau über das Proteasom inhibiert, sodass Pink1_{FL} an der OMM akkumuliert. Eine Dimerisierung des Pink1-Proteins führt zu dessen Autoaktivierung und nachgeschalteter Induktion von Mitophagie (Abbildung 30 ,B). Damit spielen sowohl Pink1 als auch Pgam5 eine duale Rolle in der mitochondrialen QC, welche in Abhängigkeit des mitochondrialen Status stattfindet. Pink1 als mitochondrialer Stresssensor kontrolliert unter physiologischen Bedingungen den mitochondrialen Status und wird anschließend abgebaut. Gleichzeitig agiert Pgam5 als Sicherheitsnetz für unkontrollierte Pink1-medierte Mitophagie. Während mitochondrialem Schaden übernimmt Pgam5 die Rolle als Stresssensor und nimmt Einfluss auf die Pink1-Expression.

A $\Delta\psi$



B $\Delta\psi$



(Beschriftung siehe Seite 115)

Abbildung 30: Vorgeschlagenes Model der Pink1-Regulierung in intakten und geschädigten Mitochondrien.

(A) Pink1-Regulation an intakten (+ $\Delta\psi$) Mitochondrien. Pink1_{FL} wird auf einem niedrigen Level exprimiert (1) und über die Proteasen PARL und MPP prozessiert (2). Das prozessierte Pink1_P wird abgebaut über das Proteasom (3). Gleichzeitig wird fehlimportiertes und nicht prozessiertes Pink1_{FL} über die Phosphatase Pgam5 reguliert (4), sodass unkontrollierte Mitophagie verhindert wird (5). (B) Pink1-Regulation an geschädigten (- $\Delta\psi$) Mitochondrien. Mitochondrialer Stress (1) führt zur Prozessierung von Pgam5 (2), welches als *Expressions-Enhancer* von Pink1 agiert (3). Die Pink1-Transkription (4) und dessen Translation (5a) steigen an. Gleichzeitig wird der proteasomale Abbau von Pink1 gehemmt (5b). Das neusynthetisierte Pink1 akkumuliert an der mitochondrialen Außenmembran (6), formiert Dimere und aktiviert sich über Autophosphorylierung, sodass Mitophagie eingeleitet wird (7).

Anhand der neuen Erkenntnisse über die Pink1-Regulierung können zukünftig neue Rückschlüsse auf die Ätiologie von Parkinson gezogen werden. Dabei spielt die mitochondriale Phosphatase Pgam5 eine entscheidende Schlüsselrolle in der Pink1-Expression. Aber auch die in dieser Dissertation identifizierten Interaktionspartner durch die MS-Analyse könnten eine zusätzliche Rolle an der mitochondrialen QC spielen und stellen interessante Kandidaten für weiterführende Analysen dar. Möglicherweise dienen die Daten der identifizierten Kandidaten zukünftig als Früherkennungsmarker für PD oder können als Ziel einer therapeutischen Intervention für PD herangezogen werden.

Zusammenfassend könnte sich das neue Verständnis des Mechanismus und die Bedeutung der mitochondrialen Qualitätskontrolle auf ebenfalls weitverbreitete neurodegenerative Erkrankungen ausweiten, die mit mitochondrialer Dysfunktion verbunden sind wie etwa die Alzheimer-Krankheit und die Amyotrophe Lateralsklerose.

Anhang

Ergänzende Rohdaten die zu der Erstellung von den Ergebnissen aus Kapitel 5.5 Identifikation von PINK1 Interaktoren mittels SILAC Immunpräzipitation herangezogen wurden, sind der beigefügten Excel Tabelle zu entnehmen. Siehe DOI: 10.60507/FK2/TU4ARF

Kurzbeschreibung des Inhalts:

Blatt 1: Infokarte

Kurze Zusammenfassung der Berechnung der in der Dissertation dargestellten Daten.

Blatt 2: Normalisiert ohne Histone

Normalisierte Daten ohne die Proteingruppe "Histone".

Blatt 3: Normalisierte Ergebnisse

Ergebnisse, die nach der oben gelisteten Beschreibung generiert wurden.

Blatt 4: Nur DMSO

Proteingruppe, bei denen nur eine Abundanz in der DMSO-Kondition gemessen wurde.

Blatt 5: Nur CCCP

Proteingruppe, bei denen nur eine Abundanz in der CCCP-Kondition gemessen wurde.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
%	Prozent
[³⁵ S]	Radioaktives Schwefelisotop
°C	Grad Celsius
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μg	Microgramm
μL	Mikroliter
³⁵ S	Schwefelisotop 35
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVO	Antimycin A, Valinomycin, Oligomycin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cas9	engl.: CRISPR-associated endonuclease 9
Chx	Cylcoheximid
CMV	humanes Cytomegalovirus
CRISPR	engl.: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Da	Dalton
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylidol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHFRds	destabilisierte Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Abkürzungsverzeichnis

DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.:	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>lat. et alii</i>
EtOH	Ethanol
F1β	engl.: Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit
FKS	fötales Kälberserum
g	Zentrifugalkraft
Gapdh	engl.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	engl.: hour
<i>H.sapiens</i>	<i>Homo Sapiens</i>
HCl	Salzsäure
HeLa	humane Cervixkarzinom Zelllinie von Henrietta Lack
HMW	engl.: High molecular weight
Ig	Immunglobulin
IMM	Innere mitochondriale Membran
IMS	engl.: Intermembrane space
k	Kilo (10^3)
KanR	Kanamycin-Resistenz
KOH	Kaliumhydrogenoxid
KPi	Kaliumphosphat Puffer, ionisch
<i>lat.</i>	latein
LB	Luria Bertani
m	Milli (10^{-3})
M	molar
mA	Milliampere
MDV	engl.: mitochondrial derived vesicle
MeOH	Methanol
MgCl	Magnesiumchlorid
mGFP	engl.: enhanced Green fluorescent Protein with MTS

min	Minute
MM	mitochondriale Matrix
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPP	engl.: Mitochondrial-processing peptidase
M _r	relative Molekülmasse
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
MS	Quantitative Massenspektrometrie
MS	Massenspektrometrie
mt	mitochondrial
MTS	mitochondriale Zielsequenz
n	Nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nukleotid
P	Pellet
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PI	Protease Inhibitor Cocktail Plus
Pink1	engl.: PTEN-induced putative kinase 1
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PuroR	Puromycin Resistenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid Membran
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	eng.: Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur (~20°C)
s	Sekunde
SDHA	engl.: Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	engl.: sodium dodecyl sulfat-polyacrylamid gelelectrophoreses

