

Bedeutung der Proteinkinasen PINK1 und MARK2 für die Funktion von Mitochondrien in neuronalen Zellmodellen

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Departments Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

eingereicht von
Cindy Hempp
aus Chemnitz

Hamburg 2012

In Dankbarkeit meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Abbildungsverzeichnis | 8 |
| Tabellenverzeichnis | 10 |
| Abkürzungsverzeichnis | 11 |
| 1 Zusammenfassung | 13 |
| 2 Einleitung | 15 |
| 2.1 Neurodegenerative Erkrankungen | 15 |
| 2.1.1 Alzheimer Krankheit | 16 |
| 2.1.2 Parkinson | 19 |
| 2.2 Bedeutung von Mitochondrien in der Neurodegeneration | 22 |
| 2.3 Mitochondrien | 24 |
| 2.3.1 Mitochondriale Atmung | 25 |
| 2.3.2 Mitochondrien und Kalzium | 27 |
| 2.3.3 Mitochondrientransport | 28 |
| 2.3.4 Mitochondrien-Homöostase | 29 |
| 2.4 Proteinkinasen | 31 |
| 2.4.1 Adenin-Monophosphat-Kinasen (AMPK) | 31 |
| 2.4.2 MARK2 und seine Funktionen | 32 |
| 2.4.3 PINK1 und seine Funktionen | 35 |
| 2.5 Ziel der Arbeit | 37 |
| 3 Material | 39 |
| 3.1 Geräte | 39 |
| 3.2 Software | 39 |
| 3.3 Chemikalien | 40 |
| 3.4 Enzyme | 40 |
| 3.5 Antikörper | 40 |
| 3.6 Molekulargewichtsmarker | 41 |
| 3.7 Vom Hersteller bezogene Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits) | 41 |
| 3.8 Medien und Zusätze | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 3.8.1 Bakterienmedien | 42 |
| 3.8.2 Hefemedien | 42 |
| 3.8.3 Zellkulturmedien | 43 |
| 3.9 Puffer und Lösungen | 44 |
| 3.10 Bakterien- und Hefestämme, Viren und Zelllinien | 45 |
| 3.10.1 Bakterienstämme | 45 |
| 3.10.2 Hefestamm | 46 |
| 3.10.3 Adenoviren | 46 |
| 3.10.4 Eukaryontische Zelllinien | 46 |
| 3.11 Vektoren | 47 |
| 3.12 Oligonukleotide | 47 |
| 3.13 Hergestellte und bestehende Konstrukte | 48 |
| 3.14 cDNS-Bibliothek | 49 |
| 4 Methoden | 50 |
| 4.1 Molekularbiologische Methoden | 50 |
| 4.1.1 DNS-Amplifikation mittels PCR | 50 |
| 4.1.2 Erstellung von Punktmutationen | 50 |
| 4.1.3 Restriktionsverdau | 51 |
| 4.1.4 Dephosphorylierung von geschnittener DNS | 51 |
| 4.1.5 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden | 51 |
| 4.1.6 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese | 51 |
| 4.1.7 Extraktion von DNS aus Agarosegelen | 52 |
| 4.1.8 Ligation | 52 |
| 4.1.9 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> | 53 |
| 4.1.10 Isolation von Plasmiden aus <i>E.coli</i> (Mini- und Midimaßstab) | 53 |
| 4.1.11 Konzentrationsbestimmung der DNS | 54 |
| 4.1.12 Sequenzierung | 54 |
| 4.1.13 Herstellung von Glycerindauerkulturen | 54 |
| 4.2 Biochemische Methoden | 54 |
| 4.2.1 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine | 54 |
| 4.2.1.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> | 54 |
| 4.2.1.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E.coli</i> | 55 |
| 4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration | 56 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 56 |
| 4.2.4 Western Blot..... | 57 |
| 4.2.5 Koimmunopräzipitation | 58 |
| 4.2.6 Kinase-Assay | 58 |
| 4.2.7 Bestimmung der PINK1- und COX5B-Phosphorylierungsstellen..... | 59 |
| 4.2.7.1 Präparation von <i>in vitro</i> phosphorylierten Peptiden..... | 59 |
| 4.2.7.2 Erstellung der Phosphopeptidkarte | 60 |
| 4.2.7.3 Massenspektrometrie | 61 |
| 4.2.8 Mitochondrienisolation und Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitätsassay | 62 |
| 4.3 Hefe-2-H-Methoden | 63 |
| 4.3.1 Amplifikation von cDNS-Bibliotheken..... | 64 |
| 4.3.2 Hefetransformation und direkter 2-Hybrid-Test | 64 |
| 4.3.2.1 Transformation in <i>S.cerevisiae</i> | 64 |
| 4.3.2.2 Direkter Hefe-2-H-Test | 65 |
| 4.3.3 Hefe-2-H cDNS-Bibliothek Screen | 65 |
| 4.3.3.1 Transformation von <i>S.cerevisiae</i> für den 2-Hybrid cDNS-Bank-Screen | 66 |
| 4.3.3.2 Berechnung der Transformationseffizienz | 67 |
| 4.3.3.3 Identifizierung positiver Beuteklone | 67 |
| 4.3.3.3.1 Hefe Köder-Verlustkulturen | 67 |
| 4.3.3.3.2 <i>E.coli</i> Transformation mit Beuteplasmiden aus Hefen | 68 |
| 4.3.3.3.3 Hefe-Retransformation mit Beuteplasmid aus <i>E.coli</i> | 68 |
| 4.3.3.3.4 Sequenzierung positiver Klone..... | 68 |
| 4.4 Zellkultur | 69 |
| 4.4.1 Kultivierung von verschiedenen Eukaryotischen Zelllinien..... | 69 |
| 4.4.1.1 Präparation und Kultivierung von primären Ratten Cortex-Zellen | 69 |
| 4.4.1.2 Präparation und Kultivierung von retinalen Ganglien-Zellen aus Hühner-Embryonen | 70 |
| 4.4.2 Transfektion von Säugerzellen und retinalen Ganglienzellen | 71 |
| 4.4.2.1 Lipofectamin™-Transfektion..... | 71 |
| 4.4.2.2 Adenovirus-Infektion | 72 |
| 4.4.3 Immunfluoreszenz..... | 72 |
| 4.4.3.1 Lebendbeobachtung und Auswertung der Mitochondrienbewegung. | 73 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5 Statistische Auswertungen | 73 |
| 5 Ergebnisse | 75 |
| 5.1 MARK2 bindet und phosphoryliert PINK1 | 75 |
| 5.1.1 Zelluläre Lokalisation von Δ N-PINK1, PINK1 ^{FL} und MARK2..... | 75 |
| 5.2 MARK2 phosphoryliert Δ N-PINK1 an T313 | 78 |
| 5.2.1 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in Δ N-PINK1 | 78 |
| 5.2.2 Bestätigung der Phosphorylierungsstelle durch Mutation von Δ N-PINK1 in Δ N-PINK1-T313A | 81 |
| 5.3 PINK1 und MARK2 regulieren den Mitochondrientransport..... | 83 |
| 5.3.1 PINK1 ^{FL} und Δ N-PINK1 ändern die Mitochondrienlokalisierung in primären Cortex-Zellen | 83 |
| 5.3.2 Δ N-PINK1 erhöht die Mitochondriendichte in Axonen von RGCs | 86 |
| 5.3.3 Bestimmung der Transportcharakteristika in untransfizierten RGCs | 88 |
| 5.3.4 MARK2 vermindert die mitochondriale Geschwindigkeit..... | 91 |
| 5.3.5 Δ N-PINK1 erhöht den Anteil stationärer Mitochondrien | 93 |
| 5.3.6 PINK1 ^{FL} und MARK2 ^{WT} ändern die Bewegungsrichtung der Mitochondrien | 94 |
| 5.3.7 PINK1 und MARK2 ^{pT208} und Kinesin kolokalisieren mit Mitochondrien besonders im Wachstumskegel von Zellausläufern | 96 |
| 5.3.8 Mutation von T313 zu Met oder Glu in PINK1 ist toxisch für CHO und Cortex-Zellen | 98 |
| 5.4 Identifizierung neuer PINK1 Interaktionspartner | 100 |
| 5.4.1 Hefe-2-H-Screen einer fötalen menschlichen Gehirn cDNS-Bank | 100 |
| 5.4.2 Identifizierte Hefe-2-H-Screen-Klone | 102 |
| 5.5 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2, PINK1 und COX5B | 102 |
| 5.5.1 Kartierung der Interaktionsdomänen von PINK1 und COX5B im direkten 2-H-Test..... | 102 |
| 5.5.2 Kartierung der Interaktionsdomänen von MARK2 und COX5B im direkten 2-H-Test..... | 103 |
| 5.5.3 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen PINK1 und COX5B sowie MARK2 und COX5B | 105 |

| | |
|---|------------|
| 5.5.4 PINK1 und aktive MARK2 kolokalisieren mit COX5B an Mitochondrien | 106 |
| 5.6 MARK2 phosphoryliert COX5B – PINK1 hemmt die COX5B-Phosphorylierung | 107 |
| 5.6.1 Test einer phosphorylierungsabhängigen Interaktion zwischen MARK2, PINK1 und COX5B | 107 |
| 5.6.2 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in COX5B | 109 |
| 5.7 MARK2 und PINK1 beeinflussen die mitochondriale Atmung über COX5B | 114 |
| 5.7.1 Die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase wird durch MARK2 ^{T208E} gesteigert und durch Δ N-PINK1 negativ reguliert | 114 |
| 6 Diskussion | 117 |
| 6.1 MARK2 ist ein vorgeschalteter Regulator von PINK1 | 117 |
| 6.2 MARK2 und PINK1 regulieren den Transport von Mitochondrien | 122 |
| 6.3 Identifizierung neuer Interaktionspartner von PINK1 | 129 |
| 6.4 COX5B interagiert mit den katalytischen Domänen von PINK1 und MARK2 | 130 |
| 6.5 MARK2 und PINK1 regulieren die Cytochrom-c-Oxidase über die Phosphorylierung von COX5B an Mitochondrien | 132 |
| 6.6 Ausblick | 135 |
| 7 Literaturverzeichnis..... | 136 |
| 7.1 Zeitschriftenartikel | 136 |
| 7.2 Internetquellen..... | 145 |
| Danksagung..... | 146 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Darstellung der zwei Hauptmerkmale der Alzheimer Pathologie. | 16 |
| Abbildung 2: Darstellung der Wechselwirkung von Tau und den phosphorylierenden Kinasen | 18 |
| Abbildung 3: Überblick der bisher bekannten Faktoren, welche mit Parkinson in Verbindung gebracht werden. | 20 |
| Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des Proteinimportes in Mitochondrien.. | 24 |
| Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des mitochondrialen Metabolismus..... | 26 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung bisheriger Ergebnisse zum Mitochondrientransport. | 29 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung des Transportkomplexes, welcher Mitochondrien der Mitophagie zuführt. | 30 |
| Abbildung 8: (A) Darstellung der AMP-Kinase-Familie mit den vier MARK-Varianten. (B) Domänen der MARK-Kinasen | 32 |
| Abbildung 9: Übersicht der bekannten zellulären Funktionen der MARK Kinase Familie | 33 |
| Abbildung 10: Darstellung der bekannten PINK1-Funktionen. | 36 |
| Abbildung 11: Kolokalisation von Δ N-PINK1 und PINK1 ^{FL} mit MARK2 ^{T208A/S212A} vor allem in den Ausläufern von Cortex-Zellen..... | 76 |
| Abbildung 12: Subzelluläre Lokalisation von MARK2 in N2A-Zellen und primären Neuronen. | 77 |
| Abbildung 13: Phosphopeptidkarte von Δ N-PINK1 nach MARK2 ^{T208E} Phosphorylierung und anschließendem chymotryptischen Verdau. | 79 |
| Abbildung 14: Massenspektrometrische Analyse der Δ N-PINK1-Peptide, isoliert aus Spot 1 und Spot 2 der Phosphopeptidkarte | 80 |
| Abbildung 15: (A) Mutation von T313 zu Alanin in Δ N-PINK1 führt zu einer 60% Reduktion der MARK2 ^{T208E} -induzierten Phosphorylierung gegenüber Δ N-PINK1. (B) Strukturmodell von PINK1 auf der Basis der bekannten CaMK1 durch | |

| | |
|---|-----|
| SwissModell. | 82 |
| Abbildung 16: PINK1 ^{FL} (gelb) und Δ N-PINK1 (gelb) verändern die Mitochondrienverteilung in primären Ratten Cortex-Zellen. | 85 |
| Abbildung 17: Δ N-PINK1 erhöht die Mitochondriendichte. | 87 |
| Abbildung 18: Charakterisierung der Mitochondrienbewegung in untransfizierten retinalen Ganglienzellen. | 89 |
| Abbildung 19: Kymographen erstellt in Axonen unterschiedlich transfizierter retinaler Ganglienzellen. | 91 |
| Abbildung 20: MARK2 ^{WT} reduziert die mitochondriale Geschwindigkeit. | 92 |
| Abbildung 21: Δ N-PINK1 erhöht den Anteil stationärer Mitochondrien und MARK2 ^{WT} verstärkt den Effekt. | 93 |
| Abbildung 22: PINK1 ^{FL} und MARK2 ^{WT} fördern den retrograden Transport von Mitochondrien. | 95 |
| Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von endogener PINK1, endogener aktiver MARK2 ^{pT208} und endogenem Kinesin. | 97 |
| Abbildung 24: T313M-Mutation von Δ N-PINK1 und PINK1 ^{FL} ist toxisch für primäre Ratten Cortex-Zellen und CHO-Zellen. | 99 |
| Abbildung 25: Kartierung der Interaktionsdomäne von PINK1 mit COX5B mittels direktem Hefe-2-H-Test. | 103 |
| Abbildung 26: Kartierung der Interaktionsdomäne von MARK2 mit COX5B mittels direktem Hefe-2-H-Test. | 104 |
| Abbildung 27: COX5B interagiert mit PINK1 und MARK. | 105 |
| Abbildung 28: PINK1 und endogen aktive MARK2 ^{pT208} kolokalisieren mit COX5B an Mitochondrien. | 107 |
| Abbildung 29: MARK2 ^{T208E} phosphoryliert COX5B - PINK1 ^{FL} und Δ N-PINK1 hemmen die Phosphorylierung. | 108 |
| Abbildung 30: Phosphopeptidkarten für COX5B nach Phosphorylierung durch MARK2 ^{T208E} | 111 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse der COX5B-Peptide, isoliert aus Spot 1 und Spot 2 der Phosphopeptidkarte A | 113 |
| Abbildung 32: Messung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität in frisch isolierten Mitochondrien aus transfizierten CHO-htau40-Zellen. | 115 |
| Abbildung 33: Hypothetisches Modell der Funktion von MARK2 und PINK1 für die Mitophagie. | 124 |
| Abbildung 34: Ein Modell des mitochondrialen Transportstopps: | 127 |
| Abbildung 35: Hypothetisches Modell des mitochondrialen Transportstopps. | 128 |
| Abbildung 36: Hypothetische Regulation der Cytochrom-c-Oxidase über ihre Untereinheit COX5B. | 132 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 1: Anteil der Phosphorylierung der Spots in der Phosphopeptidkarte.. | 80 |
| Tabelle 2: Zuordnung der massenspektrometrischen Peaks zu PINK1-Phosphopeptiden | 81 |
| Tabelle 3: Übersicht der im Hefe-2-H-Screen mit PINK1 ¹⁵⁶⁻⁵¹¹ (Kinasedomäne) gefundenen Interaktionspartner. | 101 |
| Tabelle 4: Anteil der Phosphorylierung der Spots in den Phosphopeptidkarte. | 111 |
| Tabelle 5: Zuordnung der massenspektrometrischen Peaks zu COX5B-Phosphopeptiden | 113 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AR | Autoradiogramm |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid) |
| Bidest. | Zweifach destilliert (bidestillata) |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| CFP | Cyan fluoreszierendes Protein |
| d | Tag (<u>d</u> ay) |
| DB | DNS-Bindedomäne |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat |
| DTT | DL-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamin-tetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure |
| et al. | et altera |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| GST | Glutathion S-Transferase |
| h | Stunde |
| Hefe-2-H | Hefe-Zwei-Hybrid |
| His | Histidin |
| HS | Pferdeserum (horse serum) |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| Kb | Kilo Basenpaare |
| kDa | Kilo Dalton |
| KOIP | Koimmunopräzipitation |
| LiAC | Lithiumacetat |
| LIMK | <u>L</u> in-11, <u>I</u> sl-1, <u>M</u> e-3 Kinase |
| MAP | Mikrotubuli-assoziiertes Protein |
| MAPK | Mitogen aktivierte Proteinkinase |
| MARK | MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase |
| MARKK | MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase |
| | Kinase |
| min | Minute |
| MP-ASMB | Max Planck Arbeitsgruppe für Strukturelle Molekularbiologie |
| mRFP | Mono-Rot fluoreszierendes Protein |
| MT | Mikrotubuli |
| NGF | Nervenwachstumsfaktor (<u>n</u> erv <u>g</u> rowth <u>f</u> actor) |
| NFT | neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles) |
| OD | optische Dichte |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |

| | |
|----------|--|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PFA | Para-Formaldehyd |
| PINK1 | PTEN-induzierte Kinase |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| RGC | Retinale Ganglienzellen |
| rpm | Rotationen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Serin |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese |
| sek | Sekunde |
| T | Threonin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethy-ethylendiamin |
| temp. | Temperatur |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan |
| UV | ultraviolett |
| Verd. | Verdünnung |
| Vol. | Volumen |
| v/v | Volumenprozent |
| WT | Wildtyp |
| w/v | Gewicht pro Volumen (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume) |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -galactosid |
| YFP | Gelb (yellow) fluoreszierendes Protein |
| z. B. | zum Beispiel |

1 Zusammenfassung

Die Proteinkinase MARK2 wird vor allem in Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit untersucht. Die wichtigste Funktion ist dabei die Regulation des Auf-, Ab- und Umbaus des Zytoskelettes. Die Mikrotubuli werden von dem Protein Tau stabilisiert, solange dieses an sie gebunden ist. Soll ein Umbau der zellulären Struktur erfolgen, ist das Ablösen des Tau Proteins von den Mikrotubuli erforderlich und wird durch Phosphorylierung von Tau durch MARK2 bewerkstelligt.

Um neue Regulationspartner für MARK2 zu identifizieren, wurde vor Beginn dieser Arbeit ein Hefe-2-H-Screen durchgeführt. Dabei wurde eine Interaktion mit der Proteinkinase PINK1 entdeckt (Matenia et al. 2011, eingereicht). Die Bindung dieser beiden Kinasen ist die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Die Proteinkinase PINK1 ist besonders für die Erforschung der Parkinson Erkrankung von Interesse. Ihr wird eine große Bedeutung für die Mitochondrienfunktion zugeschrieben. So wurde bereits gezeigt, dass PINK1 Zellen vor stress-induzierter Apoptose schützt, einen Einfluss auf die Zellatmung und Ca^{2+} -abhängige Signalwege hat, wichtig ist für Mitophagie, Teilung und Verschmelzung der Mitochondrien, sowie für den Mitochondrientransport (zusammengefasst in Deas et al. 2009). Folgende Fragen werden PINK1 betreffend aktuell diskutiert: Erstens ist noch nicht vollständig geklärt, ob PINK1 ein intramitochondriales Protein ist, oder ob es sich auf der Mitochondrienoberfläche befindet. Zweitens wird gezeigt, dass PINK1 in mehreren Spaltprodukten vorliegt, wobei hier unklar ist, ob es innerhalb oder außerhalb des Mitochondriums geschnitten wird und welche Funktionen die Spaltprodukte haben.

Nachdem eine direkte Interaktion zwischen MARK2 und der Kinasedomäne von PINK1 in einem direkten Hefe-2-H-Test, sowie auch in Koimmunopräzipitationen nachgewiesen werden konnte, sollten die Auswirkungen dieser Interaktion näher betrachtet werden. In Kinaseassays zeigte sich, dass es sich bei MARK2 um den ersten identifizierten vorgeschalteten Regulator von PINK1 handelt. Die genauere Analyse der MARK2-Phosphorylierungsstelle in PINK1 ergab zudem, dass es sich bei dieser um die bekannte Parkinson-Mutationsstelle T313 handelt. Es kann daher angenommen werden, dass beide Kinasen eine Bedeutung für die Ausbildung der neurodegenerativen Erkrankung Parkinson haben.

Obwohl MARK2 eine zytosolische Kinase ist, konnte in Kolokalisations- und Fraktionierungsexperimenten eine Assoziation mit Mitochondrien gezeigt werden.

Als mögliche Funktion der MARK2-PINK1-Interaktion erschien ein Einfluss auf den mitochondrialen Transport als naheliegend, da sowohl für MARK2 als auch für PINK1

bereits ein direkter Einfluß auf den Mikrotubuli-assoziierten Transport nachgewiesen wurde. MARK2 reguliert den Kinesin-assoziierten Transport entlang der Mikrotubuli durch die Phosphorylierung von Tau. Dadurch wird Tau von den Mikrotubuli abgelöst und das Anheften von Kinesin ermöglicht (Mandelkow et al. 2004). PINK1 wiederum ist Teil des mitochondrialen Transportkomplexes. (Weihofen et al. 2009). Daher wurden Transportstudien der Mitochondrien mittels Echtzeit-Mikroskopie von Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass das 45 kDa PINK1-Fragment am anterograden Transport der Mitochondrien beteiligt ist. Seine Funktion liegt vor allem darin, den mitochondrialen Transport zu stoppen, wobei MARK2 diesen Effekt verstärkt. Hingegen begünstigt das vollständige PINK1-Protein den retrograden Transport von Mitochondrien und wird hierbei von MARK2 unterstützt.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten über das Hefe-2-H-System weitere PINK1-Interaktionspartner identifiziert werden. Ein für die Mitochondrienfunktion bedeutender Interaktionspartner stellte hierbei die Untereinheit 5B der Cytochrom-c-Oxidase dar. Es sollte untersucht werden, ob COX5B von PINK1 phosphoryliert wird und ob die PINK1-MARK2 Interaktion dabei eine Rolle spielt. Dabei ergab sich, dass entgegen der Erwartung MARK2 COX5B phosphoryliert und PINK1 diese Phosphorylierung hemmt. Abschließende biochemische Untersuchungen der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität zeigen ebenfalls einen aktivierenden Einfluss von MARK2, wohingegen sich PINK1 negativ regulatorisch auswirkt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse neue Mechanismen auf, welche das Verständnis des mitochondrialen Transportes und der mitochondrialen Atmung erweitern. Es wird in dieser Arbeit deutlich, wie wichtig eine genaue Regulation der beiden Kinasen PINK1 und MARK2 für die Zellvitalität ist. Durch die Interaktion der beiden Kinasen kann außerdem eine Verbindung zwischen den neurodegenerativen Erkrankungen Alzheimer und Parkinson hergestellt werden. Dadurch leistet diese Arbeit auch einen Beitrag zur Aufklärung der Ursachen dieser Krankheiten.