Abkürzungsverzeichnis

SEM	Standard Fehler des Mittelwerts (engl.: standard error of the mean)
SILAC	engl.: stable isotope labelling with amino acids in cell culture
siRNA	engl.: small interfering RNA
SOD	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
Su9	ATPase Untereinheit 9 (engl.: Subunit)
t	engl.: time
T	Total
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: Tris buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
Temp.	Temperatur
Tim	engl.: Mitochondrial import inner membrane translocase
TMRE	Tetramethylrhodaminmethylester
Tom	engl.: Mitochondrial translocase of the outer membrane
Trap1	engl.: Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein
Tris	(Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	units
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/o	engl.: without
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
α-	Anti-/Gegen
Δ	Delta
Δψ	mitochondriales Membranpotenzial

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle.	6
Abbildung 2: Modell der Pink1-Prozessierung in Abhängigkeit von $\Delta\psi$	13
Abbildung 3: Aktuelles Modell der Pink1/Parkin-medierten Mitophagie.	16
Abbildung 4: Pink1-Akkumulierung nach Inhibition des Proteasoms und Membranpotenzials.	42
Abbildung 5: Visualisierung der Pink1-induzierten Mitophagie.	45
Abbildung 6: Pink1-Akkumulierung durch verschiedene Inhibitoren.	46
Abbildung 7: Effekt auf die Pink1-Akkumulierung in mitochondrialer DNA defekten Rho ⁰ Zellen.	48
Abbildung 8: Effekt von Proteinstress auf Pink1.	50
Abbildung 9: Effekt von der Depletion mitochondrialer Proteasen auf Pink1.	52
Abbildung 10: Effekt der Inhibierung des Proteasoms auf die Pink1-Akkumulierung.	54
Abbildung 11: Degradation von endogenem Pink1.	55
Abbildung 12: Effekte von Inhibitoren der zellulären Proteintranslation auf die Pink1-Expression.	58
Abbildung 13: CRISPR/Cas9 vermittelter Pink1 Knockout.	62
Abbildung 14: Morphologie der Pink1 Knockout Zellen.	63
Abbildung 15: Analyse von mitochondrialem Membranpotenzial; ROS-Stress und Import-Verhalten im Pink1 KO.	65
Abbildung 16: Pink1-Wiederherstellung in Pink1 KO-Zellen.	70
Abbildung 17: Morphologisches Verhalten von exogenem Pink1-Flag.	71
Abbildung 18: Arbeitsablauf für die quantitative massenspektrometrische Analyse des Pink1-Komplexes.	73
Abbildung 19: Affinitätsveränderung von Pink1-Interaktionspartnern nach CCCP-Behandlung.	77
Abbildung 20: Vergleich der Proteinabundanz der identifizierten Proteine mit einem Anreicherungsquotienten $\log(2)$ größer als 2.	79
Abbildung 21: Änderung der zellulären Lokalisation der Proteinanzahl und Abundanz nach CCCP-Behandlung.	80
Abbildung 22: Affinitätsaufreinigung von Pink1-His.	82

Abbildung 23: Effekt verschiedener Inhibitoren auf das Proteinlevel von Pink1 und Pgam5.....	83
Abbildung 24: $\Delta\psi$ -abhängige Pink1/Pgam5-Interaktion.....	86
Abbildung 25: Pgam5 Expression in Pink1 KO und Überexpressions-Zellen.....	87
Abbildung 26: Effekt der Pgam5 Deletion auf Pink1.....	89
Abbildung 27: Pgam5 reguliert Pink1 auf Expressionsebene.....	91
Abbildung 28: Pink1-Expression in Pgam5 KO-Zellen.	92
Abbildung 29: Pgam5 KO-Wiederherstellung mittels Pink1-Überexpression.	94
Abbildung 30: Vorgeschlagenes Model der Pink1-Regulierung in intakten und geschädigten Mitochondrien.	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der PARK-Gene die eine zugewiesene Assoziation mit der Parkinsons-Erkrankung haben*	8
Tabelle 2: Zelluläres Verhalten von Pink1 nach Zugabe verschiedener Inhibitoren	60
Tabelle 3:Auszug der identifizierten Proteine, die ausschließlich nach DMSO-Behandlung binden.	75
Tabelle 4: Identifizierte Proteine, die ausschließlich nach CCCP-Behandlung binden.	75
Tabelle 5: Identifizierte Proteine, die nach CCCP-Behandlung mit einer log(2) Verhältnis größer als 2 binden.	78

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich gekennzeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte wurden unter der Angabe der Quellen gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn,

Laura Lüdecke

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich als Doktorandin im IBMB bei allen Personen bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt und die Anfertigung meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Prof. Wolfgang Voos bedanken, der mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat. Er stand in den letzten vier Jahren unterstützend und stets mit Rat zur Seite. Zudem möchte ich mich bei Prof. Jörg Höfeld für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen, die mir während der letzten Jahre mit einem offenen Ohr und einer sehr guten Zusammenarbeit die Anfertigung meiner Arbeit erleichtert haben. Mein besonderer Dank gilt: Margarita Fuhrmann, Dr. Karen Neumann, Daniel Puchta-Schomberg, Laura Ruland und Caren Runz. Vor allem bedanke ich mich für die vielen gemeinsamen wissenschaftlichen Diskussionen, die mir oft eine weitere Sichtweise eröffnet haben, das stets offene Ohr und die vielen motivierenden Worte, aber auch die vielen schönen Erlebnisse im Labor.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei den wichtigsten Menschen, meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt und zu jeder Zeit ermutigt meine Ziele zu erreichen.

Literaturverzeichnis

Abramov, Andrey Yurevich; Gegg, Matthew; Grunewald, Anne; Wood, Nicholas William; Klein, Christine; Schapira, Anthony Henry Vernon (2011): Bioenergetic consequences of PINK1 mutations in Parkinson disease. In: *PLOS ONE* 6 (10), e25622. DOI: 10.1371/journal.pone.0025622.

Albert Neutzner; Richard J. Youle; Mariusz Karbowski (2008): Outer Mitochondrial Membrane Protein Degradation by the Proteasome. In: *Mitochondrial Biology: New Perspectives*: John Wiley & Sons, Ltd, S. 4–20.

Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; Bruijn, M. H. de; Coulson, A. R.; Drouin, J. et al. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. In: *Nature* 290 (5806), S. 457–465. DOI: 10.1038/290457a0.

Armstrong, Melissa J.; Okun, Michael S. (2020): Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. In: *JAMA* 323 (6), S. 548–560. DOI: 10.1001/jama.2019.22360.

Balchin, David; Hayer-Hartl, Manajit; Hartl, F. Ulrich (2016): In vivo aspects of protein folding and quality control. In: *Science (New York, N.Y.)* 353 (6294), aac4354. DOI: 10.1126/science.aac4354.

Bayne, Andrew N.; Trempe, Jean-François (2019): Mechanisms of PINK1, ubiquitin and Parkin interactions in mitochondrial quality control and beyond. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (23), S. 4589–4611. DOI: 10.1007/s00018-019-03203-4.

Becker, Dorothea; Richter, Judith; Tocilescu, Maja A.; Przedborski, Serge; Voos, Wolfgang (2012a): Pink1 kinase and its membrane potential ($\Delta\psi$)-dependent cleavage product both localize to outer mitochondrial membrane by unique targeting mode. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (27), S. 22969–22987. DOI: 10.1074/jbc.M112.365700.

Becker, Thomas; Böttinger, Lena; Pfanner, Nikolaus (2012b): Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. In: *Trends in biochemical sciences* 37 (3), S. 85–91. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.11.004.

- Bender, Andreas; Krishnan, Kim J.; Morris, Christopher M.; Taylor, Geoffrey A.; Reeve, Amy K.; Perry, Robert H. et al. (2006): High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. In: *Nature genetics* 38 (5), S. 515–517. DOI: 10.1038/ng1769.
- Bernkopf, Dominic B.; Jalal, Kowcee; Brückner, Martina; Knaup, Karl X.; Gentzel, Marc; Schambony, Alexandra; Behrens, Jürgen (2018): Pgam5 released from damaged mitochondria induces mitochondrial biogenesis via Wnt signaling. In: *The Journal of cell biology* 217 (4), S. 1383–1394. DOI: 10.1083/jcb.201708191.
- Berry, C.; La Vecchia, C.; Nicotera, P. (2010): Paraquat and Parkinson's disease. In: *Cell Death Differ* 17 (7), S. 1115–1125. DOI: 10.1038/cdd.2009.217.
- Bingol, Baris; Tea, Joy S.; Phu, Lilian; Reichelt, Mike; Bakalarski, Corey E.; Song, Qinghua et al. (2014): The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. In: *Nature* 510 (7505), S. 370–375. DOI: 10.1038/nature13418.
- Bogorodskiy, Andrey; Okhrimenko, Ivan; Burkatovskii, Dmitrii; Jakobs, Philipp; Maslov, Ivan; Gordeliy, Valentin et al. (2021): Role of Mitochondrial Protein Import in Age-Related Neurodegenerative and Cardiovascular Diseases. In: *Cells* 10 (12). DOI: 10.3390/cells10123528.
- Borch Jensen, Martin; Qi, Yanyan; Riley, Rebeccah; Rabkina, Liya; Jasper, Heinrich (2017): PGAM5 promotes lasting FoxO activation after developmental mitochondrial stress and extends lifespan in *Drosophila*. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.26952.
- Bouman, L.; Schlierf, A.; Lutz, A. K.; Shan, J.; Deinlein, A.; Kast, J. et al. (2011): Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. In: *Cell death and differentiation* 18 (5), S. 769–782. DOI: 10.1038/cdd.2010.142.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bruderek, Michael; Jaworek, Witold; Wilkening, Anne; Rüb, Cornelia; Cenini, Giovanna; Förtsch, Arion et al. (2018): IMiQ: a novel protein quality control

compartment protecting mitochondrial functional integrity. In: *Molecular biology of the cell* 29 (3), S. 256–269. DOI: 10.1091/mbc.E17-01-0027.

Budenholzer, Lauren; Cheng, Chin Leng; Li, Yanjie; Hochstrasser, Mark (2017): Proteasome Structure and Assembly. In: *Journal of molecular biology* 429 (22), S. 3500–3524. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.05.027.

Bueno, Marta; Brands, Judith; Voltz, Lauren; Fiedler, Kaitlin; Mays, Brenton; St Croix, Claudette et al. (2018): ATF3 represses PINK1 gene transcription in lung epithelial cells to control mitochondrial homeostasis. In: *Aging cell* 17 (2). DOI: 10.1111/accel.12720.

Burman, Jonathon L.; Pickles, Sarah; Wang, Chunxin; Sekine, Shiori; Vargas, Jose Norberto S.; Zhang, Zhe et al. (2017): Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. In: *The Journal of cell biology* 216 (10), S. 3231–3247. DOI: 10.1083/jcb.201612106.

Cardona, Fernando; Sánchez-Mut, Jose Vicente; Dopazo, Hernán; Pérez-Tur, Jordi (2011): Phylogenetic and in silico structural analysis of the Parkinson disease-related kinase PINK1. In: *Human mutation* 32 (4), S. 369–378. DOI: 10.1002/humu.21444.

Chandel, Navdeep S.; Schumacker, Paul T. (1999): Cells depleted of mitochondrial DNA (p 0) yield insight into physiological mechanisms. In: *FEBS Letters* 454 (3), S. 173–176. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00783-8.

Che, Xiangqian; Tang, Beisha; Wang, Xuejing; Chen, Dong; Yan, Xinxiang; Jiang, Hong et al. (2013): The BAG2 protein stabilises PINK1 by decreasing its ubiquitination. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441 (2), S. 488–492. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.086.

Chen, Yun; Dorn, Gerald W. (2013): PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. In: *Science (New York, N.Y.)* 340 (6131), S. 471–475. DOI: 10.1126/science.1231031.

Cheng, Meiyu; Lin, Nan; Dong, Delu; Ma, Jiaoyan; Su, Jing; Sun, Liankun (2021): PGAM5: A crucial role in mitochondrial dynamics and programmed cell death. In: *European journal of cell biology* 100 (1), S. 151144. DOI: 10.1016/j.ejcb.2020.151144.

Chiti, Fabrizio; Dobson, Christopher M. (2017): Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. In: *Annual review of biochemistry* 86, S. 27–68. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.

Criddle, David N.; Gillies, Stuart; Baumgartner-Wilson, Heidi K.; Jaffar, Mohammed; Chinje, Edwin C.; Passmore, Sarah et al. (2006): Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (52), S. 40485–40492. DOI: 10.1074/jbc.M607704200.

Crowley, Lisa C.; Christensen, Melinda E.; Waterhouse, Nigel J. (2016): Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2016 (12). DOI: 10.1101/pdb.prot087361.

Dai, R. M.; Li, C. C. (2001): Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. In: *Nature cell biology* 3 (8), S. 740–744. DOI: 10.1038/35087056.

Deas, Emma; Plun-Favreau, Helene; Gandhi, Sonia; Desmond, Howard; Kjaer, Svend; Loh, Samantha H. Y. et al. (2011): PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. In: *Human molecular genetics* 20 (5), S. 867–879. DOI: 10.1093/hmg/ddq526.