2 Einleitung

2.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen beschreiben eine Gruppe von Krankheiten, welche sich durch das sporadische, aber teilweise auch erblich bedingte Auftreten eines langsam fortschreitenden Funktionsverlustes von Neuronenpopulationen im zentralen Nervensystem (ZNS) charakterisiert sind. Der Beginn ist schleichend und der Hauptrisikofaktor für die sporadischen neurodegenerativen Erkrankungen ist vor allem das Alter, da der Krankheitsbeginn zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr liegt.

Der den meisten neurodegenerativen Erkrankungen zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist die Fehlfaltung von Zellproteinen, weshalb sie auch „Proteinopathien“ genannt werden. Zu den sogenannten „Tauopathien“ zählen die Alzheimer Krankheit, die Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17), die Pick-Krankheit, die progressive supranukleare Parese und die Kortikobasale Degeneration. Diese können mit und ohne Amyloideinlagerungen einhergehen. Die zweite große Gruppe stellen die „Synucleinopathien“ dar, zu welchen die Parkinson-Erkrankung, die Demenz mit Lewy-Körpern (Alzheimer-Variante) und die Multisystematrophie gehören. Sowohl im Fall der Alzheimer als auch der Parkinson Krankheit sind sporadische aber auch familiär vererbte Formen bekannt.

Zu den erblichen Erkrankungen zählen auch die Polyglutamin-Erkrankungen. Gekennzeichnet sind sie durch die Anhäufung von Polyglutamin enthaltenden Proteinen in den Neuronen. Die bekannteste Krankheit dieser Gruppe ist Chorea Huntington, bei welcher die Anzahl der Wiederholungen der Nucleotidsequenz CAG im Huntingtin-Gen stark ansteigt.

Letztlich gehören zu den neurodegenerativen Erkrankungen auch die Amyotrophe Lateralsklerose und die sogenannten Prionerkrankungen. Sie betreffen vor allem die zentralen und peripheren Motoneurone und werden durch abnorm gefaltete infektiöse Isoformen eines normalen, körpereigenen Zellproteins verursacht (Jellinger, 2005).

2.1.1 Alzheimer Krankheit

Alzheimer ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und betrifft ca. 15 Mio Menschen weltweit (Jellinger 2005). Beschrieben wurde die Krankheit zuerst als präsenile Demenz von dem deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer. Dieser betreute im Jahr 1901 eine 50-jährige Patientin (Alzheimer 1907).

Heute unterscheidet man familiär vererbten Alzheimer, welcher in ca. 5-10% der Fälle auftritt und den sporadisch auftretenden Alzheimer, dessen Ursache weitgehend ungeklärt ist. Typisch ist ein schleichender Verlauf und eine progressive Prävalenz mit zunehmendem Alter (Jellinger 2005). So steigt die Häufigkeit von ca 2% bei den unter 65-Jährigen auf bis zu 20% bei den 85-Jährigen an (Deutsche Alzheimer Gesellschaft 2010).

Die Patienten zeigen zunächst nur eine leichte Verschlechterung der kognitiven Leistung und Merkfähigkeit, jedoch mit einem progressivem Verlauf. Hinzu kommen Orientierungslosigkeit, Verlust der Sprache, Verlernen alltäglicher Handlungsabläufe, Aggressivität, Psychosen und Wahnvorstellungen, motorische Unruhe, Apathie, Gangstörungen, Inkontinenz bis hin zur völligen Pflegebedürftigkeit (Jellinger 2005).

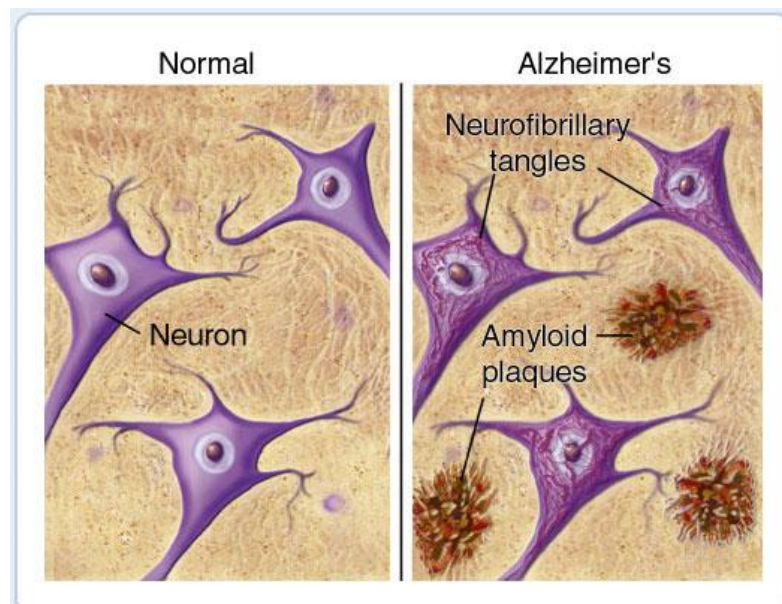


Abbildung 1: Darstellung der zwei Hauptmerkmale der Alzheimer Pathologie. Intrazelluläre Neurofibrillen und extrazelluläre Amyloid-Plaques. Herkunft der Abbildung: <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html>

Pathologisch finden sich in den Gehirnen von Alzheimer Patienten vor allem Ablagerungen von Amyloid-Plaques sowie Neurofibrillen (Abb. 1), begleitet von einer Atrophie des Hippokampus und des zerebralen Cortex. Dem Absterben der Nervenzellen geht dabei offenbar der Verlust der Synapsen voraus (Walsh and Selkoe 2004).

Bei den Amyloid-Plaques und den Neurofibrillen handelt es sich um Proteinablagerungen, wobei die Amyloid-Plaques extrazellulär und die Neurofibrillen intrazellulär zu finden sind (Abb. 1). Die Amyloid-Plaques bestehen aus den Proteinen A β 40 und A β 42, welche beide mit Hilfe von β - und γ -Sekretasen aus dem Vorläuferprotein APP (Amyloid-Precursor Protein, Amyloid Vorläufer Protein) gebildet werden. Die Plaque-Bildung wird dabei begünstigt, wenn sich das Verhältnis zwischen A β 40/A β 42 zugunsten des A β 42 verschiebt, denn A β 42 besitzt eine stärkere Tendenz zur Selbstaggregation als A β 40. Die Relationsverschiebung von A β 40/A β 42 wird durch Mutationen des Presenilins, einer Untereinheit des γ -Sekretase-Komplexes, hervorgerufen (Walsh und Selkoe 2004). Die Amyloid-Ablagerungen kommen bei Alzheimer Patienten vor allem im limbischen System und den angrenzenden Cortex-Regionen vor (Glennner und Wong 1984, Masters et al. 1985, Walsh and Selkoe 2004).

Die Amyloid-Hypothese der Alzheimer Erkrankung geht von einer zentralen Rolle des A β -Peptids in der pathologischen Kaskade aus. Der Bildung von Neurofibrillen kommt nach dieser Hypothese eine untergeordnete Rolle zu. Allerdings wird diese Hypothese kontrovers diskutiert, da unter anderem die quantitative Häufung der Amyloid-Plaques nicht direkt mit dem klinischen Fortschreiten der Erkrankung korreliert (Braak und Braak 1998, Walsh und Selkoe 2003). Außerdem treten neben den Amyloid-Plaques die bereits genannten Neurofibrillen auf. Sie bestehen aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau. Mikrotubuli bilden einen Teil des Zytoskelettes, welches die Form der Zelle aber auch den Transport von Zellorganellen gewährleistet. $\alpha\beta$ -Tubulindimere polymerisieren zu den sogenannten Protofilamenten. Diese wiederum assoziieren lateral und bilden die Mikrotubuli. Durch den Aufbau aus den zwei Tubulin-Isoformen α und β erhalten die Mikrotubuli ihre Polarität. Lösliches und polymerisiertes Tubulin stehen in einem dynamischen

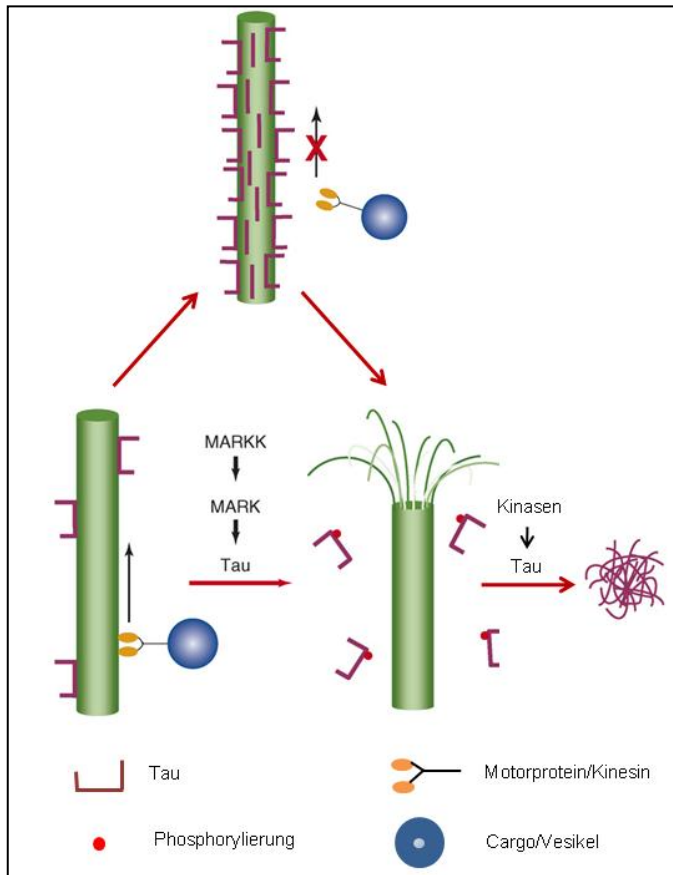


Abbildung 2: Darstellung der Wechselwirkung von Tau und den phosphorylierenden Kinasen auf die Stabilität der Mikrotubuli und den Transport entlang der Mikrotubuli. entnommen aus *Matenia und Mandelkow 2009*.

Gleichgewicht – dadurch kann das Zytoskelett je nach Bedarf auf-, ab- und umgebaut werden. Tau dient dabei der Stabilisierung der Mikrotubuli, wobei ein Gleichgewicht zwischen Anheften und Ablösen des Tau von den Mikrotubuli erforderlich ist, damit die dynamischen Vorgänge, wie das Wachstum von Nervenzellen, oder die Ausbildung von Synapsen aber auch der Transport von Zellorganellen, stattfinden kann. Die Regulation des Tau erfolgt über Phosphorylierung durch Kinasen, wie die Serin-/Threonin Kinase MARK2. Die

Hyper-phosphorylierung von Tau kann dazu führen, dass dieses sich im Zytoplasma zu Oligomeren und den sogenannten Neurofibrillen, einem Kennzeichen der Alzheimer Krankheit, zusammenlagert (Abb. 2) (Matenia und Mandelkow 2009).

Aktuelle Ergebnisse zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen A β und Tau. Tau liegt in Gehirnen von Alzheimer-Patienten nicht, wie normalerweise in ausdifferenzierten Neuronen, vor allem in den Axonen vor, sondern im Soma der Zellen (Ballatore et al. 2007, Haass und Mandelkow 2010). Unter physiologischen Bedingungen wird die Tyrosin-Kinase Fyn durch Tau im Soma zurück gehalten. Fyn ist eine Membran-assoziierte Kinase, die das Zellwachstum kontrolliert. Eine direkte Interaktion zwischen Fyn und Tau wurde durch Lee et al. (1998) nachgewiesen. Fyn phosphoryliert den NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), welcher ein Glutamatrezeptor der Synapsen

ist und die synaptische Übertragung steigert. Durch die Phosphorylierung wird der NMDA-Rezeptor stabilisiert, was zu einer exzitotoxischen Wirkung des Neurotransmitters Glutamat führt. Dies wiederum macht die Zellen anfälliger gegenüber der A β -Toxizität (Ittner et al., 2010; zusammengefasst in Haas und Mandelkow 2010). Es wird postuliert, dass eine anormale Umverteilung des hyperphosphorylierten Tau in Soma und Dendriten im Verlauf der Alzheimer Erkrankung auch eine Umverteilung von Fyn in die Dendriten zur Folge hat. Dies verstärkt wiederum die Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors in den Synapsen und damit die toxischen Effekte von A β (Haas und Mandelkow 2010). Zusammenfassend nimmt die Phosphorylierung von Tau eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Alzheimer ein, womit auch der Proteinkinase MARK2, deren Funktionen näher in 2.4.2 beschrieben werden, eine besondere Bedeutung zukommt.

2.1.2 Parkinson

Parkinson ist die häufigste Krankheit mit motorischen Störungen und nach Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Sie ist vor allem durch Tremor und Steifigkeit, Gang- und Haltungsstörungen charakterisiert, sowie Bradykinese (Bewegungsverlangsamung), die bis zur kompletten Bewegungslosigkeit reichen kann, aus (Jellinger 2005).

Als Ursache für die motorischen Beeinträchtigungen wird vor allem der Dopaminmangel im Striatum, ausgelöst durch den Verlust dopaminerger Neurone der Substantia nigra, angesehen. Neben den beschriebenen Symptomen treten auch zahlreiche weitere neurologische Defekte auf, wie Schlaf- und Wahrnehmungsstörungen, Depressionen, sowie Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten. Dies deutet darauf hin, dass die neuronale Degeneration sich nicht ausschließlich auf Motoneurone beschränkt (Winklhofer und Haass 2009).

Bisher ist wenig über die Ätiologie der Parkinson-Krankheit bekannt. Auch hier ist der Hauptrisikofaktor das Alter, da die Prävalenz von 0,01% der unter 50-Jährigen auf ca. 3% der über 65-Jährigen ansteigt (Jellinger 2005). Daneben spielen Umwelt- und genetische Faktoren eine Rolle.

Als mögliche Umweltrisikofaktoren bei der Entstehung von Parkinson gelten die Pestizide Paraquat und Rotenon, welche beide den Komplex I der Atmungskette inhibieren (Büeler 2009). Post mortem kann in der Substantia nigra von Parkinson Patienten eine etwa 30%ige Reduktion der Komplex I Aktivität nachgewiesen werden (Winklhofer und Haass 2009).

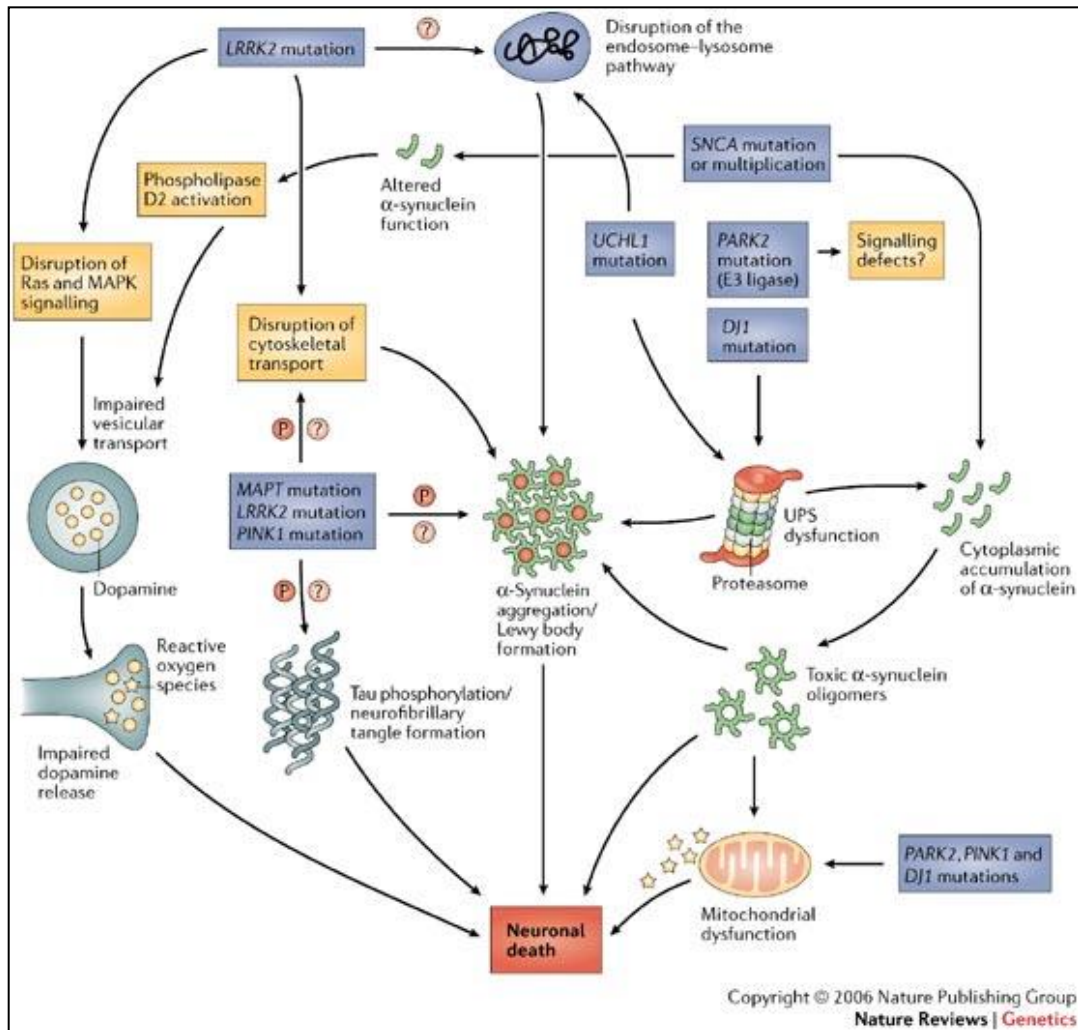


Abbildung 3: Überblick der bisher bekannten Faktoren, welche mit Parkinson in Verbindung gebracht werden. Herkunft der Abbildung:

http://www.humphath.com/IMG/jpg_parkinson_pathways_04_2.jpg

Genetische Faktoren machen ca. 10% der Parkinson Fälle aus (Gasser 2009). Dabei führen Mutationen in den Genen, welche für α -Synuclein und die Kinase LRRK2 kodieren, zu autosomal dominanten Formen und Mutationen in den Genen, welche für Parkin, PINK1 und DJ-1 kodieren zu autosomal rezessiven Formen von Parkinson (Winklhofer und Haass 2009).

Ein pathologisches Kennzeichen der Parkinson-Krankheit sind die sogenannten Lewy-Körper (Abb. 3), welche sich hauptsächlich aus α -Synuclein, aber auch

Ubiquitin, Neurofilamenten und Chaperonen zusammensetzen (Winklhofer und Haass 2009). α -Synuclein ist ein präsynaptisches Protein, dessen physiologische Funktion bisher unbekannt ist. Bekannt ist aber, dass bestimmte Mutationen des α -Synuclein-Genes sowie auch dessen Verdreifachung zu frühem erblichen Parkinson führt (Polymeropoulos et al. 1997, Büeler 2009). Toxische α -Synuclein-Protofibrillen werden von Dopamin stabilisiert, weshalb die Parkinson-Erkrankung möglicherweise vor allem die dopaminreiche Substantia nigra betrifft. Die Toxizität der α -Synuclein-Protofibrillen liegt wahrscheinlich in deren Eigenschaft, Poren in Membranen von beispielsweise synaptischen Vesikeln und vor allem Mitochondrien zu bilden (Lashuel et al. 2002, Ding et al. 2002, Büeler 2009). Dies führt zu selektiver Oxidation mitochondrialer Proteine (Poon et al. 2005), der Degeneration von Mitochondrien, einer verringerten Komplex IV-Aktivität, sowie mitochondrialen DNS-Schäden (Martin et al. 2006, Büeler 2009). Außerdem wurde die Assoziation von α -Synuclein mit Komplex I in der inneren Mitochondrienmembran gezeigt (Devi et al. 2008, Büeler 2009).

Ein weiteres Protein, welches, wenn es überexprimiert wird oder mutiert ist, mit der mitochondrialen Membran assoziiert, ist die Serin/Threonin-Protein-Kinase LRRK2 (Abb. 3), (Biskup et al. 2006, West et al. 2005, Büeler 2009). Mutationen dieses Gens führen zu autosomal dominanten Formen des Parkinson und können mit einem Großteil der familiär bedingten Parkinson-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. LRRK2 erzeugt, besonders wenn seine Kinaseaktivität durch Mutation gesteigert ist (Gloeckner et al. 2006, Greggio et al. 2006, Smith et al. 2006, Büeler 2009), eine mitochondrienabhängige Apoptose (Iaccarino et al. 2007, Büeler 2009). Außerdem führen bestimmte Mutationen der LRRK2 zu gesteigerter Autophagie und somit zu einer pathologischen Degradation von Mitochondrien (Plowey et al. 2008, Büeler 2009).

Zahlreiche Mutationen wurden auch bei der vorwiegend an Mitochondrien lokalisierten Proteinkinase PINK1 (Abb. 3) bei Parkinson Patienten nachgewiesen. Diese liegen vor allem in der Kinasedomäne von PINK1 und führen zu einer Reduktion der Kinaseaktivität (Mills et al. 2008). PINK1 wird eine neuroprotektive Funktion zugesprochen, welche sie durch

Phosphorylierung der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (Kim et al. 2008, Büeler 2009) und der Chaperone TRAP1 (Pridgeon et al. 2007) und HtrA2/Omi (Plun-Favreau et al. 2007) ausübt. Die bekannten Funktionen der Serin-/Threonin-Kinase PINK1 sollen in Kapitel 2.4.3 näher beschrieben werden.

In dem PINK1-Effektorprotein Parkin (Kitada et al. 1998, Büeler 2009) konnten ebenfalls Parkinson-assoziierte Mutationen nachgewiesen werden. Parkin ist vor allem für den Abbau defekter Mitochondrien durch Mitophagie verantwortlich (Narendra et al. 2008, 2010). Außerdem konnte eine Interaktion von Parkin mit DJ-1, einem anti-oxidativ wirkenden Protein, nachgewiesen werden. Auch im DJ-1-Gen konnten Mutationen rezessiv vererbbares Parkinson zugeordnet werden (Abb. 3), (Bonifati et al. 2003, Hague et al. 2003, Büeler 2009).

Insgesamt spielen bei Parkinson eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle, wobei vor allem Veränderungen der Mitochondrien charakteristisch sind.

2.2 Bedeutung von Mitochondrien in der Neurodegeneration

Mitochondrien erfüllen zahlreiche zelluläre Aufgaben, wie die oxidative Phosphorylierung, die Regulation von Kalzium, Signalkaskaden und Apoptose. Aufgrund des hohen Energie-Bedarfes und auch der erhöhten Empfindlichkeit neuronaler Zellen gegenüber reaktiver Sauerstoff-Radikale (ROS) wird die Bedeutung von Mitochondrien in der Neurodegeneration diskutiert (Morais und de Strooper 2010). Im Falle der Parkinson Erkrankung ist die mitochondriale Hypothese allgemein anerkannt, da, wie bereits in 2.1.2 geschildert, eine Fehlfunktion mehrerer mitochondrialer Proteine, sowie eine Beeinträchtigung des Komplex I der Elektronentransportkette nachgewiesen werden konnte.