Dijk, Sas N.; Protasoni, Margherita; Elpidorou, Marilena; Kroon, Albert M.; Taanman, Jan-Willem (2020): Mitochondria as target to inhibit proliferation and induce apoptosis of cancer cells: the effects of doxycycline and gemcitabine. In: *Sci Rep* 10 (1), S. 4363. DOI: 10.1038/s41598-020-61381-9.

Ding, Wen-Xing; Yin, Xiao-Ming (2012): Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. In: *Biological chemistry* 393 (7), S. 547–564. DOI: 10.1515/hsz-2012-0119.

dos Santos, Nathalia Vieira; Saponi, Carolina Falaschi; Ryan, Timothy M.; Primo, Fernando L.; Greaves, Tamar L.; Pereira, Jorge F. B. (2020): Reversible and irreversible fluorescence activity of the Enhanced Green Fluorescent Protein in pH: Insights for the development of pH-biosensors. In: *International Journal of*

Biological Macromolecules 164, S. 3474–3484. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.224.

Duan, Xiaoling; Tong, Jade; Xu, Qin; Wu, Yili; Cai, Fang; Li, Tingyu; Song, Weihong (2014): Upregulation of human PINK1 gene expression by NFκB signalling. In: *Molecular brain* 7, S. 57. DOI: 10.1186/s13041-014-0057-y.

Etlinger, J. D.; Goldberg, A. L. (1977): A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (1), S. 54–58. DOI: 10.1073/pnas.74.1.54.

Exner, Nicole; Treske, Bettina; Paquet, Dominik; Holmström, Kira; Schiesling, Carola; Gispert, Suzana et al. (2007): Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (45), S. 12413–12418. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007.

Fedorowicz, Maja A.; Vries-Schneider, Rosa L. A. de; Rüb, Cornelia; Becker, Dorothea; Huang, Yong; Zhou, Chun et al. (2014): Cytosolic cleaved PINK1 represses Parkin translocation to mitochondria and mitophagy. In: *EMBO reports* 15 (1), S. 86–93. DOI: 10.1002/embr.201337294.

Gan, Zhong Yan; Callegari, Sylvie; Cobbold, Simon A.; Cotton, Thomas R.; Mlodzianoski, Michael J.; Schubert, Alexander F. et al. (2022): Activation mechanism of PINK1. In: *Nature* 602 (7896), S. 328–335. DOI: 10.1038/s41586-021-04340-2.

Gautier, Clement A.; Kitada, Tohru; Shen, Jie (2008): Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32), S. 11364–11369. DOI: 10.1073/pnas.0802076105.

Gegg, Matthew E.; Cooper, J. Mark; Chau, Kai-Yin; Rojo, Manuel; Schapira, Anthony H. V.; Taanman, Jan-Willem (2010): Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. In: *Human molecular genetics* 19 (24), S. 4861–4870. DOI: 10.1093/hmg/ddq419.

- Gegg, Matthew E.; Cooper, J. Mark; Schapira, Anthony H. V.; Taanman, Jan-Willem (2009): Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. In: *PloS one* 4 (3), e4756. DOI: 10.1371/journal.pone.0004756.
- Geisler, Sven; Holmström, Kira M.; Treis, Angela; Skujat, Diana; Weber, Stephanie S.; Fiesel, Fabienne C. et al. (2010): The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. In: *Autophagy* 6 (7), S. 871–878. DOI: 10.4161/auto.6.7.13286.
- Geissler, A.; Krimmer, T.; Bömer, U.; Guiard, B.; Rassow, J.; Pfanner, N. (2000): Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. In: *MBoC* 11 (11), S. 3977–3991. DOI: 10.1091/mbc.11.11.3977.
- Gelmetti, Vania; Rosa, Priscilla de; Torosantucci, Liliana; Marini, Elettra Sara; Romagnoli, Alessandra; Di Rienzo, Martina et al. (2017): PINK1 and BECN1 relocalize at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. In: *Autophagy* 13 (4), S. 654–669. DOI: 10.1080/15548627.2016.1277309.
- Gilkerson, Robert W.; Vries, Rosa L. A. de; Lebot, Paul; Wikstrom, Jakob D.; Torgyeges, Edina; Shirihai, Orian S. et al. (2012): Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition. In: *Hum Mol Genet* 21 (5), S. 978–990. DOI: 10.1093/hmg/ddr529.
- Gispert, Suzana; Ricciardi, Filomena; Kurz, Alexander; Azizov, Mekhman; Hoepken, Hans-Hermann; Becker, Dorothea et al. (2009): Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. In: *PloS one* 4 (6), e5777. DOI: 10.1371/journal.pone.0005777.
- Gómez-Sánchez, Rubén; Gegg, Matthew E.; Bravo-San Pedro, José M.; Niso-Santano, Mireia; Alvarez-Erviti, Lydia; Pizarro-Estrella, Elisa et al. (2014): Mitochondrial impairment increases FL-PINK1 levels by calcium-dependent gene

expression. In: *Neurobiology of disease* 62, S. 426–440. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.10.021.

Greene, Andrew W.; Grenier, Karl; Aguilera, Miguel A.; Muise, Stephanie; Farazifard, Rasoul; Haque, M. Emdadul et al. (2012): Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. In: *EMBO reports* 13 (4), S. 378–385. DOI: 10.1038/embor.2012.14.

Guardia-Laguarta, Cristina; Liu, Yuhui; Lauritzen, Knut H.; Erdjument-Bromage, Hediye; Martin, Brittany; Swayne, Theresa C. et al. (2019): PINK1 Content in Mitochondria is Regulated by ER-Associated Degradation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 39 (36), S. 7074–7085. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1691-18.2019.

Guo, Chunyan; Sun, Li; Chen, Xueping; Zhang, Danshen (2013): Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. In: *Neural Regeneration Research* 8 (21), S. 2003–2014. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009.

Hartl, F. Ulrich; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In: *Nature* 475 (7356), S. 324–332. DOI: 10.1038/nature10317.

Hirota, Yuko; Yamashita, Shun-ichi; Kurihara, Yusuke; Jin, Xiulian; Aihara, Masamune; Saigusa, Tetsu et al. (2015): Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways. In: *Autophagy* 11 (2), S. 332–343. DOI: 10.1080/15548627.2015.1023047.

Imai, Yuzuru; Kanao, Tomoko; Sawada, Tomoyo; Kobayashi, Yoshito; Moriwaki, Yasuhiro; Ishida, Yosuke et al. (2010): The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. In: *PLoS genetics* 6 (12), e1001229. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001229.

Jian, Fenglei; Chen, Dan; Chen, Li; Yan, Chaojun; Lu, Bin; Zhu, Yushan et al. (2018): Sam50 Regulates PINK1-Parkin-Mediated Mitophagy by Controlling PINK1 Stability and Mitochondrial Morphology. In: *Cell reports* 23 (10), S. 2989–3005. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.015.

Jin, Seok Min; Lazarou, Michael; Wang, Chunxin; Kane, Lesley A.; Narendra, Derek P.; Youle, Richard J. (2010): Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. In: *The Journal of cell biology* 191 (5), S. 933–942. DOI: 10.1083/jcb.201008084.

Jin, Seok Min; Youle, Richard J. (2013): The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. In: *Autophagy* 9 (11), S. 1750–1757. DOI: 10.4161/auto.26122.

Kalia, Lorraine V.; Lang, Anthony E. (2015): Parkinson's disease. In: *Lancet (London, England)* 386 (9996), S. 896–912. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

Katayama, Hiroyuki; Kogure, Takako; Mizushima, Noboru; Yoshimori, Tamotsu; Miyawaki, Atsushi (2011): A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. In: *Chemistry & Biology* 18 (8), S. 1042–1052. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.05.013.

Kim, Jaekwang; Fiesel, Fabienne C.; Belmonte, Krystal C.; Hudec, Roman; Wang, Wang-Xia; Kim, Chaeyoung et al. (2016): miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1). In: *Mol Neurodegeneration* 11 (1), S. 55. DOI: 10.1186/s13024-016-0121-4.

Kim, Nam Chul; Tresse, Emilie; Kolaitis, Regina-Maria; Molliex, Amandine; Thomas, Ruth E.; Alami, Nael H. et al. (2013a): VCP is essential for mitochondrial quality control by PINK1/Parkin and this function is impaired by VCP mutations. In: *Neuron* 78 (1), S. 65–80. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.02.029.

Kim, Seong-Jun; Syed, Gulam H.; Siddiqui, Aleem (2013b): Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. In: *PLOS Pathogens* 9 (3), e1003285. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003285.

King, M. P.; Attardi, G. (1989): Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. In: *Science (New York, N.Y.)* 246 (4929), S. 500–503. DOI: 10.1126/science.2814477.

Klein, Christine; Westenberger, Ana (2012): Genetics of Parkinson's disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (1), a008888. DOI: 10.1101/cshperspect.a008888.

Kondapalli, Chandana; Kazlauskaitė, Agnė; Zhang, Ning; Woodroof, Helen I.; Campbell, David G.; Gurlay, Robert et al. (2012): PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. In: *Open Biology* 2 (5), S. 120080. DOI: 10.1098/rsob.120080.

Kouli, Antonina; Torsney, Kelli M.; Kuan, Wei-Li (2018): Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. Hg. v. Thomas B. Stoker und Julia C. Greenland. Brisbane (AU).

Koyano, Fumika; Okatsu, Kei; Kosako, Hidetaka; Tamura, Yasushi; Go, Etsu; Kimura, Mayumi et al. (2014): Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. In: *Nature* 510 (7503), S. 162–166. DOI: 10.1038/nature13392.

Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W.; Irwin, I. (1983): Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 219 (4587), S. 979–980. DOI: 10.1126/science.6823561.

Lau, Lonneke M. L. de; Breteler, Monique M. B. (2006): Epidemiology of Parkinson's disease. In: *The Lancet. Neurology* 5 (6), S. 525–535. DOI: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.

Lazarou, Michael; Jin, Seok Min; Kane, Lesley A.; Youle, Richard J. (2012): Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. In: *Developmental cell* 22 (2), S. 320–333. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.12.014.

Lemasters, John J. (2014): Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). In: *Redox biology* 2, S. 749–754. DOI: 10.1016/j.redox.2014.06.004.

Lin, Michael T.; Beal, M. Flint (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. In: *Nature* 443 (7113), S. 787–795. DOI: 10.1038/nature05292.

- Lin, William; Kang, Un Jung (2008): Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. In: *Journal of neurochemistry* 106 (1), S. 464–474. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05398.x.
- Liu, Yuhui; Guardia-Laguarta, Cristina; Yin, Jiang; Erdjument-Bromage, Hediye; Martin, Brittany; James, Michael et al. (2017): The Ubiquitination of PINK1 Is Restricted to Its Mature 52-kDa Form. In: *Cell reports* 20 (1), S. 30–39. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.06.022.
- Lohret, T. A.; Jensen, R. E.; Kinnally, K. W. (1997): Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. In: *J Cell Biol* 137 (2), S. 377–386. DOI: 10.1083/jcb.137.2.377.
- Lopez, J.; Tait, S. W. G. (2015): Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. In: *Br J Cancer* 112 (6), S. 957–962. DOI: 10.1038/bjc.2015.85.
- Lopez, Mary F.; Kristal, Bruce S.; Chernokalskaya, Elena; Lazarev, Alexander; Shestopalov, Alex I.; Bogdanova, Alla; Robinson, Myra (2000): High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. In: *Electrophoresis* 21 (16), S. 3427–3440. DOI: 10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3427::AID-ELPS3427>3.0.CO;2-L.
- Lu, Wei; Karuppagounder, Senthilkumar S.; Springer, Danielle A.; Allen, Michele D.; Zheng, Lixin; Chao, Brittany et al. (2014): Genetic deficiency of the mitochondrial protein PGAM5 causes a Parkinson's-like movement disorder. In: *Nature communications* 5, S. 4930. DOI: 10.1038/ncomms5930.
- Lysyk, Laine; Brassard, Raelynn; Arutyunova, Elena; Siebert, Verena; Jiang, Zhenze; Takyi, Emmanuella et al. (2021): Insights into the catalytic properties of the mitochondrial rhomboid protease PARL. In: *The Journal of biological chemistry* 296, S. 100383. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100383.
- Martindale, D.; Hackam, A.; Wieczorek, A.; Ellerby, L.; Wellington, C.; McCutcheon, K. et al. (1998): Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. In: *Nature genetics* 18 (2), S. 150–154. DOI: 10.1038/ng0298-150.

Matsuda, Noriyuki; Sato, Shigeto; Shiba, Kahori; Okatsu, Kei; Saisho, Keiko; Gautier, Clement A. et al. (2010): PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. In: *The Journal of cell biology* 189 (2), S. 211–221. DOI: 10.1083/jcb.200910140.

McLelland, Gian-Luca; Lee, Sydney A.; McBride, Heidi M.; Fon, Edward A. (2016): Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system. In: *The Journal of cell biology* 214 (3), S. 275–291. DOI: 10.1083/jcb.201603105.