Auch für andere Erkrankungen, wie Amyotrophe Lateralsklerose und Huntington konnten mitochondriale Fehlfunktionen bzw. die Degeneration von Mitochondrien gezeigt werden (Beal 2005).

Im Falle der Alzheimer Erkrankung kann bei Patienten ein reduzierter Energie-Metabolismus und eine verminderte Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) in verschiedenen Zellen und Geweben nachgewiesen werden (Mancuso et al. 2006). Kontrovers diskutiert wird aber,

ob es sich hierbei um den Auslöser der Erkrankung oder um eine Folgeerscheinung handelt. Es wird berichtet, dass ein verminderter Glucose-Metabolismus eine der ersten Auffälligkeiten im Verlauf der Alzheimer Erkrankung ist (Yap et al. 2009, Silverman et al. 2001). Zudem wurde eine verminderte Enzymaktivität der Komplexe I, III und vor allem IV nachgewiesen (Navarro et al. 2008). Als Folge eines verminderten Membranpotentials, kommt es somit zu einer reduzierten Energieproduktion sowie einem Protonen-Leck in der Mitochondrienmembran. Dies führt zu einer erhöhten H₂O₂-Produktion und damit zu einer Fehlregulation redox-sensitiver Proteine sowie zu einer oxidativen Schädigung an DNS, Lipiden und Proteinen (Beal 2005). Unklar ist, auf welche Weise eine defekte Mitochondrienfunktion zu den Hauptmerkmalen der Alzheimer Erkrankung, den extrazellulären A β -Ablagerungen und den intrazellulären Neurofibrillen führen kann.

Umgekehrt gibt es Hinweise darauf, dass sowohl eine Fehlregulation des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau als auch das Protein A β zu einer Schädigung von Mitochondrien führen kann (Reddy und Beal 2005). Tau kann durch seinen Einfluss auf den Mikrotubuli-abhängigen Transport auch den Transport der Mitochondrien blockieren und folglich zu erhöhtem oxidativen Stress und dem „Verhungern“ von Synapsen führen (Reddy und Beal 2005, Mandelkow et al. 2003). Für A β wurde nachgewiesen, dass es die mitochondriale Atmung reduziert, indem es Schlüsselproteine von Glycolyse, Citrat-Zyklus und Atmungskette inhibiert (Reddy und Beal 2005, Casley et al. 2002). Weiterhin kann A β über die Freisetzung von Cytochrom c die Caspase-3 und somit Apoptose induzieren (Reddy und Beal 2005, Kim et al. 2002).

Insgesamt wird deutlich, dass Veränderung der Mitochondrien einen entscheidenden Anteil an der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen tragen. Vor allem im Falle von Alzheimer bleibt zu klären, in welchem Zusammenhang Mitochondrien dabei mit anderen zellulären Faktoren stehen.

2.3 Mitochondrien

Mitochondrien stammen ursprünglich von prokaryotischen Endosymbionten ab, weshalb sie über ein eigenes Genom, eine eigene Proteinbiosynthese und eine echte Doppelmembran verfügen. Die Doppelmembran untergliedert das Mitochondrium in eine äußere Membran, den Intermembranraum, die innere Membran und die mitochondriale Matrix. Dabei ist die äußere Membran durch relativ große Poren, wie dem Porin, für Moleküle recht durchlässig, so dass die Zusammensetzung des Intermembranraumes weitgehend der des Zytoplasmas entspricht. Die innere Membran hingegen ist sehr proteinreich, daher wenig durchlässig, stark gefaltet und umschließt die mitochondriale Matrix. In der inneren Membran befinden sich die Enzyme der Atmungskette (Buch: Grundlagen der Zellbiologie).

Nur ein geringer Anteil, ca. 1% der mitochondrialen Proteine, werden von den Mitochondrien selbst produziert. Die restlichen 99% müssen importiert und

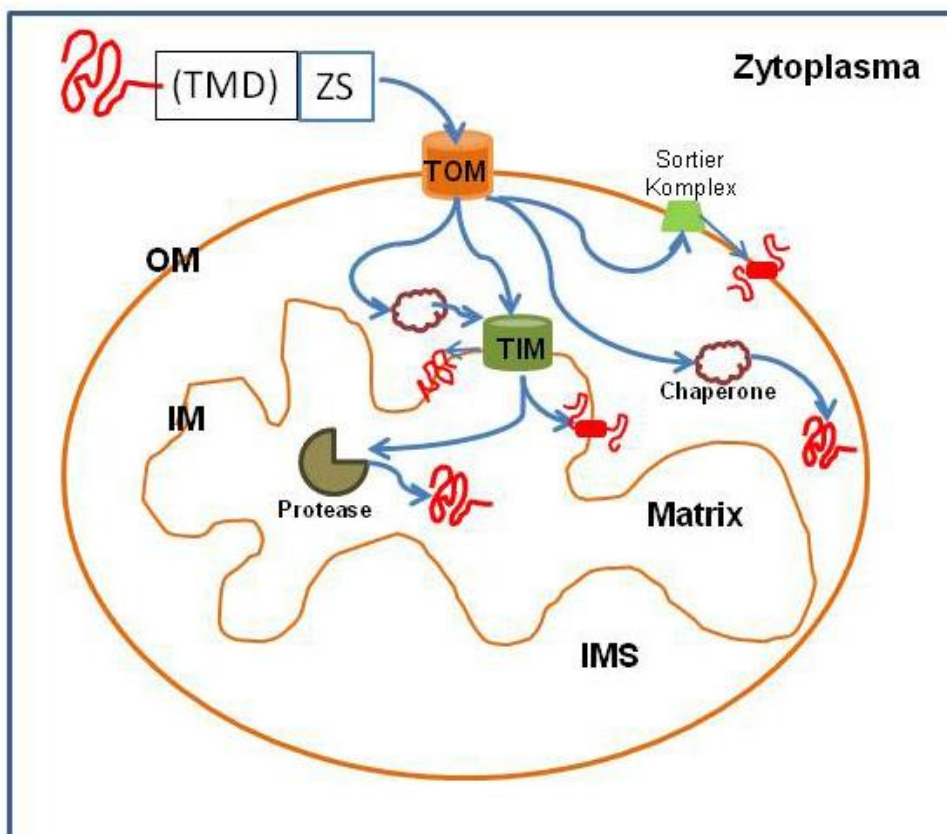


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des Proteinimportes in Mitochondrien. Proteine werden von Ribosomen im Zytoplasma gebildet. Sie besitzen eine mitochondriale Zielsequenz (ZS) und je nach Bestimmungsort eine Transmembrandomäne (TMD). Die äußere Membran (OM) passieren sie durch den TOM-Komplex, die innere Membran (IM) durch den TIM-Komplex. Chaperone und Proteasen prozessieren und falten das Protein in die reife Form.

anschließend in den richtigen Bereich des Mitochondriums transportiert werden. Sowohl in der äußeren als auch in der inneren Membran befinden sich für den Proteinimport Translokasen. Die wichtigsten sind der TOM- und der TIM-Komplex, wobei TOM die Translokase der äußeren Membran und TIM die Translokase der inneren Membran ist. Entsprechend der Erkennungssequenz eines Proteins kann dieses in das jeweilige Kompartiment des Mitochondriums transportiert werden (Abb. 4). Anhand der Sequenz eines Proteins lässt sich annähernd vorhersagen, ob es sich um ein mitochondriales Protein handelt und in welchem Bereich des Mitochondriums dieses lokalisiert sein könnte (Chacinska et al. 2009).

Neben ihrer Aufgabe der ATP-Produktion sind Mitochondrien durch ihre Eigenschaft Sauerstoffradikale und Stickoxide zu bilden, sowie Kalzium aufzunehmen und abzugeben (2.3.2), an der Signaltransduktion beteiligt. Um entsprechend des zellulären Bedarfes Energie bereitzustellen, werden Mitochondrien aktiv entlang der Mikrotubuli transportiert (2.3.3). Außerdem können Mitochondrien fusionieren oder sich teilen und defekte Mitochondrien werden in den Zellkörper transportiert und abgebaut (2.3.4).

2.3.1 Mitochondriale Atmung

Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Sowohl der kohlenhydrat-, als auch der fett- und proteinverarbeitende Stoffwechsel beginnen zunächst im Zytoplasma der Zelle. Dabei wird vor allem Pyruvat gebildet, welches in die Matrix des Mitochondriums transportiert wird. Im folgenden Citrat-Zyklus wird das Pyruvat dann zu CO_2 abgebaut. Die dabei frei werdende Energie wird vor allem in Form der Reduktionsequivalente $\text{NADH}+\text{H}^+$ gespeichert. Sie transportieren die Elektronen, welche anschließend über die Atmungskette in der Mitochondrienmembran auf Sauerstoff übertragen werden. Die Übertragung erfolgt Schritt für Schritt, da zwischen den Reduktionsequivalenten und dem reduzierten Sauerstoff in Form von H_2O eine große Potentialdifferenz von insgesamt 1,14V herrscht. Diese ergibt sich aus dem Redoxpotential von $\text{NADH}+\text{H}^+$ von $E^{\circ}=-0,32\text{V}$ und dem des H_2O von $E^{\circ}=0,82\text{V}$. Während der Elektronenübertragung wird die frei werdende Energie

durch den Transport von Protonen durch die innere Membran in ein Membranpotential und einen Protonengradienten umgewandelt. Die Elektronenübertragung und der Protonentransport wird dabei von vier Proteinkomplexen bewerkstelligt, welche entsprechend ihrer Redoxpotentiale angeordnet sind.

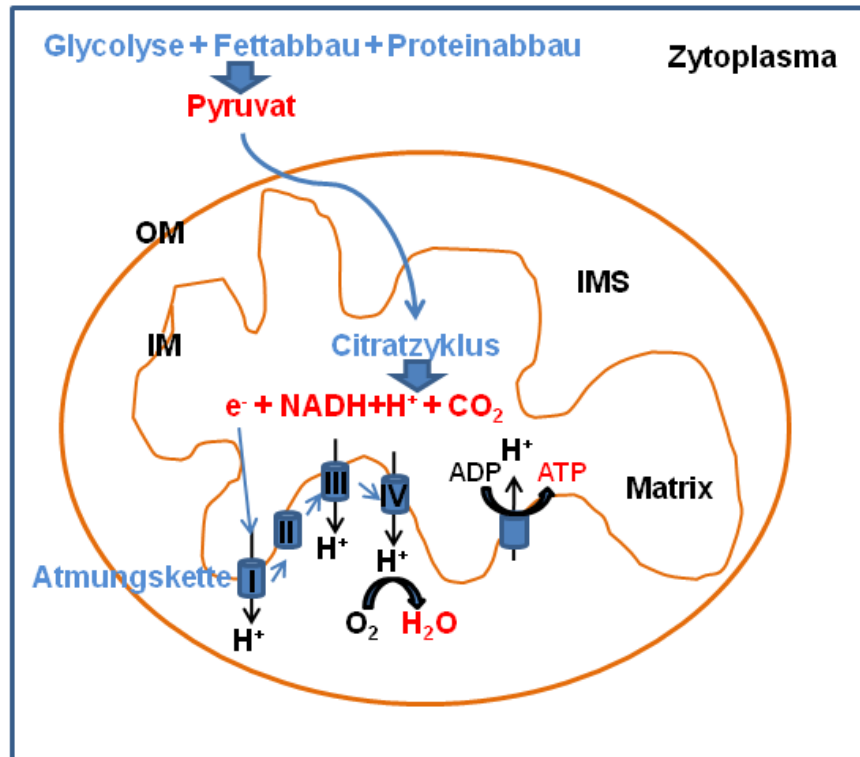


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung (zusammengefasst nach Berg et al. 2003) des mitochondrialen Metabolismus. Glycolyse, Fettabbau und Proteinabbau erfolgen zunächst im Zytoplasma bis hin zum Pyruvat. Dieses wird dann in die Matrix der Mitochondrien transportiert und dem Citratzyklus zugeführt. Die dabei frei werdenden Elektronen werden schrittweise über die Atmungskette auf H₂O übertragen. Es wird hierdurch Energie gespeichert, indem an Komplex I, III und IV Protonen durch die innere Membran (IM) transportiert werden. Beim Rückfluss der Protonen durch die ATP-Synthase wird dann das Energie-Equivalent ATP gebildet.

Komplex I ist die NADH-Dehydrogenase, welche Elektronen von NADH+H⁺ auf Ubichinon überträgt. Der Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase überträgt Elektronen von den im Citratzyklus gebildeten FADH₂ auf Ubichinon. Da das Redoxgefälle bei diesem Schritt relativ gering ist, werden hier keine Protonen von der Matrix- auf die Intermembranraumseite transportiert. Im Komplex III, der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase, werden die Elektronen des Ubichinons auf Cytochrom c übertragen und so das Cytochrom c reduziert. Im letzten Schritt an Komplex IV, der Cytochrom c-Oxidase wird das an Komplex III

reduzierte Cytochrom c wieder oxidiert und dabei molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Bei dieser Reaktion werden als Nebenprodukt auch aktive Sauerstoffradikale (ROS) freigesetzt, welche abgefangen und neutralisiert werden müssen. Der in der Atmungskette erzeugte Protonengradient kann im letzten Schritt vom sogenannten Komplex V, der ATP-Synthase zur Herstellung von ATP genutzt werden. Dafür besitzt die ATP-Synthase einen F_0 -Teil, durch welchen die Protonen in die Matrix zurück fließen und einen F_1 -Teil, welcher dabei ADP in ATP umwandelt. Bei einer hohen ATP-Konzentration oder einem niedrigen Protonengradienten kann die ATP-Synthase auch umgekehrt als ATPase arbeiten (Abb. 5) (Berg et al. 2003).

2.3.2 Mitochondrien und Kalzium

Kalzium ist ein wichtiger intrazellulärer „second messenger“, welcher durch seine Möglichkeit sich mit mehreren Liganden zu verbinden, Querverbindungen zwischen verschiedenen Proteinabschnitten herstellen und dadurch zu Konformationsänderungen des jeweiligen Proteins führen kann. Beteiligt ist Kalzium sowohl in der Phosphoinositolkaskade, es kann aber auch durch Komplexbildung mit dem Kalzium-Sensor Calmodulin eine Reihe von Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaM-Kinasen, siehe Kapitel 2.4.1) aktivieren. Um der Zelle als „second messenger“ nützlich zu sein, ist es erforderlich, dass die Kalzium-Konzentration im Zytosol einer nicht angeregten Zelle gering ist und unter 100 nM liegt (Berg et al. 2003). Mitochondrien können Kalzium aktiv aufnehmen, speichern und bei Bedarf auch freisetzen, wodurch sie die zytosolische Kalzium-Konzentration und somit die Signaltransduktion beeinflussen (Gunter et al. 2004). Kalzium wirkt im Mitochondrium aber ebenfalls als „second-messenger“, der einen vermehrten Energiebedarf anzeigt. Eine moderate, pulsartige Zunahme der intramitochondrialen Kalzium-Konzentration veranlasst die Mitochondrien durch Aktivierung von Enzymen insgesamt zu einer Erhöhung der ATP-Produktion. (Gunter et al. 2004). Eine starke Erhöhung der intramitochondrialen Kalzium-Konzentration hingegen bewirkt über die Bindung von Cyclophilin D die Öffnung mitochondrialer Poren (PTP), was letztlich zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma und somit

zur Apoptose der Zelle führen kann (Kroemer et al. 1997, Gunter et al. 2004).

2.3.3 Mitochondrientransport

Besonders in Zellen mit großer räumlicher Ausdehnung, wie dies vor allem bei Neuronen der Fall ist, kommt es darauf an, dass die Energieversorgung in allen Bereichen der Zelle gewährleistet ist. Dafür ist ein aktiver Transport der Mitochondrien erforderlich. Bereits 1993 konnten Morris und Hollenbeck zeigen, dass in wachsenden Axonen Mitochondrien vorwiegend anterograd transportiert werden und sich in NGF-stimulierten Regionen sammeln können. Dies bedeutet, dass Mitochondrien gezielt in Regionen mit hohem Energiebedarf transportiert werden und verlangt nach Mechanismen, die den anterograden Transport, das Abstoppen und den retrograden Transport der Mitochondrien erklären können. Der anterograde Transport ist Mikrotubuli-assoziiert und Kinesin-getragen (Leopold et al 1998, Hollenbeck und Saxton, 2005). Der retrograde Transport, ebenfalls Mikrotubuli-assoziiert, erfolgt durch Dynein (Habermann et al. 2001, Hollenbeck und Saxton 2005). Angelockt werden Mitochondrien über den NGF/TrkA/PI3-Signalweg. Versuche belegen, dass NGF eine lokale Häufung von Mitochondrien auslösen und ein PI3-Kinase-Inhibitor dies verhindern kann. Für den Transportstopp wurde ein molekularer Anker im Aktin-Skelett postuliert, bisher aber nicht nachgewiesen (Chada und Hollenbeck, 2004). Verschiedene Signale, welche den Transportstopp auslösen können, werden seither diskutiert. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Aktivität des Mitochondriums, da eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials, sowie ein Einstrom von Ca^{2+} über den NMDA-Rezeptor zum Transportstopp führt (Rintoul et al. 2003, Hollenbeck und Saxton 2005).

Neue Erkenntnisse zeigen, dass der mitochondriale Transportkomplex aus der schweren Kette des Kinesins (KHC), und anstelle der leichten Kette des Kinesins (KLC), aus einem Adapterkomplex besteht. Der Adapterkomplex setzt sich aus dem Adapter-Protein Milton, der GTPase Miro und der Kinase PINK1 zusammen, wobei Milton an Kinesin bindet und Miro und PINK1 die Verbindung zum Mitochondrium herstellen (Abb. 6), (Glater et al. 2006, Weihofen et al. 2009). Dieser Adapterkomplex bietet Möglichkeiten der Transportregulation. So

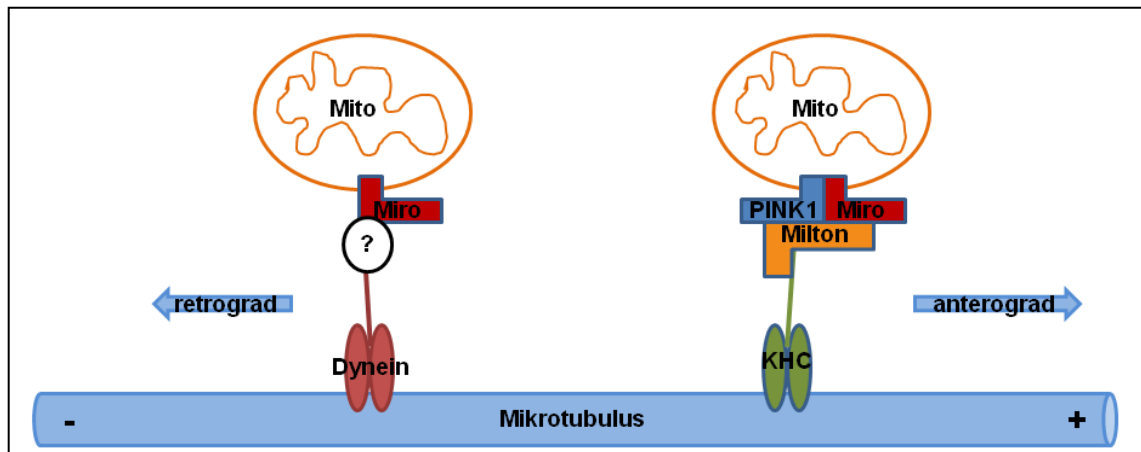


Abbildung 6: Schematische Darstellung bisheriger Ergebnisse zum Mitochondrien-Transport. Mitochondrien können antero und retro entlang der Mikrotubuli transportiert werden. Der Proteinkomplex für den anterograden Transport besteht aus der schweren Kette des Kinesins (KHC), dem Adapterprotein Milton, der GTPase Miro und der Kinase PINK1 (Glater et al. 2006, Weihofen et al. 2009). Der retrograde Transport erfolgt über das Motorprotein Dynein. Für die GTPase Miro konnte eine Beteiligung am retrograden Transport nachgewiesen werden (Russo et al. 2009).

kann das an Milton assoziierte Enzym O-GlcNAc-Transferase (OGT) als Sensor für die Glukosekonzentration der Umgebung dienen (Murrey und Hsieh-Wilson 2008) und Milton glykolisieren (Glater et al. 2006). Miro wirkt durch sein EF-Hand-Motiv als Ca^{2+} -Sensor und unterbricht durch Konformationsänderung den Transport (Wang und Schwarz 2009). Für Miro wurde außerdem die Beteiligung am retrograden Transport nachgewiesen (Abb. 6), (Russo et al. 2009). Eine regulatorische Funktion der Kinase PINK1 auf den mitochondrialen Transport wurde bisher nicht nachgewiesen.

2.3.4 Mitochondrien-Homöostase

Die Funktion von Mitochondrien unterliegt dynamischen Prozessen, die den Transport der Mitochondrien (2.3.3), den Abbau defekter Mitochondrien sowie die Fusion und die Teilung von Mitochondrien beinhaltet. Die Fusion von Mitochondrien ermöglicht es diesen, Metabolite, Proteine, sowie mitochondriale DNS je nach Bedarf auszutauschen. Die Teilung von Mitochondrien ist vor allem während der Zellteilung von Bedeutung, aber sie gewährleistet auch die Verteilung der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli. Zudem wird vermutet, dass durch Teilungsprozesse defekte Abschnitte von Mitochondrien abgeschnürt und der Mitophagie zugeführt werden (Chen und Chan 2009).

Für die Fusion von Mitochondrien sind drei Proteine verantwortlich, Mfn1 und Mfn2 sowie OPA1. Dabei bewirkten Mfn1 und Mfn2 die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran und OPA1 die der inneren Membran (Song et al. 2009, Chen und Chan 2009). Die Teilung von Mitochondrien wird hingegen von dem Dynamin-ähnlichen Protein Drp1 vermittelt. Drp1 ist ein zytosolisches Protein und muss zu den Mitochondrien rekrutiert werden. Dies erfolgt vermutlich durch Mff, einem Protein der äußeren Mitochondrienmembran (Gandre-Blabbe und van der Blik 2008, Chen und Chan 2009).