McLelland, Gian-Luca; Soubannier, Vincent; Chen, Carol X.; McBride, Heidi M.; Fon, Edward A. (2014): Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. In: *The EMBO journal* 33 (4), S. 282–295. DOI: 10.1002/emboj.201385902.

McWilliams, Thomas G.; Prescott, Alan R.; Allen, George F. G.; Tamjar, Jevgenia; Munson, Michael J.; Thomson, Calum et al. (2016): mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. In: *The Journal of cell biology* 214 (3), S. 333–345. DOI: 10.1083/jcb.201603039.

McWilliams, Thomas G.; Prescott, Alan R.; Montava-Garriga, Lambert; Ball, Graeme; Singh, François; Barini, Erica et al. (2018): Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. In: *Cell metabolism* 27 (2), 439-449.e5. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.12.008.

Mei, Yang; Zhang, Yiru; Yamamoto, Kazuo; Xie, Wei; Mak, Tak W.; You, Han (2009): FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13), S. 5153–5158. DOI: 10.1073/pnas.0901104106.

Meissner, Cathrin; Lorenz, Holger; Weihofen, Andreas; Selkoe, Dennis J.; Lemberg, Marius K. (2011): The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. In: *Journal of neurochemistry* 117 (5), S. 856–867. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07253.x.

Miyazono, Yoshihiro; Hirashima, Shingo; Ishihara, Naotada; Kusukawa, Jingo; Nakamura, Kei-ichiro; Ohta, Keisuke (2018): Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. In: *Sci Rep* 8 (1), S. 350. DOI: 10.1038/s41598-017-18582-6.

Mohanraj, Karthik; Nowicka, Urszula; Chacinska, Agnieszka (2020): Mitochondrial control of cellular protein homeostasis. In: *The Biochemical journal* 477 (16), S. 3033–3054. DOI: 10.1042/BCJ20190654.

Murata, Hitoshi; Takamatsu, Hitoshi; Liu, Sulai; Kataoka, Ken; Huh, Nam-Ho; Sakaguchi, Masakiyo (2015): NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. In: *PLOS ONE* 10 (11), e0142438. DOI: 10.1371/journal.pone.0142438.

Murphy, Michael P. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. In: *The Biochemical journal* 417 (1), S. 1–13. DOI: 10.1042/BJ20081386.

Narayan, Shilpa; Liew, Zeyan; Bronstein, Jeff M.; Ritz, Beate (2017): Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study. In: *Environment international* 107, S. 266–273. DOI: 10.1016/j.envint.2017.04.010.

Narendra, Derek; Tanaka, Atsushi; Suen, Der-Fen; Youle, Richard J. (2008): Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. In: *The Journal of cell biology* 183 (5), S. 795–803. DOI: 10.1083/jcb.200809125.

Narendra, Derek P.; Jin, Seok Min; Tanaka, Atsushi; Suen, Der-Fen; Gautier, Clement A.; Shen, Jie et al. (2010): PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. In: *PLoS biology* 8 (1), e1000298. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000298.

Nicklas, W. J.; Vyas, I.; Heikkila, R. E. (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. In: *Life sciences* 36 (26), S. 2503–2508. DOI: 10.1016/0024-3205(85)90146-8.

Nunnari, Jodi; Suomalainen, Anu (2012): Mitochondria: in sickness and in health. In: *Cell* 148 (6), S. 1145–1159. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.035.

Okatsu, Kei; Kimura, Mayumi; Oka, Toshihiko; Tanaka, Keiji; Matsuda, Noriyuki (2015): Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. In: *Journal of cell science* 128 (5), S. 964–978. DOI: 10.1242/jcs.161000.

Okatsu, Kei; Oka, Toshihiko; Iguchi, Masahiro; Imamura, Kenji; Kosako, Hidetaka; Tani, Naoki et al. (2012): PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. In: *Nature communications* 3, S. 1016. DOI: 10.1038/ncomms2016.

Okatsu, Kei; Uno, Midori; Koyano, Fumika; Go, Etsu; Kimura, Mayumi; Oka, Toshihiko et al. (2013): A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (51), S. 36372–36384. DOI: 10.1074/jbc.M113.509653.

Ordureau, Alban; Heo, Jin-Mi; Duda, David M.; Paulo, Joao A.; Olszewski, Jennifer L.; Yanishevski, David et al. (2015): Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (21), S. 6637–6642. DOI: 10.1073/pnas.1506593112.

Ordureau, Alban; Paulo, Joao A.; Zhang, Wei; Ahfeldt, Tim; Zhang, Jiuchun; Cohn, Erin F. et al. (2018): Dynamics of PARKIN-Dependent Mitochondrial Ubiquitylation in Induced Neurons and Model Systems Revealed by Digital Snapshot Proteomics. In: *Molecular cell* 70 (2), 211-227.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.03.012.

Oughtred, Rose; Rust, Jennifer; Chang, Christie; Breitkreutz, Bobby-Joe; Stark, Chris; Willems, Andrew et al. (2021): The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 30 (1), S. 187–200. DOI: 10.1002/pro.3978.

- Paillusson, Sebastien; Stoica, Radu; Gomez-Suaga, Patricia; Lau, Dawn H. W.; Mueller, Sarah; Miller, Tanya; Miller, Christopher C. J. (2016): There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. In: *Trends in Neurosciences* 39 (3), S. 146–157. DOI: 10.1016/j.tins.2016.01.008.
- Park, Yun Sun; Choi, Su Eun; Koh, Hyun Chul (2018): PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction. In: *Toxicology letters* 284, S. 120–128. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.12.004.
- Pickrell, Alicia M.; Youle, Richard J. (2015): The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. In: *Neuron* 85 (2), S. 257–273. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.12.007.
- Pollecker, Karen; Sylvester, Marc; Voos, Wolfgang (2021): Proteomic analysis demonstrates the role of the quality control protease LONP1 in mitochondrial protein aggregation. In: *The Journal of biological chemistry* 297 (4), S. 101134. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101134.
- Rakovic, Aleksandar; Grünewald, Anne; Voges, Lisa; Hofmann, Sarah; Orolicki, Slobodanka; Lohmann, Katja; Klein, Christine (2011): PINK1-Interacting Proteins: Proteomic Analysis of Overexpressed PINK1. In: *Parkinson's disease* 2011, S. 153979. DOI: 10.4061/2011/153979.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rasool, Shafqat; Soya, Naoto; Truong, Luc; Croteau, Nathalie; Lukacs, Gergely L.; Trempe, Jean-François (2018): PINK1 autophosphorylation is required for ubiquitin recognition. In: *EMBO reports* 19 (4). DOI: 10.15252/embr.201744981.
- Requejo-Aguilar, Raquel; Lopez-Fabuel, Irene; Jimenez-Blasco, Daniel; Fernandez, Emilio; Almeida, Angeles; Bolaños, Juan P. (2015): DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1. In: *The Biochemical journal* 467 (2), S. 303–310. DOI: 10.1042/BJ20141025.