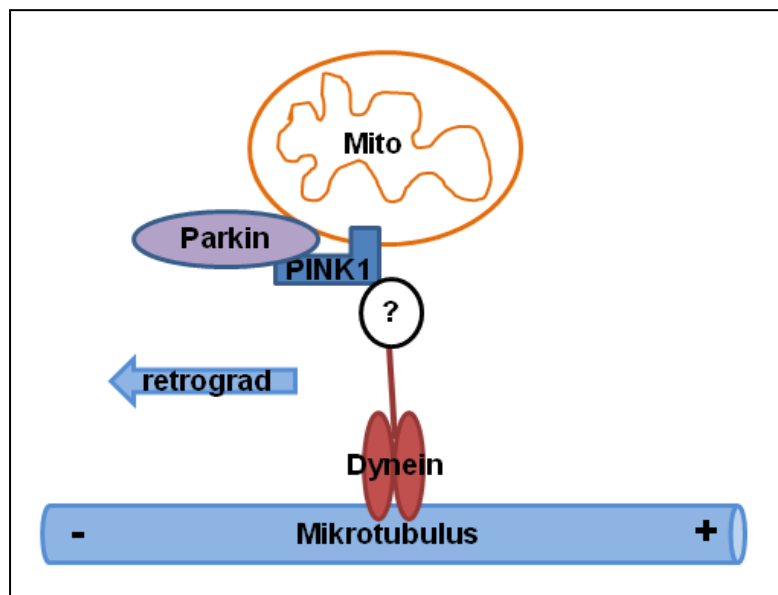


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Transportkomplexes, welcher Mitochondrien der Mitophagie zuführt. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass die E3-Ubiquitin-Ligase von PINK1 an defekte Mitochondrien rekrutiert wird und das so markierte Mitochondrium durch Dynein retrograd zum Zellsoma transportiert wird (Narendra et al. 2008, Vives-Bauza et al. 2009).

Die Mitophagie ist sowohl an Transportprozesse gekoppelt, sowie auch von der Teilung von Mitochondrien abhängig. Mitophagie bezeichnet den Abbau von Mitochondrien durch Autophagie. Dabei werden zelluläre Komponenten von Autophagosomen aufgenommen, welche anschließend mit Lysosomen verschmelzen. Dieser Prozess läuft im Zellkörper ab, weshalb defekte Mitochondrien zum Zellkörper transportiert werden müssen. Es konnte gezeigt werden, dass defekte Mitochondrien selektiv der Mitophagie zugeführt werden (Kanki und Klionski 2008, Chen und Chan 2009). Die dafür notwendige Markierung der Mitochondrien erfolgt durch die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin. Diese wird in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential durch die

Kinase PINK1 an das Mitochondrium rekrutiert (Vives-Bauza et al. 2009). Insgesamt wird deutlich, dass alle vier Mechanismen, der Transport, Fusion und Teilung und auch die Mitophagie, ineinander greifen. Defekte in diesen Prozessen wurden bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen, unter anderem Parkinson und Alzheimer, in Verbindung gebracht (Chen und Chan 2009).

2.4 Proteinkinasen

Proteinkinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion in Zellen. Sie können eine Phosphatgruppe auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäure übertragen und so andere Proteine aktivieren, inhibieren oder deren Eigenschaften ändern. Bei den humanen Proteinkinasen gibt es sieben Gruppen: AGC-Kinasen, zu welchen die PKA, PKG und PKC Familien gehören, CaMK, die Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinasen, CK1, die Casein Kinase 1, CMGC, zu welchen die cdk, MAPK, GSK3 und CLK Familien gehören, STE, Familien, die sich von Hefe-Homologen ableiten, TK und TKL, Tyrosinkinasen und Tyrosinkinasen-Ähnliche (Manning et al. 2002) Phosphoryliert werden entweder Serine und Threonine oder Tyrosine. Die unterschiedlichen Kinasegruppen unterscheiden sich in ihrer Struktur und somit in ihrem katalytischen Mechanismus und in der Art ihrer Regulation. Im Folgenden soll die Familie der Adenin-Monophosphat-Kinasen (AMPK), welche zur Gruppe der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) gehören, genauer beschrieben werden, da die in dieser Arbeit näher betrachteten Proteinkinasen PINK1 und MARK2 zu dieser Familie gehören.

2.4.1 Adenin-Monophosphat-Kinasen (AMPK)

Wie in 2.4 bereits erwähnt, bilden die Adenin-Monophosphat-Kinasen (AMPK) eine Familie der CaM-Kinasen. Die Aktivierung der CaM-Kinasen erfolgt über den Kalzium-Sensor Calmodulin. Wenn Ca^{2+} -Calmodulin an die C-Helix der Kinase bindet, wird diese aus der P-Schleife der Kinase herausgezogen und die

ATP-Bindungsstelle frei. Das Strukturmerkmal der AMP-Kinasen ist ein zentrales β -Faltblatt, welches an beiden Seiten von α -Helices umgeben ist. Die P-Schleife, verantwortlich für die ATP-Bindung, befindet sich zwischen dem ersten β -Strang und der ersten α -Helix. Wie andere Kinasen, welche ATP als Substrat verwenden, benötigen auch AMP-Kinasen bivalente Metallionen, in diesem Fall Magnesium. Das Magnesium wird dabei als Komplex zusammen mit dem ATP an das aktive Zentrum gebunden. Die Bindung des ATP-Magnesium-Komplexes erzeugt in der Kinase eine Konformationsänderung, die letztlich dazu führt, dass auch das zu phosphorylierende Substrat gebunden werden kann (Berg et al. 2003).

2.4.2 MARK2 und seine Funktionen

Zur Gruppe der CaM-Kinasen und der Familie der AMP-Kinasen gehört die MARK-Kinase-Familie (Drewes et al. 1997 und 1998; Matenia und Mandelkow 2009). MARK bedeutet Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende-Kinase und sie besitzt die Eigenschaft das Protein Tau, sowie weitere Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) zu phosphorylieren und auf diese Weise Veränderungen im Mikrotubuli-Zytoskelett hervorzurufen. Alle 4 Mitglieder der MARK-Familie in Säugern besitzen nach dem N-terminalen Kopf (N), eine konservierte katalytische Kinase-Domäne (KAT), gefolgt von einer Brücken- (CD) und einer Ubiquitin-assoziierten (UBA)-Domäne. In der C-terminalen Hälfte

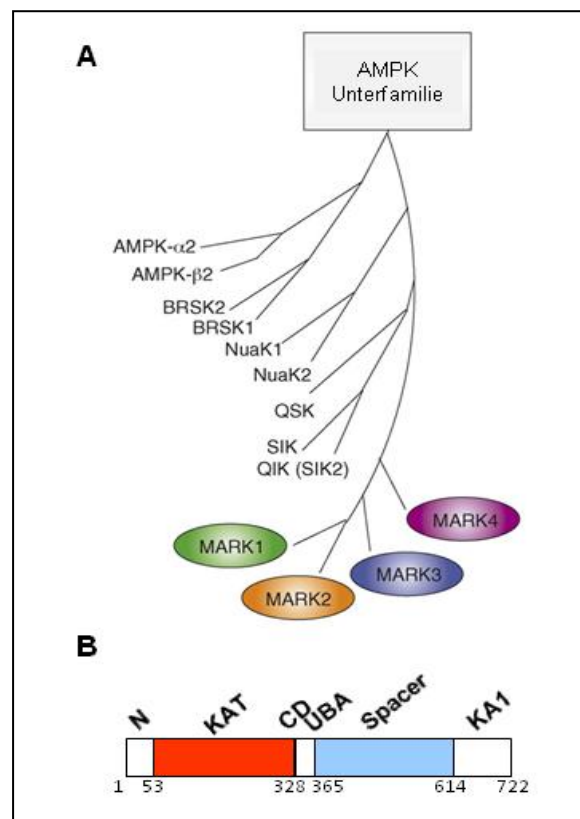


Abbildung 8: (A) Darstellung der AMP-Kinase-Familie mit den vier MARK-Varianten. (B) Domänen der MARK-Kinasen: N: N-Terminus, KAT: Kinase-Domäne, CD: Brückendomäne, UBA: Ubiquitin-assoziierte Domäne, Spacer: Platzhalterdomäne, KA1: Kinase-assoziierte Domäne. Abbildung entnommen aus *Matenia und Mandelkow 2009*

liegt die sogenannte Platzhalter-(Spacer)-Domäne, gefolgt vom C-Terminus, welcher eine Kinase-assoziierte-Domäne (KA1) enthält (Abb. 8).

MARK greift durch die Phosphorylierung verschiedener Proteine vielfach in zelluläre Prozesse ein. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass MARK2 den Zellzyklus durch Phosphorylierung von Cdc25 inhibieren kann (Müller et al. 2003, Matenia und Mandelkow 2009). Weiterhin stimuliert es die neuronale Migration über das Mikrotubuli-assoziierte Protein Doublecortin (DCX) (Sapir et al. 2008, Matenia und Mandelkow 2009) und greift über das Protein dishevelled (Dsh) in den Wnt-Signalweg ein (Abb. 9), (Wallingford und Habas 2005; Matenia und Mandelkow 2009).

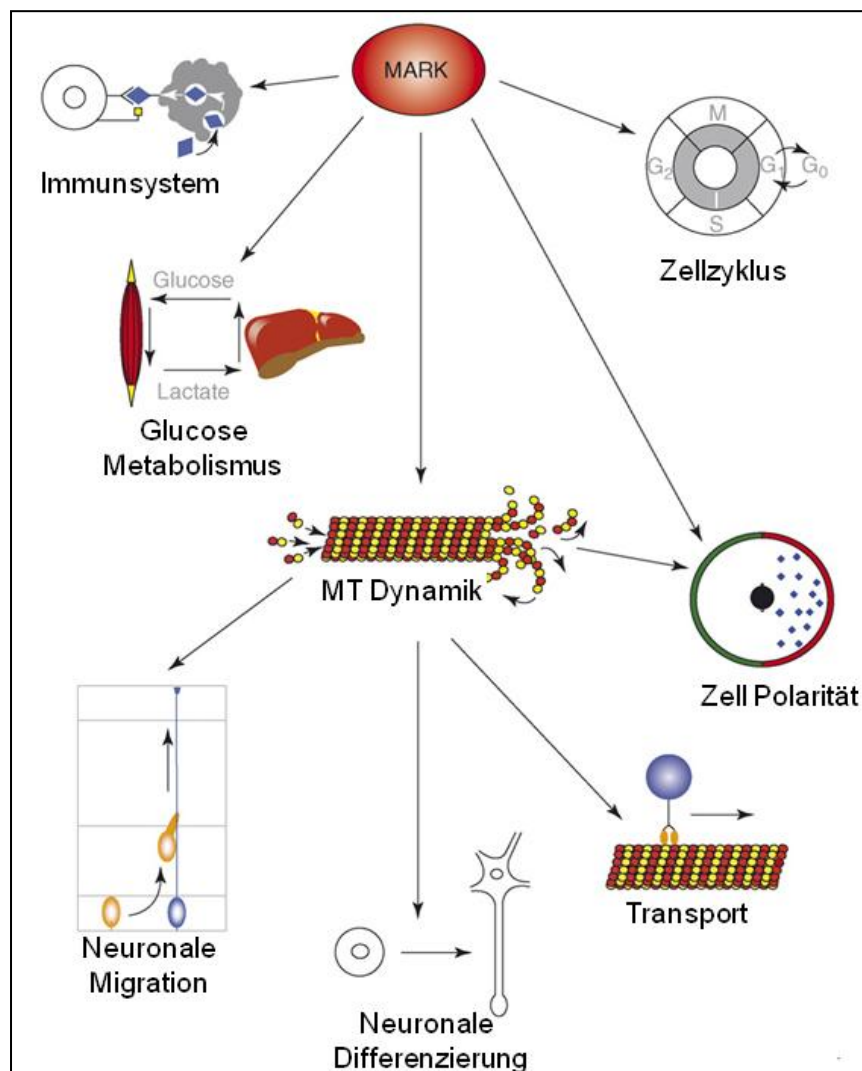


Abbildung 9: Übersicht der bekannten zellulären Funktionen der MARK Kinase Familie. Entnommen aus *Matenia und Mandelkow 2009*.

Die am besten untersuchte Funktion von MARK, im speziellen MARK2, im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung, ist die Phosphorylierung von Tau. MARK2 phosphoryliert das Lys-Xaa-Gly-Ser-Motiv, welches sich in der Wiederholungssequenz von Tau befindet. Eine verstärkte Phosphorylierung von Tau, sowie die Bildung von Tau-Aggregaten und helikalen Tau-Filamenten sind ein frühzeitiges Merkmal der Alzheimer Erkrankung (Chin et al 2000, Matenia und Mandelkow, 2009).

Tau, sowie andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) bedecken die Mikrotubuli und stabilisieren diese. Durch ein Gleichgewicht zwischen Bindung und Ablösung regulieren sie den Auf- und Abbau der Mikrotubuli und können so die Zellstruktur und die Zellpolarität beeinflussen. Darüber hinaus besetzen sie auf den Mikrotubuli auch Bindungsstellen für molekulare Motoren, wie Kinesin, weshalb sie sich inhibierend auf den Transport auswirken. MARK wiederum bestimmt durch die Phosphorylierung des Tau, dessen Gleichgewicht zwischen Mikrotubuli-Bindung und -Ablösung (Abb. 2), (Stamer et al. 2002, Mandelkow et al. 2004, Matenia und Mandelkow 2009).

In Mausmodellen konnte man neben den zuvor genannten Funktionen von MARK2 auch einen Einfluss auf das Immunsystem sowie den Glucose-Metabolismus nachweisen (Hurov et al. 2007, Hurov und Piwnica-Worms 2007, Matenia und Mandelkow 2009).

Die wichtigsten Aktivatoren von MARK sind die MARK-Kinase (MARKK) (Timm et al. 2003, Matenia und Mandelkow 2009) und der Tumor-Suppressor LKB1 (Lizcano et al. 2004, Matenia und Mandelkow 2009). Sie phosphorylieren MARK2 an T208, aktivieren MARK2 und verstärken dadurch die Dynamik des Zytoskelettes (Timm 2008, Matenia und Mandelkow 2009). Der wichtigste Gegenspieler von MARKK und LKB1 ist GSK3 β , welche MARK2 an S212 phosphoryliert und auf diese Weise ihre Aktivität hemmt (Timm et al. 2008, Matenia und Mandelkow 2009). Es zeigte sich, dass ein unphosphoryliertes S212 Voraussetzung ist für die Aktivierung von MARK2 über T208 ist. Dieses Serin stabilisiert im inaktiven Zustand der MARK2 die Aktivierungsschleife, welche die katalytische Spalte verschließt (Timm 2008, Matenia und Mandelkow 2009).

2.4.3 PINK1 und seine Funktionen

PINK1 wurde ursprünglich in genetischen Analysen von Krebs-Zellen entdeckt und als eine von dem Tumor-Suppressor PTEN induzierte Kinase identifiziert, wobei PTEN in die Regulation des Phosphatidyl-Inositol-Signalweges involviert ist (Unoki und Nakamura, 2001, Deas et al. 2009).

Inzwischen ist bekannt, dass es sich bei PINK1 um eine Serin-Threonin-Kinase handelt. Sie besitzt eine mitochondriale Zielsequenz, sowie eine putative Transmembrandomäne. In der Zelle kommt sie in drei Spaltprodukten vor – in der vollständigen Länge von 66 kDa und zwei Fragmenten, von 54 kDa bzw. 45 kDa (Deas et al. 2009). Kürzlich wurde zudem nachgewiesen, dass es sich bei PINK1 um eine CaM-Kinase handelt (Cardona et al. 2011).

Aufgrund der mitochondrialen Zielsequenz wurde in den letzten Jahren intensiv an der Bedeutung der PINK1 für die mitochondrialen Funktionen geforscht. Einer der wichtigsten unklaren Punkte ist, in welchem Abschnitt der Mitochondrien PINK1 lokalisiert ist. PINK1 wurde sowohl im Intermembranraum (Silvestri et al. 2005) als auch in der inneren und äußeren Membran (Gandhi et al. 2006, Zhou et al. 2008) nachgewiesen. Auch ein Export der prozessierten Spaltprodukte in das Zytoplasma wird beschrieben (Beilina et al. 2005, Haque et al. 2008).

Funktionell greift PINK1 in unterschiedliche mitochondriale Prozesse ein. Ein Fehlen von PINK1 führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Stress-induzierter Apoptose (Deng et al. 2005, Valente et al. 2004, Wood-Kaczmar et al. 2008, Deas et al. 2009). In Studien an Patienten, welche PINK1-Mutationen tragen, konnte außerdem gezeigt werden, dass deren Zellen eine verminderte Komplex I-Aktivität und höhere Level oxidativen Stresses haben (Hoepken et al. 2007, Deas et al. 2009). Dies konnte in PINK1-KO-Mausmodellen bestätigt werden (Morais et al. 2009). Gautier et al. (2008) konnte zusätzlich auch verminderte Aktivitäten der Komplexe III und IV nachweisen. Ein Mechanismus, über welchen PINK1 auf die mitochondriale Atmung Einfluss nehmen könnte, ist noch nicht bekannt.

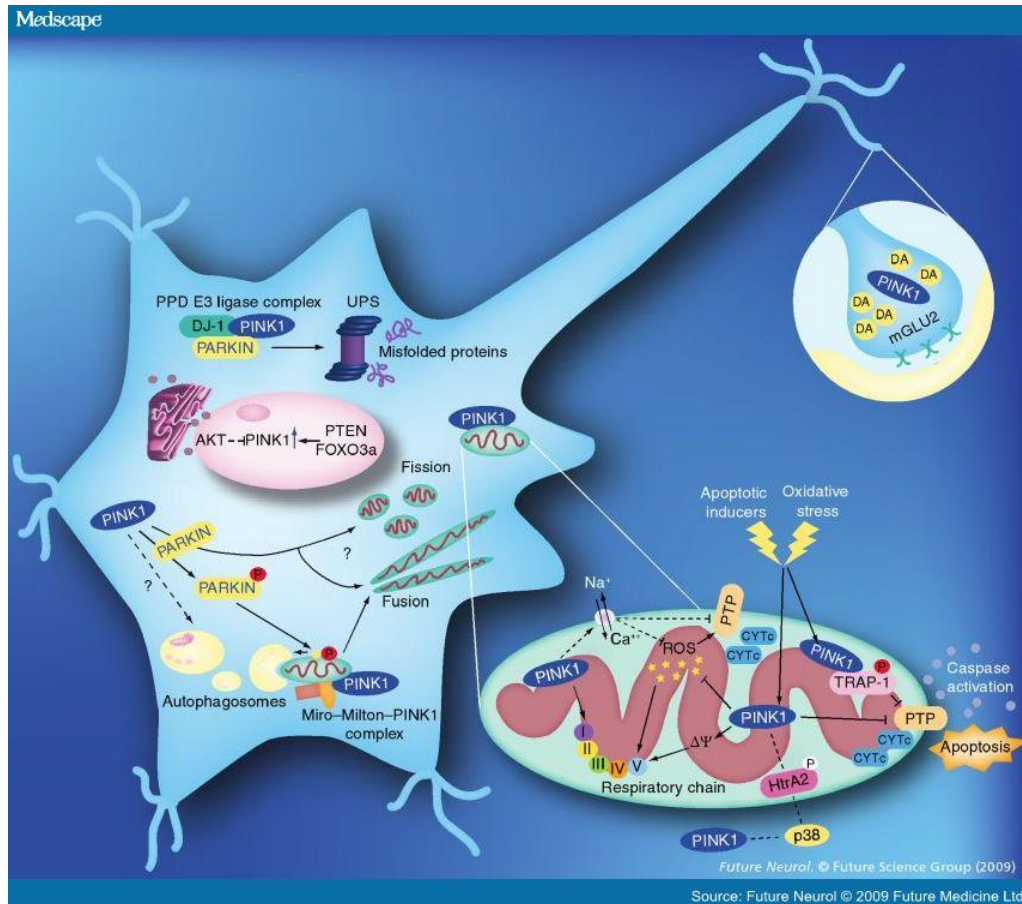


Abbildung 10: Darstellung der bekannten PINK1-Funktionen. Abbildungsherkunft: <http://img.medscape.com/article/711/447/711447-fig2.jpg>

Weiterhin wird PINK1 eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben, indem sie zwei mitochondriale Chaperone TRAP1 und Omi/HtrA2 phosphoryliert (Pridgeon et al 2007, Plun-Favreau et al. 2008) und damit die korrekte Faltung mitochondrialer Proteine kontrolliert.

Umstritten ist der Einfluss von PINK1 auf die Prozesse der mitochondrialen Fusion und Teilung. In *Drosophila* wird PINK1 ein positiver Einfluss auf die Teilung (Poole et al. 2008, Yang et al. 2008) in Säugerzellen dagegen ein positiver Einfluss auf die Fusion der Mitochondrien beobachtet (Exner et al. 2007, Wood-Kaczmar et al. 2008). Allerdings steht diesen Ergebnissen eine neuere Publikation gegenüber, welche auch in Säugerzellen einen positiven Effekt von PINK1 auf die Teilung der Mitochondrien zeigt (Yu et al. 2011). Bisher konnte keine direkte Interaktion mit den Proteinen von mitochondrialer Fusion und Teilung gezeigt werden.

Besser untersucht ist der Einfluss von PINK1 auf die Mitophagie. Wie bereits in 2.3.4 beschrieben, werden Mitochondrien durch Parkin, einer E3-Ubiquitin-

Ligase, für die Mitophagie markiert (Narendra et al. 2008). PINK1 bewirkt, abhängig vom mitochondrialen Membranpotential, die Translokation von Parkin aus dem Zytosol an das Mitochondrium (Vives-Bauza et al. 2009). Ein hohes Membranpotential führt zum Schneiden von PINK1, ein geringes Membranpotential hingegen führt vorwiegend zu der 66 kDa PINK1-Form, welche Parkin an die Mitochondrien rekrutiert (Narendra 2010).

Letztlich wurde auch der Einfluss von PINK1 auf den mitochondrialen Transport untersucht. Nachgewiesen werden konnte in diesem Zusammenhang, dass PINK1, sowohl die 66 kDa-, als auch die 55 kDa- und 45 kDa-Form, mit dem von Wang und Schwarz gezeigten mitochondrialen Transportkomplex aus Kinesin, Miro und Milton interagiert (Weihofen et al. 2009). Die Funktion von PINK1 in diesem Komplex wurde dabei noch nicht analysiert.

2.5 Ziel der Arbeit

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde mittels Hefe-2-H-Tests und biochemischen Nachweisen eine Interaktion zwischen den Kinasen MARK2 und PINK1 entdeckt. Es zeigte sich, dass MARK2 PINK1 phosphoryliert, womit MARK2 als erster vorgeschalteter Regulator von PINK1 identifiziert wurde (Matenia et al. 2011; eingereicht). Da diese beiden Kinasen eine wichtige Rolle in der Neurodegeneration spielen, kann die Aufklärung ihrer Funktionen entscheidend dazu beitragen neurodegenerative Krankheiten besser zu verstehen. In dieser Arbeit wurde nicht nur die Interaktion der beiden näher beleuchtet, sondern auch *in vivo* der Transport von Mitochondrien in retinalen Ganglienzellen beobachtet. Dies erschien aus zwei Gründen sinnvoll. Einerseits ist PINK1 nachweislich Teil des mitochondrialen Transportkomplexes (Weihofen et al. 2009), andererseits hat MARK2 durch seinen Einfluss auf Tau eine wichtige Funktion in zellulären Transportprozessen (Mandelkow et al. 2004). Es sollte daher geklärt werden, ob beide Prozesse ineinander greifen und ob die Phosphorylierung von PINK1 durch MARK2 den mitochondrialen Transport reguliert.