Ross, Christopher A.; Poirier, Michelle A. (2004): Protein aggregation and neurodegenerative disease. In: *Nat Med* 10 Suppl (7), S10-7. DOI: 10.1038/nm1066.

Rüb, Cornelia: The Parkinson's disease-related kinase Pink1 mediates mitochondrial quality control.

Rüb, Cornelia; Wilkening, Anne; Voos, Wolfgang (2017): Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. In: *Cell and tissue research* 367 (1), S. 111–123. DOI: 10.1007/s00441-016-2485-8.

Sadatomi, Daichi; Tanimura, Susumu; Ozaki, Kei-Ichi; Takeda, Kohsuke (2013): Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. In: *International journal of molecular sciences* 14 (3), S. 4596–4612. DOI: 10.3390/ijms14034596.

Sagan, Lynn (1967): On the origin of mitosing cells. In: *Journal of Theoretical Biology* 14 (3), 225-IN6. DOI: 10.1016/0022-5193(67)90079-3.

Schägger, Hermann; Jagow, Gebhard von (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. In: *Analytical biochemistry* 199 (2), S. 223–231. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90094-a.

Schubert, Susanna; Heller, Sandra; Löffler, Birgit; Schäfer, Ingo; Seibel, Martina; Villani, Gaetano; Seibel, Peter (2015): Generation of Rho Zero Cells: Visualization and Quantification of the mtDNA Depletion Process. In: *International journal of molecular sciences* 16 (5), S. 9850–9865. DOI: 10.3390/ijms16059850.

Sekine, Shiori; Kanamaru, Yusuke; Koike, Masato; Nishihara, Ayako; Okada, Masahiro; Kinoshita, Hideyuki et al. (2012): Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (41), S. 34635–34645. DOI: 10.1074/jbc.M112.357509.

Sekine, Shiori; Wang, Chunxin; Sideris, Dionisia P.; Bunker, Eric; Zhang, Zhe; Youle, Richard J. (2019): Reciprocal Roles of Tom7 and OMA1 during Mitochondrial Import and Activation of PINK1. In: *Molecular cell* 73 (5), 1028-1043.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.01.002.

- Sengupta, Arunima; Molkenin, Jeffery D.; Paik, Ji-Hye; DePinho, Ronald A.; Yutzey, Katherine E. (2011): FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (9), S. 7468–7478. DOI: 10.1074/jbc.M110.179242.
- Shi, Guang; Lee, Jeffrey R.; Grimes, David A.; Racacho, Lemuel; Ye, David; Yang, Howard et al. (2011): Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease. In: *Human molecular genetics* 20 (10), S. 1966–1974. DOI: 10.1093/hmg/ddr077.
- Shiba, Kahori; Arai, Takeo; Sato, Shigeto; Kubo, Shin-ichiro; Ohba, Yusuke; Mizuno, Yoshikuni; Hattori, Nobutaka (2009): Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (3), S. 331–335. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.04.006.
- Shiba-Fukushima, Kahori; Imai, Yuzuru; Yoshida, Shigeharu; Ishihama, Yasushi; Kanao, Tomoko; Sato, Shigeto; Hattori, Nobutaka (2012): PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. In: *Scientific reports* 2, S. 1002. DOI: 10.1038/srep01002.
- Silvestri, Laura; Caputo, Viviana; Bellacchio, Emanuele; Atorino, Luigia; Dallapiccola, Bruno; Valente, Enza Maria; Casari, Giorgio (2005): Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. In: *Human molecular genetics* 14 (22), S. 3477–3492. DOI: 10.1093/hmg/ddi377.
- Takatori, Sho; Ito, Genta; Iwatsubo, Takeshi (2008): Cytoplasmic localization and proteasomal degradation of N-terminally cleaved form of PINK1. In: *Neuroscience letters* 430 (1), S. 13–17. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.10.019.
- Tanaka, Atsushi; Cleland, Megan M.; Xu, Shan; Narendra, Derek P.; Suen, Der-Fen; Karbowski, Mariusz; Youle, Richard J. (2010): Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. In: *The Journal of cell biology* 191 (7), S. 1367–1380. DOI: 10.1083/jcb.201007013.
- Tang, Beisha; Xiong, Hui; Sun, Ping; Zhang, Yuhu; Wang, Danling; Hu, Zhengmao et al. (2006): Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic

- inheritance of early-onset Parkinson's disease. In: *Hum Mol Genet* 15 (11), S. 1816–1825. DOI: 10.1093/hmg/ddl104.
- Thomas, Ruth E.; Andrews, Laurie A.; Burman, Jonathon L.; Lin, Wen-Yang; Pallanck, Leo J. (2014): PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix. In: *PLoS genetics* 10 (5), e1004279. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004279.
- Unoki, M.; Nakamura, Y. (2001): Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. In: *Oncogene* 20 (33), S. 4457–4465. DOI: 10.1038/sj.onc.1204608.
- Valente, E. M.; Bentivoglio, A. R.; Dixon, P. H.; Ferraris, A.; Ialongo, T.; Frontali, M. et al. (2001): Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. In: *American journal of human genetics* 68 (4), S. 895–900. DOI: 10.1086/319522.
- Valente, Enza Maria; Abou-Sleiman, Patrick M.; Caputo, Viviana; Muqit, Miratul M. K.; Harvey, Kirsten; Gispert, Suzana et al. (2004): Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5674), S. 1158–1160. DOI: 10.1126/science.1096284.
- van Vliet, Alexander R.; Agostinis, Patrizia (2017): Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. In: *Coordinating Organismal Physiology Through the Unfolded Protein Response*: Springer, Cham, S. 73–102. Online verfügbar unter https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2017_2.
- Vance, J. E. (1990): Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (13), S. 7248–7256.
- Vance, Jean E. (2014): MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. In: *Biochimica et biophysica acta* 1841 (4), S. 595–609. DOI: 10.1016/j.bbailip.2013.11.014.
- Voos, Wolfgang (2013): Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2), S. 388–399. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.005.