Weiterhin sollten ebenfalls durch Hefe-2-H-Tests weitere Interaktionspartner der Kinase PINK1 identifiziert und deren Zusammenspiel mit der Kinase MARK

überprüft werden. Dabei wurde das mitochondriale Protein COX5B, eine Untereinheit des Komplex IV der Atmungskette, identifiziert. Dieser direkte Zusammenhang zwischen PINK1 und der ATP-Generierung innerhalb des Mitochondriums eröffnet neue Möglichkeiten einer Regulation der mitochondrialen Atmung.

3 Material

3.1 Geräte

| | |
|---|---------------------------------|
| Brutschrank (water jacketed incubator) | Forma Scientific |
| Heizblock (TCR 100) | Roth |
| Luminescent Image Analyser | Fuji |
| Gelkammer horizontal | BIO-RAD |
| Ethidiumbromid-Fotoeinheit | |
| Sterilbank (HeraSafe) | HERAEUS |
| pH-Meter (Qph70) | Merck |
| Schüttler (innova 4230) | New Brunswick Scientific |
| | Eppendorf |
| Spektralphotometer | Eppendorf |
| Thermocycler (Mastercycler gradient) | VWR |
| Blottingkammer (Semi-dry) | Scientific Industries |
| Vortex (Genie2) | Roth |
| Waage | HERAEUS |
| Tischzentrifuge (pico) | Eppendorf |
| Kühlzentrifuge (5810 R) | GFL |
| Wasserbad | Amersham |
| SDS Gelelektrophorese – Kammer | Bioscience |
| | Olympus |
| Mikroskop (CK2) | Zeiss |
| konfokales Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 Meta) | Fuji |
| Phospho-Imager (BAS 3000) | Packard Canberra |
| Szintillationszähler (Tricarb 1900 CA) | Applied Biosystems |
| Ltd MALDI-TOF, Voyager-DE STR time of flight instrument | MPASMB |
| Elektrophoresekammer für Phosphopeptidmapping | SLM Aminco |
| French Press (Pressure Cell 20 kpsi) | (Mickle Laboratory engeneering) |
| Mcllwain Tissue Chopper | |

3.2 Software

| | |
|--|--------------------|
| AIDA Biopackage | Raytest |
| LSM 5 Image Processing Software | Zeiss |
| Olympus-Imaging-Software | Olympus |
| ImageJ-Kymograph http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html | |
| Data Explore TM Software | Applied Biosystems |
| VECTOR NTI | InfoMax |
| | & Invitrogen |

3.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in analysenreiner Qualität von Amersham Bioscience, Bio-Rad, Calbiochem, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Qiagen, Roche, Roth und Sigma bezogen.

3.4 Enzyme

| | |
|------------------------------|-----------|
| alkalische Phosphatase (CIP) | Fermentas |
| Restriktionsendonucleasen | Fermentas |
| T4 DNS-Ligase | Fermentas |
| Klenow Fragment | Fermentas |
| Pfu Ultra Polymerase | Fermentas |
| PWO DNS-Polymerase | ROCHE |

3.5 Antikörper

primäre Antikörper

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Penta·His™; Tetra·His™ | QIAGEN |
| GST – Antikörper | Zymed Laboratories |
| β-Aktin | Sigma |
| MARK (1-4, Epitop AS: 1-377) | Eurogentec |
| MARK2 ^{pT208} | Eurogentec |
| PINK1 | Novus |
| Kinesin Heavy Chain | Millipore |
| COX5B-GST | Abnova |

sekundäre Antikörper

| | |
|--|----------------|
| anti-Maus IgG, aus Ziege, HRP gekoppelt | DAKOCytomation |
| anti-Kaninchen IgG, aus Ziege, HRP gekoppelt | DAKOCytomation |
| anti-Maus IgG, aus Ziege, TRITC gekoppelt | Immunoresearch |
| anti-Maus IgG, aus Ziege, FITC gekoppelt | Immunoresearch |
| anti-Kaninchen IgG, aus Ziege, TRITC gekoppelt | Immunoresearch |
| anti-Kaninchen IgG, aus Ziege, FITC gekoppelt | Immunoresearch |

Fluoreszenz-gekoppelte Farbstoffe

| | |
|---------------------------|-------------------|
| MitoTracker® Deep Red 633 | Molecular Probes® |
|---------------------------|-------------------|

3.6 Molekulargewichtsmarker

Proteinmarker

Protein Molecular Weight Marker, prestained/unstained (MBI Fermentas)

β -Galaktosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa),
Laktat-Dehydrogenase (35 kDa), Restriktionsendonuklease Bsp981 (25 kDa),
 β -Laktoglobulin (18,4 kDa), Lysozym (14,4 kDa)

Magic Mark (Invitrogen)

Größen (kDa): 120, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20

DNS-Marker

Smart Ladder (MBI Fermentas)

Fragmentgrößen (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500,
1000, 800, 600, 400, 200

3.7 Vom Hersteller bezogene Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits)

| | |
|---|------------------------|
| ECL plus Western Blotting Detection Kit | Amersham Bioscience |
| Nucleobond Midi EF Kit | Macherey - Nagel |
| Invisorb Spin Plasmid Mini Kit | Invitex |
| Gel Extraction Kit (Ultra Clean™15) | MoBio Laboratories |
| Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit | Stratagene |
| Effectene Transfection Reagenz | Qiagen |
| Lipofektamin Transfection Reagenz | Invitrogen |
| Mitochondria Isolation Kit (MITOISO2) | Sigma |
| Cytochrome c Oxidase Assay Kit (CYTOCOX1) | Sigma |

3.8 Medien und Zusätze

3.8.1 Bakterienmedien

LB-Agar

25 g/l LB Broth
25 g/l Bacto-Agar

Ampicillin

100 mg/ml
(steril filtrieren in H₂O)

Kanamycin

100 mg/ml
(steril filtrieren in H₂O)

LB-Medium

25 g/l LB Broth

SOC-Medium

20 g/l Bacto Trypton
5 g/l Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
10 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
ad 980 ml H₂O
nach dem
Autoklavieren: 20 ml Glucose (1M)

Die Medien wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, in das kalte Medium (Endkonzentration von 100 µg/ml)

3.8.2 Hefemedien

Selektionsmedium

8 g/l Hefe-Stickstoffbasis
ohne AS
55 mg/l Tyrosin
55 mg/l Uracil
55 mg/l Adenin
nach dem Autoklavieren auf
60°C abkühlen lassen, dann
Zugabe von:
10 ml/l 100 x AS Dropout
Lösung
100 ml/l 20% Glucose-Lösung

Vollmedium (YEPD)

11 g/l Hefe-Extrakt
22 g/l Bacto Pepton
55 mg/l Adenin
nach dem Autoklavieren
100 ml/l 20% Glucose-Lösung

Vollmedium-Agar

25 g/l Bacto Agar
in Vollmedium ansetzen

Aminosäure-Dropout-Lösung (100xStock)

| | |
|--------------|-------|
| Arginin | 0,2 g |
| Histidin | 0,1 g |
| Isoleucin | 0,6 g |
| Leucin | 0,6 g |
| Lysin | 0,4 g |
| Methionin | 0,1 g |
| Phenylalanin | 0,6 g |
| Threonin | 0,5 g |
| Tryptophan | 0,4 g |

lösen in 100 ml Aqua bidest., steril
filtrieren, Lagerung bei 4°C, die im
jeweiligen Dropout nicht benötigten
Aminosäuren wurden weggelassen

20% Glucose
200 g Glucose in 1 l Aqua
bidest. lösen und autoklavieren

Selektionsmedium-Agar
25 g/l Bacto Agar
in Selektionsmedium ansetzen

3.8.3 Zellkulturmedien

CHO Zellen Medium

F12 (HAM) Medium (PAA Laboratories)
FKS 100 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml) 10 ml/l

CHO httau40 Medium

F12 (HAM) Medium (PAA Laboratories)
FKS 100 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml) 10 ml/l
G418 (synthetisches Gentamycin) 600 µl/ml

PC12-Zellen Kulturmedium

Dulbecco's modif. Eagle Medium (PAA Laboratories)
HS 150 ml/l
FKS 50 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml) 10 ml/l

PC12 Differenzierungsmedium

DMEM:F12 1:1 (PAA Laboratories)
HS:FKS 1:1 1 ml/l
NGF (10 µg/ml) 10 ml/l

Neuronen Plating-Medium

MEM (PAA-Laboratories)
HS 100 ml/l
Pyruvat 1 ml/l
Glucose 4%
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml) 10 ml/l

Neuronen Wachstums-Medium

Neurobasal-Medium (PAA Laboratories)
B27 Supplement
L-Glutamin (200 mM) 10 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml) 10 ml/l

Retina-Medium

DMEM (PAA-Laboratories)
Methylcellulose 8 g/l, autoklaviert und
anschließend in DMEM suspendiert
FCS 100 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml) 10 ml/l

3.9 Puffer und Lösungen

50 x TAE

2 M Tris X
50 mM EDTA
57,1 ml/l Essigsäure
auf pH 8 einstellen

5 x DNS-Probenpuffer

9 mM Tris pH 7,4
0,45 mM EDTA
46% (v/v) Glycerol
0,005% (w/v) Bromphenolblau

Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) APS in Aqua bidest.
lösen
Lagerung -20°C

Blocking Puffer

5% (w/v) Milchpulver in TBS-T

DTT-Lösung

1 M DTT in 0,01 M Na-Acetat
lösen
Lagerung -20°C

10 x TBS-T

1,5 M NaCl
100 mM Tris X
5 ml/l Tween20
auf pH 7,2 einstellen

1 x Blotting Puffer

10% 10 x Blotting Puffer
5% Methanol

10 x Blotting Puffer

0,48 M Tris X
0,39 M Glycin
0,3% (w/v) SDS

10 x SDS Puffer

250 mM Tris X
1,9 M Glycin
1% (w/v) SDS

Coomassie-Färbelösung

0,1% (w/v) Coomassie Blau R-250
50% Methanol
7,5% Essigsäure

Coomassie Entfärber (Intensiv)

50% Methanol
10% Eisessig

Coomassie Entfärber (Normal)

5% Methanol
7,5% Eisessig

Kalziumchlorid-Lösung

2,5 M Calciumchlorid
steril filtrieren

RIPA Puffer

50 mM Tris pH 7,2
150 mM NaCl
2 mM Na-O-Vanadat
25 mM β -Glycerophosphat
10 mM Na-Pyrophosphat
0,5% (w/v) Desoxycholat
1% (v/v) Triton X-100
0,1% (w/v) SDS
auf pH 7,2 einstellen
vor Gebrauch je 10 ml 1 Tablette
Protease Inhibitoren Cocktail lösen

5 x Kinase Puffer

250 mM TrisHCl pH 7,3
25 mM MgCl₂
10 mM EGTA
5 mM DTT
5 mM Benzamidin
2,5 mM PMSF

2 x Protein Probenpuffer

160 mM Tris pH 6,8
10% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerol
2% (v/v) β -Mercaptoethanol
0,01% (w/v) Bromphenolblau

5 x Protein Probenpuffer

50 mM Tris pH 6,8
 12,5% (w/v) SDS
 20% (v/v) Glycerol
 10% (v/v) β -Mercaptoethanol
 0,025% (w/v) Bromphenolblau

LiSORB

100 mM LiAc
 10 mM Tris HCl
 1 mM EDTA
 1 M Sorbitol (M=182,2)
 auf pH 8 einstellen und
 autoklavieren

10 x Lithium Acetat (LiAc)

1 M LiAc
 auf pH 7,5 einstellen und
 autoklavieren

STET-Puffer

8% (w/v) Saccharose
 50 mM EDTA
 50 mM Tris HCl pH 8
 5% (v/v) Triton X-100

45% PEG

45% (w/v) PEG (4000)
 in Aqua bidest. lösen und steril
 filtrieren

Plate Mixture

45% PEG 4000
 0,1 M Lithiumacetat
 10 mM Tris pH 7,4
 1 mM EDTA

LiAc/TE-Mix

400 μ l 100 x TE
 4 ml 10 x LiAc
 35,6 ml Aqua bidest.

X-Gal Stock Lösung

2 mg/ml X-Gal in DMF lösen

PEG/LiAc-Mix

56 ml PEG (45%)
 7 ml LiAc (10 x)
 750 μ l TE (100 x)
 6,25 ml Aqua bidest.

3.10 Bakterien- und Hefestämme, Viren und Zelllinien**3.10.1 Bakterienstämme**

Für die durchgeführten Transformationen zur Plasmidanreicherung diente der E. coli Stamm DH5 α (Invitrogen) mit dem Genotyp:

F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1.

Nach einer Mutagenese erfolgte die Transformation in XL-2 Blue Zellen (Stratagene) mit dem Genotyp:

endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]

Für die Proteinexpression wurden Bakterien des Stammes E. coli BL21(DE3)pLysTM (Calbiochem) mit folgendem Genotyp verwendet:

E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3)[pLysS Cam^r]

3.10.2 Hefestamm

Für alle durchgeführten Experimente wurden Hefen des Stammes AH109 (Clontech) mit folgendem Genotyp verwendet:

MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his 3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-His3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ.

3.10.3 Adenoviren

Die verwendeten Adenoviren der Konstrukte PINK1^{FL}-YFP, ΔN-PINK1-YFP, ΔN-PINK1^{T313M}-YFP, CFP-MARK2^{wt} und CFP-MARK2^{T208A/S212A} wurden freundlicherweise von Dr. Jacek Biernat (MPG-ASMB) zur Verfügung gestellt.

3.10.4 Eukaryontische Zelllinien

| Bezeichnung | Organismus | Spezifikation |
|-------------------------|---------------------------|--|
| CHO | <i>Cricetulus griseus</i> | Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster |
| CHO-htau40 | <i>Cricetulus griseus</i> | CHO Zellen, die stabil mit der längsten humanen Tau-Isoform (htau40) transfiziert sind; Quelle: MPASMB |
| PC 12 | <i>Rattus norvegicus</i> | Zellen eines Nebennierentumors |
| Cortex-Zellen | <i>Rattus norvegicus</i> | Neurone und Gliazellen des Cortex |
| Retinale Ganglienzellen | <i>Gallus gallus</i> | |

3.11 Vektoren

| Bezeichnung | Charakterisierung | Anwendung | Quelle |
|--------------------------------|---|---|---------------------|
| pGBKT7 | 7,3 kb, Kana ^R , Tryptophan Selektionsmarker, Gal4-DNS-Bindedomäne vor MCS | Interaktionsuntersuchungen im Hefe-2-H System | Clontech |
| pGADT7 | 8,0 kb, Amp ^R , Leucin Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor MCS | Interaktionsuntersuchungen im Hefe-2-H System | Clontech |
| pACT2 | 8,1 kb, Amp ^R , Leucin Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor MCS | Interaktionsuntersuchungen im Hefe-2-H System, Träger der cDNS-Bibliothek | Clontech |
| pEU | 5,5 kb, Amp ^R | Expressionsvektor für Säugetierzellen | MPASMB |
| pEYFP-C1 | 4,7 kb, Kana ^R , YFP als N-terminales Fusionsprotein | Expressionsvektor für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen | Clontech |
| pECFP-C1 | 4,7 kb, Kana ^R , CFP als N-terminales Fusionsprotein | Expressionsvektor für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen | Clontech |
| pShuttleCMV/mRFP1 | 8 kb, Kana ^R , mRFP als N-terminales Fusionsprotein | Expressionsvektor für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen | MPASMB |
| pGEX-2T | 4,9 kb, Amp ^R , am N-Terminus mit GST-Fusionsprotein | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | Amersham Bioscience |
| pGEX-4T-3 | 4,9 kb, Amp ^R , am N-Terminus mit GST-Fusionsprotein | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | Amersham Bioscience |
| pCR [®] -BluntII-TOPO | 3,5 kb, Kana ^R | Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> | Invitrogen |

3.12 Oligonukleotide

| | |
|------------------|---|
| PINK1-T313M-for: | 5' CCATGGCCGGATGCTGTTCCCTCGTT 3' |
| PINK1-T313M-rev: | 5' AACGAGGAACAGCATCCGGCCATGG 3' |
| PINK1-T313A-for: | 5' CATGGCCGGGCGCTGTTCCCTCGTTATGAAG 3' |
| PINK1-T313A-rev: | 5' CTTCATAACGSGGAACAGCGCCCGGCCATG 3' |
| PINK1-T313E-for: | 5' GCCATGGCCGGGAGCTGTTCCCTCGTTATGAAG 3' |
| PINK1-T313E-rev: | 5' CTTCATAACGAGGAACAGCTCCCGGCCATGGC 3' |
| COX5B-XhoI-for: | 5' TATCTCGAGCTATGGCTTCAAGGTTAC 3' |
| COX5B-NheI-rev: | 5' TACTAGCTAGCTCAGTGTGCCAGCTGC 3' |
| COX5B-NdeI-for: | 5' TCGAGCATATGGCTTCAAGGTTACTTCGC 3' |
| COX5B-BamHI-for: | 5' GTGGATCCATGGCTTCAAGGTTACTTCG 3' |
| COX5B-EcoRI-rev: | 5' TAGAATTCGTGTGCCAGCTGCTGC 3' |
| KHC-EcoRI-for: | 5' ATCCGAATTCCTAGCAGCCCGGGGATC 3' |
| KHC-EcoRI-rev: | 5' AGGCTGCAGGGAATTCCTACTCTGCATTTAC 3' |

3.13 Hergestellte und bestehende Konstrukte

Bestehende Expressionskonstrukte

Die folgenden Expressionskonstrukte wurden, falls nicht anders vermerkt, aus dem Bestand der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie verwendet.

PINK1^{wt}-YFP-pShuttle \cong PINK1^{FL}-YFP
 PINK1-156-581-YFP-pShuttle \cong Δ N-PINK1-YFP
 PINK1^{wt}-pVL-His \cong PINK1^{FL}-pVL-His
 PINK1^{wt}-pEU-myc \cong PINK1^{FL}-pEU-myc
 PINK1-156-581-pEU-myc \cong Δ N-PINK1-pEU-myc
 PINK1wt-pGBKT7
 PINK1-156-511-pGBKT7
 PINK1-156-581-pGBKT7
 PINK1-156-581-pGADT7
 MARK2^{wt}-pECFP
 MARK2^{T208A/S212A}-pECFP
 MARK2^{T208E}-pECFP
 MARK2wt-pGBKT7
 MARK2-1-326-pGBKT7
 MARK2-1-202-pGBKT7
 MARK2-186-328-pGBKT7
 MARK2-324-722-pGBKT7
 MARK2-365-722-pGBKT7
 MARK2-365-614-pGBKT7
 MARK2-614-722-pGBKT7
 MARK2^{T208E}-pNG-His
 rKHC-pBS
 LIMK-pEU-myc
 PINK1(wt)-pCMV-Sport6 RZPD

Hergestellte Eukaryotische Expressionskonstrukte

PINK1^{FL/T313M}-YFP-pShuttle:

Hergestellt aus dem Ausgangskonstrukt PINK1^{FL}-YFP-pShuttle über Punkt-Mutagenese mit den Primern: PINK1-T313M_for und PINK1-T313M_rev

Δ N-PINK1^{T313M}-YFP-pShuttle:

Hergestellt aus dem Ausgangskonstrukt Δ N-PINK1-YFP-pShuttle über Punkt-Mutagenese mit den Primern: PINK1-T313M_for und PINK1-T313M_rev

COX5B - pEU-myc:

Als Ausgangsvektor diente LIMK-pEU-myc, aus welchem LIMK durch NdeI/NheI ausgeschnitten wurde. COX5B wurde mit den Primern COX5B-NdeI-for und COX5B-NheI-rev aus dem COX5B-pACT2 –Konstrukt amplifiziert und über NdeI/NheI in den zuvor hergestellten pEU-myc-Vektor kloniert.

Hergestelltes Hefe-Expressionskonstrukt

COX5B-pACT2:

Entspricht dem gefischten Klon 118 des PINK1-156-511-Screens, da dieser die vollständige codierende Sequenz enthält.

Hergestellte E.coli-Expressionskonstrukte

PINK1-156-581-pGEX-4T-3 \cong Δ N-PINK1-pGEX-4T-3:

pGEX-4T-3-Vektor wurde BamHI verdaut und mit Klenow aufgefüllt. PINK1-156-581 wurde aus dem PINK1-156-581-pGADT7 NdeI herausgeschnitten, mit Klenow aufgefüllt. Ligation über SmaI-Schnittstelle.

Δ N-PINK1^{T313A}-pGEX-4T-3:

Hergestellt aus dem Ausgangskonstrukt Δ N-PINK1-pGEX-4T-3 über Punkt-Mutagenese mit den Primern: PINK1-T313A-for und PINK1-T313A-rev

COX5B-pGEX-2T:

COX5B-mRNA aus gefischtem PINK1-Screen-Klon 118 (COX5B-pGADT7) mit dem Primer-Paar COX5B-BamHI-for und COX5B-EcoRI-rev amplifiziert und anschließend über BamHI und EcoRI in pGEX-2T kloniert.

KHC-pGEX-2T:

KHC (Ratten-Kif5C) aus dem Ausgangskonstrukt rKHC-pBS mit den Primern KHC-EcoRI-for und KHC-EcoRI-rev amplifiziert und über EcoRI/EcoRI in pGEX-2T kloniert.

3.14 cDNS-Bibliothek

Die Ausgangs-cDNS-Bibliothek (Human fetal brain MatchmakerTM cDNS library) wurde von der Firma BD Bioscience Clontech bezogen. Die Poly(dT) gepimten cDNSs aus fötalen menschlichen Gehirn sind hinter die Gal4-Aktivierungsdomäne in dem Zwei-Hybrid Vektor pACT2 kloniert. Die cDNS-Bibliothek umfasst $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone mit Längen zwischen 500-4000 bp.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 DNS-Amplifikation mittels PCR

Die Untersuchung von Genen und Genfragmenten kann in verschiedenen Zellsystemen und Modellen erfolgen. Dafür werden die Gene oder Genfragmente in die geeigneten Expressionsvektoren kloniert, wobei die selektive Amplifizierung der jeweiligen DNS mittels PCR aus beispielsweise einer cDNS-Bibliothek der erste Schritt ist. Die PCR (polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion) basiert darauf, die doppelsträngige DNS bei hohen Temperaturen in Einzelstränge zu trennen und den gewünschten DNS-Abschnitt durch Verwendung spezifischer Primer und einer hitzestabilen Polymerase zu kopieren. Die Menge der DNS-Kopien steigt dabei im Verlauf mehrerer Zyklen exponentiell an. Die vorgenommenen PCRs wurden wie folgt durchgeführt:

| Ansatz | Programm |
|--|--|
| 50-200 ng DNS 1 µl Primer forward (10pmol/ µl) 1 µl Primer reverse (10pmol/ µl) ad 12,5 µl mit Aqua bidest. Zugabe: 12,5 µl PWO Master Mix | 1. 2 min bei 95°C 2. 0,5 min bei 95°C 3. 0,5 min bei X°C 4. Y min bei 72°C 5. 30 Zyklen der Schritte 2-4 6. 5 min bei 72°C 7. Kühlen bei 4°C X= Annealingtemp. je nach Primerpaar Y= Elongationszeit je nach Länge des DNS-Abschnittes |

4.1.2 Erstellung von Punktmutationen

Für die Erzeugung von Punktmutationen werden Primer benötigt, die homolog zu der zu mutierenden DNS-Sequenz sind, aber an der gewünschten Stelle eine oder mehrere Punktmutationen tragen. Mittels PCR unter Verwendung von Pfu-DNS-Polymerase und dNTPs wird die Punktmutation in das Ausgangsplasmid inseriert. Anschließend wird mittels des Restriktionsenzym DpnI die methylierte Original-DNS abgebaut, so dass nur die mutierte DNS übrig bleibt. Diese DNS wird dann in *E.coli* vom Stamm XL2-blue transformiert und entsprechend ihrer Resistenzeigenschaften ausgestrichen. Gewachsene Klone, werden letztlich sequenziert um den Erfolg der

Mutagenese zu prüfen. Die PCR und der anschließende DpnI Verdau erfolgen gemäß der Herstellerangabe (Roche).

4.1.3 Restriktionsverdau

DNS kann an spezifischen Sequenzen mittels entsprechender Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Dabei entstehen entweder stumpfe (blunt ends) oder überhängende (sticky ends) Enden. Für einen Verdau werden 1 µg DNS im FastDigest® Puffer mit 1 Unit Enzym für 5-60 min (abhängig vom Enzym) bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgt entsprechend der Herstellerangabe bei 65°C-80°C für 5 min.

4.1.4 Dephosphorylierung von geschnittener DNS

Damit sich ein geschnittener Vektor nicht ohne die gewünschte Insert-DNS religiert, muss die Vektor-DNS dephosphoryliert werden. Hierfür wird FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase verwendet, welche die freie 5´-Phosphatgruppe entfernt. Diese Phosphatase kann sowohl stumpfe, als auch überhängende Enden dephosphorylieren. Entweder kann die Reaktion direkt nach oder auch zusammen mit dem Restriktionsverdau (4.1.3) erfolgen. Hierfür werden 1 µg DNS mit 1 Unit Phosphatase für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt bei 65°C für 15 min.

4.1.5 Auffüllen von 5´-überhängenden Enden

Für blunt end Ligationen können 5´-überhängende DNS-Enden, die bei einem Restriktionsverdau entstehen, durch das Enzym DNS-Polymerase I Large Fragment (Klenow) aufgefüllt werden. Hierzu wird der Restriktionsansatz (20 µl, bis 4 µg DNS) mit 50 µM dNTP, 2 µl Klenow-Puffer und 1-5 Units Klenow bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wird anschließend bei 75°C für 10 min gestoppt.

4.1.6 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Linearisierte DNS-Fragmente werden mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wandern DNS Moleküle wegen ihrer negativen Ladung im Phosphatrückgrat im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei wegen des Widerstandes der Agarose Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge.

Es werden 0,8%ige Agarosegele (0,8 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE) mit 1 x TAE als Laufpuffer verwendet, die bei einer konstanten Spannung von 100 V für ca. 1 Stunde laufen. Die aufzutrennende DNS wird zuvor mit 1/5 Volumen 5 x DNS Probenpuffer gemischt. Zum Größenvergleich wird der DNS Längenmarker Smart Ladder (Clontech) genutzt. Die Detektion der DNS-Banden erfolgt in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,4%), in welcher das Gel für ca. 30 min inkubiert wird. Das Ergebnis wird mit Hilfe einer UV-Fotoeinheit ausgewertet. Für weitere Klonierungen werden die gewünschten DNS-Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (Kapitel 4.1.7).

4.1.7 Extraktion von DNS aus Agarosegelen

Die DNS wird mit dem Ultra Clean™ 15 DNS Purification Kit (Mo Bio Laboratories) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegelstück isoliert. Dabei bindet die Glasmilch (Silikate) in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen spezifisch DNS. Diese kann nach dem Waschen durch Verwendung von Lösungen mit niedrigerem Salzgehalt (z. B. 1 x TE) wieder eluiert werden.

4.1.8 Ligation

DNS Ligasen sind Enzyme, die freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNS durch die Katalyse einer Phosphodiesterbindung verknüpfen. Die Ligation von DNS Fragmenten wird mit der T4 Ligase von Fermentas, welche sowohl überhängende Enden als auch stumpfe Enden ligieren kann, durchgeführt. Restringierter Vektor und Insert werden im Verhältnis 1:4 ad 15 µl Aqua bidest. sowie 4 µl Fermentas Rapid Ligase-Puffer 1 Unit T4-DNS-Ligase gemischt. Die Reaktion erfolgt bei Ligation von überhängenden Enden für 10 min, bei stumpfen Enden für 1 h bei Raumtemperatur.

Anschließend werden kompetente *E. coli* (DH5α) mit dem gesamten Ansatz transformiert (4.1.9).

4.1.9 Transformation kompetenter *E.coli*

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Plasmid-DNS durch kompetente Bakterien. Dies ist entweder durch Hitze-Einwirkung oder durch Elektroporation möglich. Im Folgenden wird nur auf die Transformation durch den Hitzeschock eingegangen, da in den beschriebenen Versuchen nur dieser verwendet wurde.

Für die Hitzetransformation werden die chemisch kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wird der Ligationsansatz oder die Plasmid-DNS hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Die Inkubation erfolgt auf Eis für 30 min. Beim anschließenden Hitzeschock wird der Ansatz je nach Bakterienzelltyp für 30-45 Sekunden auf 42°C erwärmt, um die Aufnahme der Plasmid-DNS durch die Bakterien zu ermöglichen. Danach folgt eine Abkühlung der Zellen für 2 min auf Eis, bevor 500 µl antibiotikafreies SOC-Medium zugefügt und die Transformationsansätze für eine Stunde bei 37°C geschüttelt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Ansätze auf LB_{Amp/Kana}-Agar-Platten ausplattiert, so dass nur Bakterien, die ein intaktes Plasmid aufgenommen haben, wachsen können. Die nach ca. 12 Stunden auf der Platte sichtbaren Kolonien werden zum Animpfen von Übernachtskulturen und anschließender Plasmidpräparation genutzt.

4.1.10 Isolation von Plasmiden aus *E.coli* (Mini- und Midimaßstab)

Für die Plasmid-Minipräparation wird das Invisorb Spin Plasmid Mini Kit (Invitex) und die Durchführung erfolgt nach dem Herstellerprotokoll. Übernachtskulturen von Einzelkolonien werden in LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Davon werden anschließend 2 ml für die Präparation eingesetzt. Die DNS-Aufreinigung erfolgt hierbei nach dem Prinzip eines Anionentauschers und wird beispielsweise angewendet, wenn Klonierungsschritte durch z.B. anschließenden Restriktionsverdau überprüft werden sollen.

Das gleiche Prinzip gilt auch für die Plasmidisolation im Midi-Maßstab, mit welcher man größere Mengen eines z.B. neu klonierten DNS-Konstruktes herstellen kann. Verwendet wird hierfür das Nucleobond Midi EF Kit der Firma Macherey-Nagel und 50-200 ml *E. coli* Übernachtskulturen. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

4.1.11 Konzentrationsbestimmung der DNS

Durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm können Reinheit und Konzentration von DNS bestimmt werden. Dabei erlaubt der Quotient OD_{260}/OD_{280} eine Aussage über die Reinheit der DNS. Ein Wert von 1,8 zeigt einen guten Reinheitsgrad an. Die Konzentrationsbestimmung (C in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) erfolgt nach folgender Formel und kann am Gerät abgelesen werden:

$$C = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4.1.12 Sequenzierung

Die automatische Sequenzanalyse basiert auf einer DNS-Kettenverlängerungsreaktion nach der Didesoxy-Methode nach F. Sanger und wird freundlicherweise durch die Firma SeqLab Göttingen durchgeführt. Hierfür werden Proben vorbereitet, welche in einem Volumen von 7 μl 0,6 μg DNS enthalten, sowie 10 pmol des gewünschten Sequenzierungsprimers.

4.1.13 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Von als korrekt befundenen Klonen werden Glycerindauerkulturen angefertigt. Dafür werden 10 ml Übernacht-Bakterienkulturen (37°C in LB-Medium) pelletiert (10 min, 3500 rpm, RT) und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Diese Suspension wird mit 0,8 ml Glycerin gründlich gemischt und sofort bei -80°C eingefroren.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

4.2.1.1 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Zur Erzeugung großer Mengen eines bestimmten Proteins werden häufig bakterielle Expressionssysteme verwendet. Das am meisten genutzte Bakterium *E. coli* bietet durch seine unkomplizierte Kultivierung und durch die mögliche Verwendung stark induzierbarer Promotoren eine einfache Möglichkeit der Überexpression rekombinanter Proteine. Sämtliche Überexpressionsexperimente wurden mit dem *E.coli*-Stamm BL21 (DE3)pLysS durchgeführt. Dieser Stamm enthält ein Gen für die T7-Polymerase unter

Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das Plasmid pLys enthält zusätzlich ein konstitutiv schwach exprimiertes Gen für T7 Lysozym, welches die Hintergrundexpression durch Inhibition der T7-Polymerase verringert. Durch Zugabe des Galactosids IPTG zum Medium wird die Expression der T7-Polymerase durch den lacUV5-Promotor induziert, die anschließend die Inserts der pGEX-Vektoren in Abhängigkeit des T7-Promotors transkribiert. Der pGEX-Vektor, in welchen die cDNS des gewünschten Proteins kloniert ist, besitzt den bakteriellen tac Promotor. Im uninduzierten Zustand bindet ein spezifischer Repressor an den Operator des Promotors und blockiert die Expression des rekombinanten Proteins. Die Induktion dieses Systems kann durch verschiedene Galaktoside, unter anderem IPTG erfolgen. Durch die Zugabe von IPTG wird somit sowohl die Expression der T7-Polymerase, als auch die Expression des rekombinanten Proteins induziert.

Für die Induktion wird zuerst eine Vorkultur aus einer einzelnen Kolonie nach der Transformation angesetzt (6 h, 37°C). Ausgehend von dieser Vorkultur (5 ml) wird eine Übernacht-Kultur (50 ml LB-Medium) bei 37°C geschüttelt. Von dieser Übernacht-Kultur werden anschließend 3,75 ml in 500 ml frisches LB-Medium gegeben und wiederum bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Eine Bakterienpopulation mit einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 befindet sich in ihrer logarithmischen Wachstumsphase und ist für die Induktion rekombinanter Proteine besonders gut geeignet. Die Expression wird nun durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und das gewünschte Protein durch Schütteln für ca. 2 h bei 37°C exprimiert. Zur Kontrolle wird jeweils ein entsprechendes Aliquot uninduzierter Bakterienkultur vor der Induktion und eines nach der Proteinexpression vom Ansatz entnommen. Durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 15 min) werden die Bakterien geerntet und das erhaltene Bakterienpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.1.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E.coli*

Durch die Proteinexpression mittels eines pGEX-Vektors erhält man ein rekombinantes GST-Fusionsprotein. Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgt somit nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie an Gluthathione-SepharoseTM 4B-Beads. Bei der Affinitätschromatographie beruht die Trennung auf einer spezifischen reversiblen Wechselwirkung zwischen dem Protein/Peptid und seinem an eine Matrix gebundenen Bindungspartner.

Vor der Reinigung werden die Bakterienzellen aufgeschlossen, indem das *E. coli*-Pellet in 30 ml Lysepuffer (PBS mit 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/µl Pepstatin, 1 µl/ml Leupeptin, 1% Triton X-100, 1 % Proteaseinhibitor Cocktail) resuspendiert und anschließend in der French Press hohem Druck ausgesetzt wird. Die löslichen Proteine können dann von Zelltrümmern durch Zentrifugation (2 x 30 min, 4°C, 14.000 rpm) abgetrennt werden.

Die Reinigung erfolgt im ersten Schritt im Batch-Verfahren durch die Zugabe von 1 ml 50% Gluthathione Sepharose™ 4B-Beads und Inkubation für 3 h bei 4°C. Anschließend wird die Suspension in eine Säule über einen Filter gegeben und so die Beads von der Suspension abgetrennt. Nach Waschen mit 3 x 10 ml PBS (mit 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/µl Pepstatin, 1 µl/ml Leupeptin) wird das GST-markierte Protein mit einem Glutathion-haltigen Puffer eluiert. Es erfolgten zwei Elutionsschritte zu je 500 µl (20 mM reduziertes Glutathion, 200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5% Glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/µl Pepstatin, 1 µl/ml Leupeptin, 0,1 % Triton X-100, 1% Proteaseinhibitor Cocktail). Vor der Lagerung der Proteine werden diese über Nacht bei 4°C gegen einen Glycerol-haltigen Dialysepuffer (50% Glycerol, 200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 1 mM PMSF) dialysiert. Eine Kontrolle der Aufreinigung erfolgt mittels SDS-PAGE (4.2.3) und Western Blot (4.2.4).

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung aufgereinigter rekombinanter Proteine erfolgt über die SDS-PAGE (4.2.3) und anschließender Coomassie-Färbung. Dabei werden ein definiertes Volumen des Proteindialysates sowie zum Vergleich BSA-Proben mit bekanntem Proteingehalt aufgetragen. Die Auswertung der Coomassiefärbung und somit die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Trocknen des SDS-Gels erfolgt mittels der AIDA-Software.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration aus Zelllysaten wurde das BCA Reagenz der Firma Sigma (BCA Protein Kit) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür werden die Proteinproben mit SDS-haltigem 2 bzw. 5 x Protein-Probenpuffer gemischt und für 5 min aufgekocht. Durch die Behandlung der Proteine mit SDS erhalten diese ein ungefähr gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis und weisen eine ähnliche Form auf, so dass sie im SDS Gel allein nach ihrer molaren Masse

aufgetrennt werden können.

Die Auftrennung erfolgt in 10%igen Acrylamidgelen zunächst bei 150 mV für 15 Minuten und anschließend bei 180 mV für eine Stunde. Als Größenvergleich in Coomassie gefärbten Gelen dient der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas und für Western Blots der Marker MagicMark von Invitrogen.

Die aufgetrennten Proteine können durch Anfärben des Gels in einem Coomassie-Blau Färbebad (1 h; schütteln) und anschließendes Entfärben (20 min, Intensiv-Entfärber, 2 h Normal-Entfärber) analysiert werden.

4.2.4 Western Blot

Zur Analyse von Proteinen mittels Antikörpern werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nach der Semi-Dry-Western Blot Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert. Vor dem Transfer der Proteine müssen hierzu das Trenngel, Membran und Filterpapiere wie folgt äquilibriert werden:

Trenngel: 1 x Blottingpuffer 15 min

Membran: 100 % Methanol 10 sek, danach 1 x Blottingpuffer 15 min

8-10 dicke Filterpapiere: 1 x Blottingpuffer 15 min

Das Blotten wird mit $1,1 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h 30 min durchgeführt.

Der spezifische Nachweis einzelner Proteine kann mittels eines spezifischen Antikörpers gegen den fusionierten Tag oder gegen das Protein erbracht werden. Hierzu wird die Membran in 5 % (w/v) entfetteter Milch (in TBS-T) für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt dann entweder für 1 h bei 37°C oder bei 4°C über Nacht. Überschüssiger Antikörper wird danach durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Der verwendete sekundäre Antikörper erkennt die konstante Region des primären Antikörpers und bindet dort. Er ist mit einem Enzym, der Meerrettich Peroxidase gekoppelt und wird für 1 h bei 37°C inkubiert. Auch nach diesem Schritt wird überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (Bestandteil des Substrates). Diese Reaktion verläuft unter Aussendung von Chemilumineszenzsignalen welche mit dem ECL plus Western-Blot Detection System (Amersham Bioscience) mit Hilfe einer Fotoeinheit detektiert werden.

4.2.5 Koimmunopräzipitation

Zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Proteine wird häufig die Methode der Koimmunopräzipitation angewandt. In der vorliegenden Arbeit werden für die Koimmunopräzipitation einerseits aufgereinigte Proteine verwendet, welche in RIPA-Puffer (Kapitel 3.9) verdünnt werden. Andererseits werden endogene Proteine aus Ratten-Cortex isoliert. Dafür wird der Cortex einer adulten Ratte frisch präpariert, auf Eis gekühlt, sofort homogenisiert und mit Lysispuffer versetzt (50 mM TRIS HCl pH 7,4, 20 mM NaF, 1 mM Na-EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM DTT, 20% Glycerol, 2% NP40 (v/v), 5 mM CHAPS, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 1% Protease Inhibitor). Nach 3 h Inkubation werden die Zelltrümmer abzentrifugiert und das Lysat für die KOIP verwendet. In beiden Fällen werden 300 µl Lysat über Nacht bei 4°C mit 50 µl Protein G plus Agarose (Santa Cruz), welche zuvor gewaschen und für 1 h mit einem proteinspezifischen Antikörper inkubiert wurden, geschwenkt. Der gebildete Agarose-Antikörper-Protein-Komplex wird anschließend sedimentiert (3000 rpm, 4°C, 5 min) und dreimal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wird in 2 x Protein Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C aufgekocht. Die Auswertung erfolgt mittels Western Blot (4.2.4).

4.2.6 Kinase-Assay

Mit *in vitro* Kinase-Assays lässt sich zeigen, ob die Interaktion zweier Proteine phosphorylierungsabhängig ist. Verwendet werden Proteinkinasen und Proteine, welche rekombinant in *E.coli* exprimiert (Kapitel 4.2.1.1) und aufgereinigt wurden (Kapitel 4.2.1.2). Der Reaktionsansatz (10 µl, davon maximal 1 µl Kinasen) setzt sich zusammen aus 150 µM kaltem ATP, 5 µCi γ-[³²P] radioaktiv markiertem ATP (Amersham Bioscience) und dem jeweiligen Substrat in 1 x Kinase-Puffer. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 30°C und wird durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) gestoppt (30 min auf Eis). In der vorliegenden Arbeit wird die Phosphorylierung einerseits von PINK1 bzw. deren Mutanten durch MARK2 und andererseits die mögliche Phosphorylierung von COX5B durch MARK2 und/oder PINK1 untersucht. In beiden Fällen werden die durch TCA ausgefällten Proteine durch Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, bei RT) sedimentiert. Der Überstand kann verworfen werden. Das Proteinpellet wird anschließend in 5 µl Protein Probenpuffer resuspendiert und aufgekocht. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in 10 %igen SDS Gelen. Die Proteine werden dann mit Roti®-Blue (Roth) nach dem

Herstellerprotokoll angefärbt und das Gel anschließend getrocknet. Zur Auswertung wird eine entladene Phosphoimagerplatte für 1 h auf das Gel gelegt und anschließend in einem Phosphoimager (Fuji, BASImager) ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit der AIDA Software der Firma Raytest.

4.2.7 Bestimmung der PINK1- und COX5B-Phosphorylierungsstellen

Die Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in Proteinen umfasst mehrere Arbeitsschritte. Zunächst muss das Protein phosphoryliert und in Peptide gespalten werden. Aus dem entstehenden Peptidgemisch wird dann eine sogenannte Phosphopeptidkarte erstellt, welche dazu dient das Peptidgemisch einerseits aufzutrennen, wobei anschließend die phosphorylierten Peptide in „Spots“ detektiert werden. Diese Spots können isoliert und die darin enthaltenen Peptide eluiert werden. Schließlich werden die Peptid-Eluate mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert.

4.2.7.1 Präparation von *in vitro* phosphorylierten Peptiden

Für die Phosphorylierung der Proteine Δ N-PINK1 und COX5B durch MARK2^{T208E} werden die Substrat- und Kinaseproteine im Verhältnis 7:1 eingesetzt, wobei 20 μ g Substratprotein verwendet werden. Im Falle der Phosphorylierung von COX5B durch MARK2^{T208E} mit vorheriger Δ N-PINK1-Inkubation werden sowohl MARK2^{T208E} als auch Δ N-PINK1 als Kinasen benutzt. Die Phosphorylierung erfolgt im Kinase-Puffer, welcher 200 μ M [³²P] ATP (1,85 x 10⁷ MBq/mol) enthält. Für die direkte Phosphorylierung von Δ N-PINK1 und COX5B durch MARK2^{T208E} werden die Ansätze für 3 h bei 30°C inkubiert. Für die Phosphorylierung von COX5B, nach Δ N-PINK1-Behandlung, wird COX5B zunächst für 1 h bei 30°C im oben genannten Kinase-Puffer mit Δ N-PINK1 inkubiert, bevor MARK2^{T208E} zugefügt wird.

Nach der Phosphorylierung werden die Proteine durch Zugabe von TCA (zu einer Endkonzentration von 10%) gefällt und in eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend werden die Proteine, um spätere Disulfid- und Wasserstoffbrücken in den Peptiden zu verhindern, reduziert und alkyliert. Dafür wird das Proteinpellet zunächst in einem reduzierenden Puffer (0,4 M Tris-HCl, pH=8,0; 2,6 mM DTT; 2% SDS; 10% Glycerol; 0,01% NaN₃; 0,001% Bromphenolblau; 0,003% EDTA)

resuspendiert, anschließend für 3 min bei 95°C aufgekocht und nach Abkühlen auf Raumtemperatur nochmals mit 1/10 Volumen einer 26 mM DTT-Lösung versetzt. Die Alkylierung erfolgt dann durch die Zugabe von 1/10 Volumen einer 20% (w/v) Iodacetamid Lösung und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min.

Die Proteine werden danach durch SDS-Gelelektrophorese (4.2.3) aufgetrennt und mittels colloidalem Coomassie-Blau (Roti[®]-Blue (Roth)) gefärbt. Die Substratproteinbanden (d.h. Δ N-PINK1 oder COX5B) werden ausgeschnitten und durch Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur in 50 mM Ammonium Bicarbonat in 50% Acetonitril entfärbt. Die vollständige Entfärbung erfolgt für weitere 30 min in 10 mM Ammonium Bicarbonat in 50% Acetonitril. Anschließend wird das Gelstück in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 25 μ l Puffer für Peptidverdau (10 mM Ammonium Bicarbonat, pH=8,0; 1 mM CaCl₂), welcher 1 μ g α -Chymotrypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für den Verdau von Δ N-PINK1 oder 0,4 μ g Trypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für den Verdau von COX5B enthält, aufgenommen und für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Zusätzlicher Puffer wird zugefügt, so dass das Gelstück bedeckt ist und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Überstand befinden sich nach der Inkubationszeit die tryptischen Peptide. Sie werden in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Um auch die restlichen tryptischen Peptide aus dem Gelstück zu waschen, wird dieses dann nochmals für 1 h bei Raumtemperatur in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in 60% Acetonitril geschüttelt und der Überstand zum ersten Überstand gegeben. Letztlich werden die Peptide getrocknet und können bei -20°C gelagert werden.