- Voos, Wolfgang; Jaworek, Witold; Wilkening, Anne; Bruderek, Michael (2016): Protein quality control at the mitochondrion. In: *Essays in biochemistry* 60 (2), S. 213–225. DOI: 10.1042/EBC20160009.
- Voos, Wolfgang; Pollecker, Karen (2020): The Mitochondrial Lon Protease: Novel Functions off the Beaten Track? In: *Biomolecules* 10 (2). DOI: 10.3390/biom10020253.
- Vos, Kurt J. de; Mórotz, Gábor M.; Stoica, Radu; Tudor, Elizabeth L.; Lau, Kwok-Fai; Ackerley, Steven et al. (2012): VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. In: *Hum Mol Genet* 21 (6), S. 1299–1311. DOI: 10.1093/hmg/ddr559.
- Wallace, D. C. (1992): Diseases of the mitochondrial DNA. In: *Annual review of biochemistry* 61, S. 1175–1212. DOI: 10.1146/annurev.bi.61.070192.005523.
- Wang, Hua; Ni, Hong-Min; Chao, Xiaojuan; Ma, Xiaowen; Rodriguez, Yssa Ann; Chavan, Hemantkumar et al. (2019): Double deletion of PINK1 and Parkin impairs hepatic mitophagy and exacerbates acetaminophen-induced liver injury in mice. In: *Redox biology* 22, S. 101148. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101148.
- Wang, Kent Z. Q.; Steer, Erin; Otero, P. Anthony; Bateman, Nicholas W.; Cheng, Mary Hongying; Scott, Ana Ligia et al. (2018): PINK1 Interacts with VCP/p97 and Activates PKA to Promote NSFL1C/p47 Phosphorylation and Dendritic Arborization in Neurons. In: *eNeuro* 5 (6). DOI: 10.1523/ENEURO.0466-18.2018.
- Wang, Ruifang; Zhu, Yinxing; Ren, Chenwei; Yang, Shuaike; Tian, Shan; Chen, Huanchun et al. (2020): Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. In: *Autophagy*, S. 1–16. DOI: 10.1080/15548627.2020.1725375.
- Wang, Xianlong; Cao, Chunwei; Huang, Jiaojiao; Yao, Jing; Hai, Tang; Zheng, Qiantao et al. (2016): One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. In: *Scientific reports* 6, S. 20620. DOI: 10.1038/srep20620.
- Weihofen, Andreas; Ostaszewski, Beth; Minami, Yasufumi; Selkoe, Dennis J. (2008): Pink1 Parkinson mutations, the Cdc37/Hsp90 chaperones and Parkin all

influence the maturation or subcellular distribution of Pink1. In: *Human molecular genetics* 17 (4), S. 602–616. DOI: 10.1093/hmg/ddm334.

Wilkening, Anne; Rüb, Cornelia; Sylvester, Marc; Voos, Wolfgang (2018): Analysis of heat-induced protein aggregation in human mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (29), S. 11537–11552. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002122.

Wittig, Ilka; Braun, Hans-Peter; Schägger, Hermann (2006): Blue native PAGE. In: *Nat Protoc* 1 (1), S. 418–428. DOI: 10.1038/nprot.2006.62.

Xiao, Bin; Goh, Jian-Yuan; Xiao, Lin; Xian, Hongxu; Lim, Kah-Leong; Liou, Yih-Cherng (2017): Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway-dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (40), S. 16697–16708. DOI: 10.1074/jbc.M117.787739.

Xu, Shan; Peng, Guihong; Wang, Yang; Fang, Shengyun; Karbowski, Mariusz (2011): The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. In: *Molecular biology of the cell* 22 (3), S. 291–300. DOI: 10.1091/mbc.E10-09-0748.

Yamaguchi, Ayane; Ishikawa, Hayate; Furuoka, Mana; Yokozeki, Masashi; Matsuda, Noriyuki; Tanimura, Susumu; Takeda, Kohsuke (2019): Cleaved PGAM5 is released from mitochondria depending on proteasome-mediated rupture of the outer mitochondrial membrane during mitophagy. In: *Journal of biochemistry* 165 (1), S. 19–25. DOI: 10.1093/jb/mvy077.

Yamano, Koji; Youle, Richard J. (2013): PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. In: *Autophagy* 9 (11), S. 1758–1769. DOI: 10.4161/auto.24633.

Yang, Weili; Guo, Xiangyu; Tu, Zhuchi; Chen, Xiusheng; Han, Rui; Liu, Yanting et al. (2022): PINK1 kinase dysfunction triggers neurodegeneration in the primate brain without impacting mitochondrial homeostasis. In: *Protein & Cell* 13 (1), S. 26–46. DOI: 10.1007/s13238-021-00888-x.

Yang, Weili; Liu, Yunbo; Tu, Zhuchi; Xiao, Chong; Yan, Sen; Ma, Xishan et al. (2019): CRISPR/Cas9-mediated PINK1 deletion leads to neurodegeneration in

rhesus monkeys. In: *Cell research* 29 (4), S. 334–336. DOI: 10.1038/s41422-019-0142-y.

Ye, Yihong (2006): Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. In: *Journal of structural biology* 156 (1), S. 29–40. DOI: 10.1016/j.jsb.2006.01.005.

Yu, Zhengying; Wang, Haipeng; Tang, Wanyi; Wang, Shaoyang; Tian, Xiaoying; Zhu, Yujie; He, Hao (2021): Mitochondrial Ca²⁺ oscillation induces mitophagy initiation through the PINK1-Parkin pathway. In: *Cell Death Dis* 12 (7), S. 632. DOI: 10.1038/s41419-021-03913-3.

Zeb, Akbar; Choubey, Vinay; Gupta, Ruby; Kuum, Malle; Safiulina, Dzhamilja; Vaarmann, Annika et al. (2021): A novel role of KEAP1/PGAM5 complex: ROS sensor for inducing mitophagy. In: *Redox biology* 48, S. 102186. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102186.

Zhang, Xianghong; Du Yuan; Sun, Qian; Xu, Li; Lee, Emma; Lewis, Anthony J. et al. (2017): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase regulates the PINK1/Parkin and DJ-1 pathways of mitophagy during sepsis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31 (10), S. 4382–4395. DOI: 10.1096/fj.201601096RRR.

Zhong, Zhenyu; Umemura, Atsushi; Sanchez-Lopez, Elsa; Liang, Shuang; Shalapour, Shabnam; Wong, Jerry et al. (2016): NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. In: *Cell* 164 (5), S. 896–910. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.057.

Zhou, Chun; Huang, Yong; Shao, Yufang; May, Jessica; Prou, Delphine; Perier, Celine et al. (2008): The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33), S. 12022–12027. DOI: 10.1073/pnas.0802814105.

Ziviani, Elena; Tao, Ran N.; Whitworth, Alexander J. (2010): Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11), S. 5018–5023. DOI: 10.1073/pnas.0913485107.