4.2.7.2 Erstellung der Phosphopeptidkarte

Die nach 4.2.7.1 vorbereiteten Peptide können mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden, wobei man nach Detektion der Radioaktivität in einem Phosphoimager (Fuji, BASImager) eine Karte von Phosphopeptid-„Spots“ erhält.

Die Auftrennung der Peptide erfolgt nach einer von Boyle et al. (1991) etablierten Methode auf Dünnschicht-Cellulose-Platten (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Dabei wird die erste Dimension elektrophoretisch bei einer Spannung von 1700 V und einem pH-Wert von 1,9 in einem Gemisch aus Ameisensäure (88%ig), Essigsäure und Wasser (50:156:1794) für 25 min aufgetrennt. Alle Peptide erhalten bei diesem niedrigen pH-Wert eine positive Ladung und können so nach ihrer Größe aufgetrennt

werden. Anschließend wird die zweite Dimension als Dünnschicht-Chromatographie in einem Gemisch aus Butanol, Pyridine, Essigsäure und Wasser (150:100:30:120; pH=3,5) durchgeführt. Nach Trocknung der Cellulose-Platte wird zur Auswertung der Phosphopeptid-„Spots“ eine entladene Phosphoimagerplatte für 24 h auf das Gel gelegt und anschließend im Phosphoimager (Fuji, BASImager) ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit der AIDA Software der Firma Raytest.

4.2.7.3 Massenspektrometrie

Aus den in 4.2.7.2 erhaltenen Phosphopeptid-„Spots“ können die Phosphopeptide eluiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden.

Dazu wird an den entsprechenden Stellen der Dünnschicht-Cellulose-Platte die Cellulose abgekratzt und in ein Eppendorf Gefäß aufgenommen. Die Elution erfolgt in 50 µl 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in 60% Acetonitril durch Schütteln bei Raumtemperatur für 1 h. Der Überstand enthält die Peptide und wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Der Elutionsschritt wird wiederholt. Die gesammelten Überstände werden anschließend getrocknet.

Die massenspektrometrische Analyse durch MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Ionisation und Flugzeitbestimmung) erfolgt im „Voyager-DE STR time of flight instrument“, welches mit einem Nitrogen-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm ausgestattet ist. Dafür werden die getrockneten Peptide in einer UV-absorbierenden Matrix (10 mg/ml α -cyan-4-Hydroxy-Zimtsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 0,05% TFA in 50% Acetonitril) aufgenommen und auf die Messplatte aufgetragen. Durch anschließende Trocknung (an der Luft) kristallisieren die Peptide an der Matrix und können analysiert werden.

Alle Massenspektren werden anhand von Standardpeptiden, wie Angiotensin, Neurotensin und ACTH-Fragmenten (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) kalibriert und werden mittels Data Explore TM Software analysiert. Der Abgleich der massenspektrometrisch erhaltenen Peptidmassen erfolgte mit virtuell (unter <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>) ermittelten Peptidmassen. Für die Vorhersage der Peptidmassen wurden dabei die Parameter, erlaubter fehlender Verdau = 3, mögliche Modifikationen = Phosphorylierung von Serin und Threonin und konstante Modifikationen = Methylierung des C-Terminus angegeben. Im Fall von Δ N-PINK1 wurde als verwendetes Enzym, Chymotrypsin und im Fall von COX5B, Trypsin angegeben.

4.2.8 Mitochondrienisolation und Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitätsassay

Für die Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität in Mitochondrien werden zunächst die Mitochondrien aus lebenden, transfizierten Zellen isoliert. Verwendet werden CHO-htau40-Zellen, da diese leicht zu kultivieren sind und mit der konstitutiv aktiven MARK2^{T208E} transfiziert werden können. Die Kultivierung erfolgt in 10 cm Petrischalen unter Kultivierungsbedingungen (4.4.1) bis zu einer Konfluenz von ca. 80%. Dann werden die Zellen mit COX5B, ΔN-PINK1 und MARK2^{T208E} bzw. einer Kombination dieser durch Lipofektion (4.4.2.1) für 24 h transfiziert. Anschließend werden die Zellen vorsichtig im Kulturmedium abgeschabt und bei 3500 rpm, 4°C für 10 min abzentrifugiert. Ein Aliquot von 1 ml wird jeweils für einen Protein-Expressionstest abgenommen. Nur Messwerte von Proben, welche die gewünschten Proteine exprimieren werden für die weiteren Messungen verwendet.

Das Medium der geernteten Zellen wird abgenommen und aus dem Zellpellet werden mittels des Mitochondria Isolation Kit (MITOISO2, Sigma) in aufeinanderfolgenden Extraktions- und Zentrifugationsschritten die Mitochondrien nach Herstellerangaben isoliert und anschließend in 150 µl 1x Storage-Puffer aufgenommen. 50 µl davon werden für eine anschließende Proteinbestimmung (4.2.2; BCA-Bestimmung) abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl CellLytic M Cell Lysis Reagent (mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Jedes Ergebnis des Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitätsassays wird auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen.

Die 100 µl Mitochondrien werden für die Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität verwendet. Diese Aktivitätsbestimmung erfolgt spektrometrisch und basiert auf der oxidativen Umsetzung von Ferrocyclochrom c zu Ferricytochrom c, wobei eine Abnahme der Absorption bei 550 nm gemessen wird. Anhand der Messwerte nach einer Minute lässt sich die Enzymaktivität in Units/ml nach folgender Formel berechnen:

Aktivität [Units/ml]:

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times \text{dil.} \times 1,1}{(\text{vol Enzym}) \times 21,84}$$

| | |
|-----------|---|
| ΔA/min | $A/\text{min}_{(\text{Probe})} - A/\text{min}_{(\text{Leerwert})}$ |
| dil | Verdünnung der Probe |
| 1,1 | Reaktionsvolumen |
| vol Enzym | Probenvolumen pro Reaktionsansatz |
| 21,81 | $\Delta\epsilon^{\text{nm}}$ zwischen Ferrocyclochrom c and Ferricytochrom c bei 550 nm |
| 1 Unit | Oxidiert 1 µM Ferrocyclochrom c pro Minute bei pH=7 und 25°C |

Vor der Messung wird Cytochrom C durch Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zu Ferrocycyochrom reduziert. Sobald dieses zu den Mitochondrien gegeben wird, beginnt die oxidative Umsetzung zu Ferricytochrom. Da während der Mitochondrienisolation auch Mitochondrien beschädigt werden können, welche kein intaktes Membranpotential aufweisen, können zu hohe Ergebnisse für die Enzymaktivität die Folge sein. Um ein Maß für die Beschädigung der Mitochondrien zu erhalten, werden daher immer zwei Ansätze der gleichen Mitochondrienfraktion gemessen. Dabei wird im Kontroll-Ansatz künstlich über n-Dodezyl-β-D-Maltosidose die Membranpermeabilität gestört. Über die Ergebnisse der beiden Ansätze, lässt sich der Anteil der beschädigten bzw. intakten Mitochondrien berechnen.

$$\text{Anteil Mitochondrien mit intakter Membran: } \% = \frac{(\Delta A_{(\text{total})} - \Delta A_{(\text{intakt})})}{\Delta A_{(\text{total})}} \times 100$$

Entsprechend werden die erhaltenen Ergebnisse für die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität immer dem Anteil der intakten Mitochondrien angepasst.

4.3 Hefe-2-H-Methoden

Das Hefe-2-H-System wurde erstmals von Fields und Song (1989) beschrieben. Es dient sowohl der Interaktionsuntersuchung bekannter Proteine, als auch der Identifizierung von Domänen und Aminosäuren, die für eine Interaktion benötigt werden, sowie der Durchmusterung von Bibliotheken, um neue Bindungspartner bekannter Proteine zu isolieren. Inzwischen wurden mehrere Hefesysteme entwickelt, welche sich die zweigeteilte Domänenstruktur von Transkriptionsregulatoren zunutze machen. Dem für diese Arbeit verwendeten MATCHMAKER Zwei-Hybrid System 3 (Clontech) liegt die Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors zu Grunde, der die Expression dreier Reportergene (Histidin, Adenin, lacZ/MEL1) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aktiviert. Dabei wird die DNS bindende N-terminale Domäne (DB) mit einem Köder-Protein und die C-terminale Domäne (AD), welche für die Aktivierung Gal4-Transkriptionsfaktors notwendig ist, mit einem Beute-Protein fusioniert. Nur im Fall einer Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein kommt es zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors und somit zur Expression der Reportergene. Alle Hefe-Interaktionsstudien dieser Arbeit werden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Reportergene dienen im verwendeten System (MATCHMAKER Two-Hybrid System3, Clontech) HIS3, ADE2 und lacZ. Eine

Interaktion kann somit einfach anhand des Wachstums der Hefen auf Selektionsplatten und ihrer Blaufärbung festgestellt werden.

4.3.1 Amplifikation von cDNS-Bibliotheken

Bei der im Hefe Zwei-Hybrid Screen verwendeten cDNS-Bibliothek handelt es sich um eine fötale menschliche Gehirn cDNS-Bank der Firma Clontech. Die cDNS ist in den Zwei-Hybrid Vector pACT2 (3.11) hinter die GAL4 Aktivierungsdomäne kloniert. Um genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, wird die cDNS-Bibliothek nach Vorschrift (MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System3 & Libraries User Manual, Clontech) in *E. coli* amplifiziert.

4.3.2 Hefetransformation und direkter 2-Hybrid-Test

Basis für die Interaktionstests ist der verwendete Hefestamm AH109 (3.10.2), welcher für die Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin auxotroph ist. Das „Köder-Protein“ wird in den pGBKT7-Vektor kloniert, welches für die DNS-Bindedomäne und den Selektionsmarker TRP1 (Tryptophan Biosynthese) kodiert. Das „Beute-Proteine“ wird mittels pGADT7-Vektor mit der Aktivierungsdomäne fusioniert. Dieses Plasmid trägt zusätzlich den Selektionsmarker Leu2 (Leucin Biosynthese). Wird der Hefestamm AH109 mit diesen Plasmiden transformiert, kann über die Wahl des Kulturmediums (Selektionsmedium) auf das Vorhandensein der Plasmide und auf die Interaktion von Köder- und Beute-Proteinen selektiert werden.

4.3.2.1 Transformation in *S.cerevisiae*

Hefen des Stammes AH109 werden als Übernachtskultur in 50 ml YEPD Medium bei 30°C im Schüttelinkubator (200 rpm) kultiviert. Pro Ansatz werden anschließend je 1,5 ml Hefesuspension in je ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 8500 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 50-100 µl abgenommen, die Zellen werden dann im restlichen Medium resuspendiert. Anschließend werden 2 µl Carrier DNS (Heringssperma-DNS: 10mg/ml, Sigma) und 1 µg Plasmid-DNS zugegeben und gut gevortext. Nach der Zugabe von 500 µl Plate-Mixture und 20 µl 1 M DTT wird erneut gut gevortext. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt über Nacht bei RT. Die Aufnahme

der DNS erfolgt durch einen 10 minütigen Hitzeschock bei 42°C wonach die Zellen, die sich an der Wand des Eppendorf-Gefäßes abgesetzt haben, auf Selektionsplatten -Leu/-Trp ausgestrichen werden. Anschließend werden die Selektionsplatten für mindestens drei Tage bei 30°C inkubiert.

4.3.2.2 Direkter Hefe-2-H-Test

Für das Wachstum auf -Leu/-Trp-Selektionsplatten ist lediglich die Aufnahme der beiden Plasmide (pGBKT7 und pGADT7) erforderlich, so dass nach der in 4.3.2.1 beschriebenen Methode alle diejenigen Hefe-Klone wachsen, welche die Plasmide aufgenommen haben. Um die Interaktion zweier bekannter Proteine zu testen, werden mit Hilfe von sterilen Zahnstochern je drei Kolonien auf -Leu/-Trp/-His bzw. -Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten ausgestrichen und erneut drei Tage bei 30°C inkubiert. Nur nach erfolgreicher Transformation und bei stattfindender Wechselwirkung der beiden Proteine können die Hefen auf den Selektionsplatten wachsen. Um zusätzlich eine Aussage über die Stärke der Interaktion treffen zu können, werden die Selektionsplatten zusätzlich mit X-Gal bestrichen (100 µl, 2 mg/ml in DMF). Das gering induzierbare lacZ Reportergen kodiert für die α/β -Galactosidase. Dieses sekretorische Enzym wird von den Hefen mittels Exocytose an das Medium abgegeben und kann das Substrat X-Gal direkt zu einem blauen Substrat (5-Brom-4-chlorindigo) umsetzen. Somit kann bei einer starken Wechselwirkung neben dem Wachstum der Hefen auch eine Blaufärbung beobachtet werden.

4.3.3 Hefe-2-H cDNS-Bibliothek Screen

Die Methode des 2-Hybrid Systems eignet sich neben der Analyse von Wechselwirkungen zweier bekannter Proteine auch zur Identifikation neuer, unbekannter Bindungspartner. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, neue Interaktionspartner der Kinase PINK1 zu finden. Hierzu wird der Abschnitt AS: 156-581 von PINK1 in den „Ködervektor“ pGBKT7, welcher für die DNS-Bindungsdomäne kodiert, kloniert. Durchmustert wird eine fötale menschliche Gehirn cDNS Bank (Clontech), die im „Beutevektor“ pACT2 mit der Aktivierungsdomäne fusioniert. Nur wenn Köder- und Beute-Protein aneinander binden, kommt es zur Rekonstruktion eines funktionsfähigen GAL4 Aktivators. Somit wird die Expression der Reportergene (HIS3, ADE2 und lacZ) angeschaltet und die Hefen sind in der Lage auf den Selektionsplatten zu wachsen.

4.3.3.1 Transformation von *S.cerevisiae* für den 2-Hybrid cDNS-Bank-Screen

4-5 Kolonien des Hefestammes AH109 einer YEPD-Platte werden in 100 ml YEPD (in 500 ml Flasche) resuspendiert und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am folgenden Tag wird diese Vorkultur auf eine $OD_{600}=0,2$ verdünnt (auf ein Volumen von ca. 1 l) und für weitere 3 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wird die 3 h-Kultur bei 3500 rpm und Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert und das Pellet durch Resuspendieren in sterilem Wasser und anschließender Zentrifugation gewaschen.

Zur Vorbereitung der Zellen auf die Transformation wird das Pellet dann in 200 ml LiSORB resuspendiert und für 30 min bei 30°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird die Herings-Spermien-DNS, welche als Hilfs-DNS bei der Transformation dient, vorbereitet. Dies erfolgt, indem 1,6 ml Herings-Spermien-DNS (20 mg/ml) für 10 min bei 100°C inkubiert wird, anschließend 2,4 ml LiSORB zugegeben werden und der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Die Hefezellen werden dann für 5 min bei 3500 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, in 1,2 ml LiSORB resuspendiert und mit der Herings-Spermien-DNS vermischt. Letztlich werden 21,6 ml der PEG/LiAc Lösung und 2,2 ml DMSO zugegeben und durch Pipettieren mit den Zellen vermischt. Die Hefezellen sind nun kompetent und werden direkt für die Transformation verwendet.

Für die Transformation werden zu 20 ml kompetenter Zellen jeweils 80 µg des pGBKT7-Köderplasmides (PINK1, AS 156-581) und 80 µg der pACT2 cDNS-Bibliothek gegeben, sowie 400 µl einer 1:10 verdünnten β-Mercaptoethanol-Lösung. Nach Durchmischen der Suspension wird der Ansatz in je 500 µl Aliquots geteilt und diese Transformationsansätze bei 30°C für 30 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Aufnahme der DNS erfolgt bei dem anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 20 min. Nach kurzem Abkühlen (ca. 3 min auf Eis) werden die Zellen bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 30 sek abzentrifugiert. Die Zellpellets werden in je 0,5 ml Sorbitol aufgenommen und anschließend auf 150 mm -Leu/-Trp/-His/+Ade-Selektionsplatten ausgestrichen.

Kolonien, die eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Köder- und dem Beute-Protein anzeigen, erscheinen nach 5-8 Tagen Inkubation bei 30°C. In einem zweiten Selektionsschritt werden 100 dieser Kolonien auf frischen Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade + X-Gal) ausgestrichen. Wachstum und Blaufärbung können nach dreitägiger Kultivierung bei 30°C ausgewertet werden.

4.3.3.2 Berechnung der Transformationseffizienz

Die Transformationseffizienz pro μg eingesetzter DNS wird bestimmt, indem 5 μl und 10 μl Aliquots der unter 4.3.3.1 erhaltenen transformierten Zellsuspension auf –Leu/-Trp Selektionsplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C kultiviert werden. Die Berechnung der Transformationseffizienz, die optimal im Bereich von 1×10^3 - 10^4 cfu/ μg DNS liegen sollte und der Anzahl der gescreenten Klone (optimal 1×10^6), erfolgt nach folgenden Formeln:

Transformationseffizienz:

$$\frac{\text{Anzahl der gewachsenen Hefekolonien} \times \text{Vol. des Gesamtansatzes (10 ml)}}{\text{Vol. der ausgestrichenen Zellsuspension (5/10 } \mu\text{l)} \times 500 \mu\text{g cDNS}}$$

Anzahl gescreenter Klone: Transformationseffizienz \times 500 μg cDNS-Bibliothek

4.3.3.3 Identifizierung positiver Beuteklone

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass „Beute-Proteine“ selbst in der Lage sind die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Somit können nach einem cDNS-Bank-Screen sogenannte falsch-positive Klone auftreten, die nicht über einen funktionellen Köder-Beute-Interaktionskomplex verfügen. Durch die folgenden Arbeitsschritte können solche Klone von den positiven Klonen getrennt werden. Hierzu wird zuerst eine Köder-Verlustkultur angelegt, aus der dann das Beuteplasmid isoliert werden kann. Im Anschluss wird eine Hefe-Retransformation mit dem isolierten Beuteplasmid zusammen mit dem Köderplasmid bzw. dem Köderleervektor durchgeführt. Falsch positive Klone wachsen auf den Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade + lac Z) nicht nur in Hefen, die das Köder-Protein exprimieren, sondern auch in denen, die nur den Köderleervektor enthalten.

4.3.3.3.1 Hefe Köder-Verlustkulturen

Die positiven Klone des cDNS-Bibliothek Screens werden zur weiteren Untersuchung in 5 ml –Leu Selektionsmedium für 2-3 Tage (30°C, 200 rpm) kultiviert. Anschließend werden die Hefezellen durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, RT) pelletiert und in 200 μl sterilem STET Puffer resuspendiert. Zum Zellaufschluss wird eine Spatelspitze Glassperlen (Sigma) zugefügt und für 5 min gevortext. Nach kurzem Aufkochen (3 min, 100°C) werden die Ansätze auf Eis gekühlt und Zelltrümmer durch Zentrifugation

(14000 rpm, 10 min, 4°C) abgetrennt. Zur Trennung der DNS von Proteinen werden 100 µl des Überstandes mit 100 µl Kaliumacetat (5 M) gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde erneut bei 14000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Aus dem Überstand kann dann mit Hilfe des Ultra Clean™ 15 DNS Purifikation Kit die Plasmid-DNS isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgt dabei nach Angaben des Herstellers. Das DNS Pellet wird letztlich in 10 µl H₂O gelöst.

4.3.3.3.2 *E.coli* Transformation mit Beuteplasmiden aus Hefen

Zur Amplifikation des isolierten Beuteplasmids (4.3.3.3.1) wird die gesamte DNS-Menge in 50 µl kompetente DH5α Zellen transformiert (4.1.9). Anschließend wird das Beuteplasmid im Minimaßstab (4.1.10) aufgereinigt.

4.3.3.3.3 Hefe-Retransformation mit Beuteplasmid aus *E.coli*

In zwei Ansätzen werden Hefen des Stammes AH109 mit dem in *E.coli* amplifizierten Beuteplasmid und entweder mit dem im Screen verwendeten Köderplasmid oder dem Köderleervektor kotransformiert. Das Wachstum der Hefen auf den Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade + X-Gal) lässt dann eine klare Bestimmung von falsch positiven und eindeutig positiven Klonen zu.

4.3.3.3.4 Sequenzierung positiver Klone

Die im Beuteplasmid enthaltene cDNS kann durch Sequenzierung (4.1.12) identifiziert werden. Hierzu wird der Plasmid spezifische Primer T7 verwendet. Die so erhaltenen Sequenzen werden mit Datenbanken, wie das BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – Programm unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, im Internet verglichen.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Kultivierung von verschiedenen Eukaryotischen Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien werden unter sterilen Bedingungen in der Laminarbox durchgeführt. Für die Kultivierung der Zellen werden Zellkulturflaschen und Begasungsbrutschränke, welche eine konstante Temperatur von 37°C, eine Luftfeuchte von 95% und eine mit 5% CO₂ angereicherte Atmosphäre gewährleisten, verwendet. Die in 3.10.4 genannten Zelllinien (CHO, CHO-htau40, HEK293, PC12) werden in den jeweils erforderlichen Medien (3.8.3) kultiviert. Die Passagierung dieser adhärent wachsenden Zelllinien wird bei 80%iger Konfluenz vorgenommen. Hierzu werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für einige Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit frischem Medium vom Boden der Kulturflasche gespült, je nach Zellart 1:5 – 1:20 gesplittet und in eine neue Kulturflasche überführt.

4.4.1.1 Präparation und Kultivierung von primären Ratten Cortex-Zellen

Alle Arbeiten zur Präparation und Kultivierung der primären Cortex-Zellen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Primäre Cortex-Zellen werden aus Rattenembryonen im Alter E18 präpariert. Dafür werden die Rattenembryonen aus dem Uterus des zuvor betäubten und getöteten Muttertieres entnommen. Das Genick wird sofort durchtrennt und das vollständige Gehirn nach Öffnen der Schädeldecke in eiskaltes Hanks BSS Medium (PAA Laboratories) gegeben. Anschließend werden der Colliculus superior und der Thalamus entfernt, sowie die Hirnhälften voneinander getrennt. Letztlich werden die Hirnhäute der Hirnhälften entfernt, damit die Zellen der Hirnhaut in der Zellkultur nicht die Neurone überwachsen.

Um die Cortex-Zellen voneinander zu trennen, wird der Cortex in vorgewärmtem Trypsin für 6 min bei 37°C inkubiert, danach wird die Reaktion durch Zugabe von vorgewärmtem Neuronen Plating-Medium (3.8.3) gestoppt, das Medium abgenommen und die Zellen in vorgewärmtem Hanks BSS resuspendiert.

Die Aussaat der Zellen, nach Bestimmung der Zellzahl, erfolgt in bereits vorbereitete Zellkulturschalen. Je nach Anwendung können die Zellkulturschalen Deckgläschen enthalten. Damit sich die Zellen anheften können, ist eine Beschichtung der Zellkulturschalen mit Poly-D-Lysin (Sigma, 50 µg/ml) für 4 h erforderlich. Anschließend wird das Poly-D-Lysin entfernt, die Zellkulturschalen 3x mit PBS (PAA Laboratories) gewaschen und das Neuronen Plating-Medium vorgelegt.

Die Zellen werden in einer Dichte von ca. $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und anschließend für mindestens 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wird das Medium gegen frisches Neuronen-Wachstumsmedium (3.8.3) ausgetauscht und die Zellen für 4 d bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Damit die im Cortex enthaltenden Glia-Zellen die Neurone nicht überwachsen, wird nun der Mitosehemmstoff AraC (Sigma) hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ können die Zellen für z.B. Immunfluoreszenzbeobachtungen verwendet werden. Die beschriebene Präparation wurde für die vorliegende Arbeit in den meisten Fällen freundlicherweise von Annika Eikhof durchgeführt.

4.4.1.2 Präparation und Kultivierung von retinalen Ganglien-Zellen aus Hühner-Embryonen

Retinale Ganglienzellen werden ausschließlich für die Lebendbeobachtung verwendet, da sie keinerlei Medienwechsel vertragen. In dieser Arbeit werden sie zur Beobachtung der Mitochondrienbewegung genutzt. Die verwendeten Zellkulturschalen müssen, damit sich die Zellen anheften können, zuvor mit Laminin (Sigma) in einer Konzentration von 2 µg/ml beschichtet werden. Die Beschichtung erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ für 2 h, anschließend werden die Schalen 1x mit PBS oder Hanks BSS (PAA Laboratories) gewaschen.

Hühnerembryonen werden im Alter E6 unter sterilen Bedingungen präpariert, wofür die Hühnereier (Lohmann Tierzucht GmbH) zunächst für 7 d bei 37°C inkubiert werden. Das Hühnerei wird dann mit Ethanol abgerieben, die Eischale und das Amnion ein wenig geöffnet, und sofort das Genick des Embryos durchtrennt. Der Kopf wird in Hanks BSS Medium zwischen den Augen geteilt, anschließend das Auge rund um die Iris aufgeschnitten und die Linse zusammen mit dem Glaskörper entfernt. Die Retina kann dann von der Pigmentschicht abgetrennt und an der Fissur abgeschnitten werden. Die der Pigmentschicht zugewandte Seite der Retina bildet die Axone aus, so dass diese Schicht auf die in Hanks-Medium eingeweichte Nitrocellulose-Membran (Sartorius stedim biotech) aufgebracht werden muss. Die Retina wird durch leichtes Andrücken der Ränder, sowie durch Ansaugen auf sterilem Filterpapier auf der Nitrocellulose-Membran fixiert und anschließend in 400 µm dicke Streifen geschnitten (McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory engineering, Co, UK)) Je ein Streifen wird pro Zellkulturschale mit der Retina nach unten in die Zellkulturschale gelegt und mit kleinen sterilen Muttern an den Enden beschwert. Je Schale werden 2-3 ml Retina-

Medium (3.8.3) hinzugegeben. Seitlich zu den aufgebrauchten Retina-Streifen wachsen die Axone nach 1 d Inkubation bei 37°C aus.

Bevor die Retina adenoviral infiziert werden kann, müssen die Muttern entfernt und der Nitrocellulosestreifen vorsichtig längs abgezogen werden.

4.4.2 Transfektion von Säugerzellen und retinalen Ganglienzellen

Die Aufnahme von Expressionsplasmiden in Säugerzellen wird als Transfektion bezeichnet. Zellkulturlinien können sehr effektiv mittels Lipofektion transfiziert werden. Für die primären Cortex-Zellen und die primären retinalen Ganglienzellen eignet sich hingegen vor allem die Infektion mittels Adenoviren, da für diese die Verwendung toxischer Zusätze und reduzierter Medien nicht erforderlich ist.

4.4.2.1 Lipofectamin™-Transfektion

Lipofectamin™2000 der Firma Invitrogen wird auf Grund seiner hohen Effizienz zur Transfektion der CHO, CHO-htau40 und PC12 Zellen eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine so genannte Liposomen-vermittelte Transfektion. Das Reagenz besteht aus einem Lipidgemisch, das Vesikel bildet, die die zugefügte Plasmid-DNS aufnehmen kann. Der gebildete DNS Lipid-Komplex kann an der Zellmembran anhaften und die Plasmid-DNS in die eukaryontische Zelle abgeben. Für Immunfluoreszenz-Experimente werden bei CHO-Zellen $1,2 \times 10^4$, bei PC12-Zellen $3,5 \times 10^4$ Zellen je Kammer einer 24-Loch-Zellkulturplatte auf einem Deckglas für 24 h kultiviert. Die Transfektion wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt gefolgt von einem Mediumwechsel nach 4 h. Dabei wird für CHO-Zellen frisches Kultivierungsmedium für PC12-Zellen hingegen PC12-Differenzierungsmedium mit 100 ng/ml NGF verwendet. CHO-Zellen können nach weiteren 24 h fixiert und entsprechend der Anwendung gefärbt werden. PC12-Zellen werden, um eine ausreichende Differenzierung zu erzielen, 48 h in NGF-haltigem Medium kultiviert.

4.4.2.2 Adenovirus-Infektion

Die Infektion mit Adenoviren, welche das gewünschte Plasmid tragen, eignet sich besonders für die primären Cortex-Zellen, sowie für die retinalen Ganglienzellen, da sie direkt zu den Zellen gegeben werden können und außerdem eine nur leichte Überexpression der gewünschten Proteine in den Zellen erzeugen. Dies kann toxische Effekte der zu untersuchenden Proteine auf die Zellen minimieren.

In der vorliegenden Arbeit werden Adenoviren verwendet, welche für die Proteine PINK1^{FL}-YFP, Δ N-PINK1-YFP, Δ N-PINK1^{T313M}, CFP-MARK2^{WT}, oder CFP-MARK2^{T208A/S212A} kodieren. Für die Infektion werden bei Einzeltransfektionen 3×10^7 infektiöse Partikel, bei Doppeltransfektionen 3×10^7 infektiöse Partikel jedes rekombinanten Virus zu den Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgt für 24-48 h.

4.4.3 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzpräparate werden genutzt um die Expression verschiedener Proteine auf Zellebene zu untersuchen. Die verwendeten CHO-, PC12- und Cortex-Zellen werden hierfür wie unter 4.4.2.1 und 4.4.2.2 beschrieben, transfiziert, und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert. Gegebenenfalls erfolgt vor der Fixierung eine Anfärbung der Mitochondrien durch Zugabe des MitoTracker Deep Red 633 in einer Endkonzentration von 10 nM für 1 h unter Kultivierungsbedingungen. Das PFA wird dann durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt und die Zellen werden, wenn anschließend eine Antikörperfärbung erfolgen soll mit eiskaltem Methanol (80 %) für 5 min bei -20°C permeabilisiert. Das Methanol wird dann schrittweise mit 1 x PBS verdünnt und schließlich vollständig ausgewaschen. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wird für 30 min bei 37°C mit Ziegen-Serum (10% in 1 x PBS) blockiert. Anschließend werden die Zellen zuerst mit primären Antikörpern und dann mit den jeweiligen FITC- bzw. TRITC-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Zwischen allen Inkubationsschritten sowie nach der letzten Antikörperinkubation werden die Zellen gründlich je dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Abschließend werden die Deckgläser in einem Tropfen Permafluor (Immuntech, Marseille) eingebettet und für mindestens 24 h getrocknet. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop LSM510 Meta der Firma Zeiss mit einem 63 x Öl-Objektiv.

4.4.3.1 Lebendbeobachtung und Auswertung der Mitochondrienbewegung

Für die Beobachtung der Mitochondrienbewegung werden die retinalen Ganglienzellen genutzt, welche nach der Virusinfektion für 1h unter Kultivierungsbedingungen mit dem MitoTracker Deep Red 633 (Molecular Probes®, Invitrogen) gefärbt werden. Auch während der Beobachtungszeit werden 37°C und 5% CO₂ bereitgestellt. Je Beobachtung werden über einen Zeitraum von 5-10 min alle 2-15 sek Einzelbilder aufgenommen. Genutzt wird hierfür das LSM510 Meta Konfokale Mikroskop (Zeiss, Jena) mit einem 63 x Öl-Immersion Objektiv und die Laser-Einstellung für das Fluorophor Cy5. Zuvor wird entsprechend des transfizierten Fusionsproteins dessen Expression mit den Laser-Einstellungen für die Fluorophore YFP- oder CFP- überprüft. Die Zeiss LSM510 Bild Software wird für die Aufzeichnung der einzelnen Mitochondrienbewegungen genutzt. Mittels der Software ImageJ Kymograph (http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html) werden Beobachtungsregionen an den beobachteten Axonen festgelegt und für jede Beobachtungsregion Kymographen der Mitochondrienbewegungen erstellt. Anhand der Kymographen kann die Bewegungsrichtung (antero, retro), die Geschwindigkeit (v [$\mu\text{m/s}$]), die Transportstrecke (L [μm]) und somit auch die Pausenzeit bestimmt werden. Mitochondrien werden dann als „aktiv transportiert“ bezeichnet, wenn sie eine Geschwindigkeit von mindestens 0,3 $\mu\text{m/s}$ erreichen (Trinczek et al., 1999), und können damit von der Brown'schen Bewegung unterschieden werden. Wenn die Geschwindigkeit unter 0,3 $\mu\text{m/s}$ liegt, werden die Mitochondrien als „pausierend“ bezeichnet. Jede Bewegung wird als einzelner Messwert erfasst. Zu jeder Transfektion werden drei unabhängig aufgenommene Filme ausgewertet.

4.5 Statistische Auswertungen

Alle statistischen Auswertungen der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich mit Hilfe der Tabellenkalkulation Excel (Microsoft Office) vorgenommen.

Für die statistische Auswertung der Mitochondrienbewegung wird in der vorliegenden Arbeit zunächst die Normalverteilung der Messwerte mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Anschließend wird über die einfaktorielle Varianzanalyse der Zusammenhang zwischen Transfektion und dem beobachteten Effekt (z.B. Geschwindigkeit) getestet. Der jeweilige Abgleich zwischen Werten zweier bestimmter Transfektionen erfolgt danach über den Fischer-Test. Der Test auf eine Abhängigkeit zweier Faktoren, in diesem Fall Doppeltransfektion, wird mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt.

Für einfache Signifikanzvergleiche werden die angegebenen P-Werte mittels Fischer-Test berechnet.

In den gezeigten Abbildungen werden P-Werte $< 0,05$ mit „*“, P-Werte $< 0,01$ mit „**“ und P-Werte $< 0,001$ mit „***“ dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 MARK2 bindet und phosphoryliert PINK1

Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen MARK2 und PINK1 entdeckt, indem in einem Hefe-2-H-System MARK2 als Köder zum Durchmustern einer fötalen humanen Gehirn-cDNS-Bibliothek verwendet wurde. Im anschließenden direkten Test erwiesen sich vor allem die Kinasedomänen der beiden Proteine als besonders bindungsfähig. Durch Koimmunopräzipitation (KOIP) konnte die Bindung zwischen PINK1 und MARK2 bestätigt werden.

In einem Kinaseassay unter Verwendung von ^{32}P (radioaktiv markiertes Phosphat) konnte außerdem gezeigt werden, dass die konstitutiv aktive MARK2^{T208E} bevorzugt $\Delta\text{N-PINK1}$ phosphoryliert. Mit Beginn dieser Arbeit folgte dann die Betrachtung der zellulären Bedeutung der PINK1-MARK2-Wechselwirkung (Matenia et al. 2011; eingereicht).

5.1.1 Zelluläre Lokalisation von $\Delta\text{N-PINK1}$, PINK1^{FL} und MARK2

Um die subzelluläre Lokalisation von PINK1 und MARK2 zu bestimmen wurden zunächst primäre Cortex-Zellen adenoviral mit $\Delta\text{N-PINK1-YFP}$ oder PINK1^{FL}-YFP zusammen mit der kinasetoten CFP-MARK2^{T208A/S212A} kotransfiziert, fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die kinasetote CFP-MARK2^{T208A/S212A} wurde verwendet, da sie zwar inaktiv ist, dabei aber die Substratspalte trotzdem in einer offenen Konformation vorliegt. Es ergab sich sowohl für $\Delta\text{N-PINK1}$ als auch für PINK1^{FL} eine Kolo-kalisation mit MARK2^{T208A/S212A}. Vor allem in den Dendriten und dem Axon der Zellen zeigen beide Proteine außerdem ein punktiertes Muster (Abb. 11). Dies ist für $\Delta\text{N-PINK1}$ deutlicher zu erkennen, da dessen Expression im Gegensatz zu PINK1^{FL} in den Dendriten und Axonen am stärksten, während PINK1^{FL} primär im Zellsoma zu finden ist.

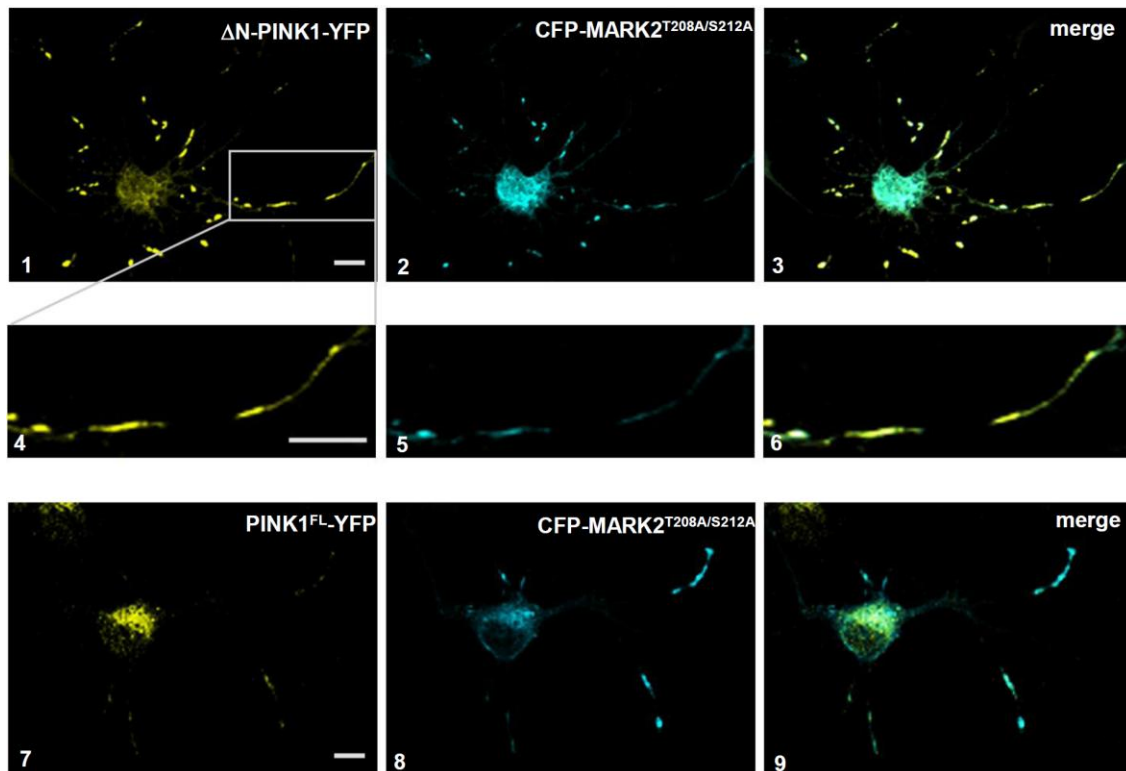


Abbildung 11: Kolokalisation von ΔN -PINK1 und PINK1^{FL} mit MARK2^{T208A/S212A} vor allem in den Ausläufern von Cortex-Zellen. Dabei ist ΔN -PINK1 besonders stark in Dendriten und Axonen, PINK1^{FL} hingegen vor allem im Zellkörper exprimiert.

Ein ähnliches punktiertes Muster wurde für MARK2 bereits gezeigt (Schmitt-Ulms et al. 2009). Hierbei wurde deutlich, dass MARK2 neben seiner zytoplasmatischen Lokalisation auch an Vesikeln des AP-2-Komplexes vorliegt. Die hier nachgewiesene Interaktion und Kolokalisation von PINK1 und MARK2, sowie die bereits bekannte Assoziation von PINK1 mit Mitochondrien legten den Schluss nahe, dass PINK1 und MARK2 an Mitochondrien kolokalisieren.

Durch eine Färbung der Mitochondrien und der aktiven Form der MARK2 (MARK2^{T208E}) konnte eine teilweise Kolokalisation zwischen MARK2^{T208E} und Mitochondrien gezeigt werden (Abb. 12A). Eine Absicherung dieser Beobachtung erfolgte anhand der Mitochondrienfraktion von N2A-Zellen, welche uns freundlicherweise von A.M. Cuervo (Albert Einstein College, Bronx, New York) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Mitochondrienfraktion wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und nach Western-Blotting auf die Verteilung der Proteine MARK, Aktin und VDAC analysiert. Dabei sollte Aktin, als rein zytoplasmatische Komponente, nicht in der Mitochondrienfraktion zu finden sein. Dafür sollte aber VDAC, ein spezifisch mitochondriales Membranprotein,

ausschließlich in der Mitochondrienfraktion vorkommen. Die Anfärbungen von Aktin und VDAC/Porin weisen eine saubere Auftrennung der Mitochondrienfraktion nach (Abb. 12B Spur 2 und 3). Entsprechend der Erwartung zeigt sich, dass MARK2 auch in der mitochondrialen Fraktion vertreten ist und bestätigt damit die Beobachtung der Fluoreszenzbilder (Abb. 12B, Spur 1).

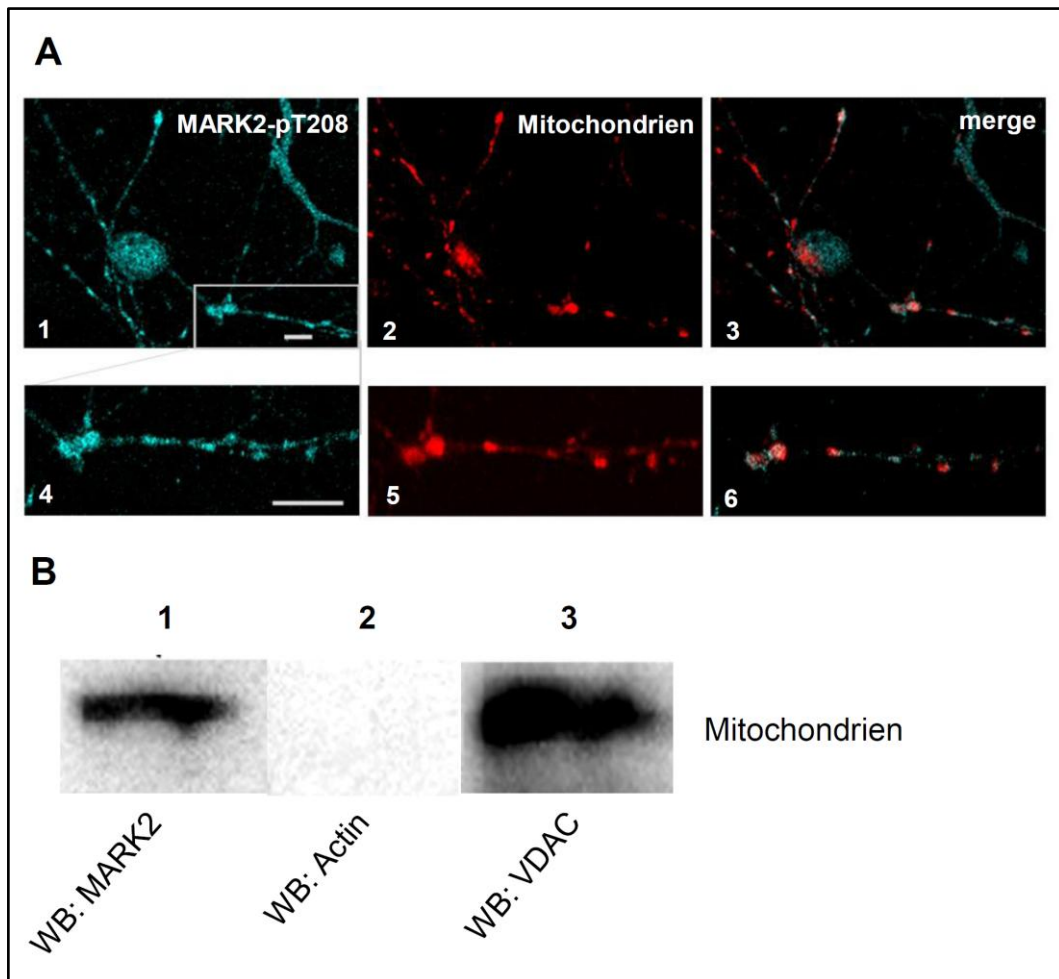


Abbildung 12: Subzelluläre Lokalisation von MARK2 in N2A-Zellen und primären Neuronen. (A) Aktive MARK2 (cyan, 1 und 4) kolokalisiert mit Mitochondrien (rot, 2 und 5) vor allem in den Axonen und Dendriten von primären Ratten Cortex Zellen. Maßstab: 10 μ m. (B) MARK-Nachweis (polyklonaler MARK1-4 Antikörper) in der Mitochondrienfraktion von N2A-Zellen (Spur 1). Bestätigung der Reinheit der Fraktion über den cytoplasmatischen anti- β -Actin-Antikörper (Spur 2) und den mitochondrialen anti-VDAC/Porin-Antikörper (Spur 3).

5.2 MARK2 phosphoryliert Δ N-PINK1 an T313

5.2.1 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in Δ N-PINK1

Die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in Δ N-PINK1 erfolgte in vier Schritten. Zuerst wurde ein Kinaseassay mit Δ N-PINK1 und MARK2^{T208E} durchgeführt, gefolgt von dem chymotryptischen Verdau der Δ N-PINK1–SDS-Gel-Bande. Drittens wurden die gewonnenen Peptide zweidimensional mittels Elektrophorese- und Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und letztlich die Phosphopeptide eluiert und massenspektrometrischen analysiert.

Nach Durchführung des Kinaseassays wurden die Proteine mittels SDS-Gel-Elektrophorese getrennt und die Banden bei 72 kDa, welche dem Δ N-PINK1–GST entsprechen aus dem Gel ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Proteinbanden, gemessen in Counts, wurde am Szintillationsmessgerät bestimmt und nach der unten stehenden Berechnung wurde der Einbau von ³²P in Δ N-PINK1 ermittelt. Es ergab sich ein Einbau von 0,573 mol ³²P/ mol Δ N-PINK1-GST.

Berechnung des Einbaus von ³²P in Δ N-PINK1-GST:

Messung Counts Probe: 2328 dps

Messung Counts eingesetztes ³²P: 185000 dps

Eingesetzte Menge „kaltes“ ATP: $1,5 \times 10^{-9}$ mol

Eingesetzte Menge Δ N-PINK1-GST: $3,28 \times 10^{-11}$ mol

$$\text{Einbau mol } ^{32}\text{P: } \frac{1,5 \times 10^{-9} \text{ mol ATP} \times 2328 \text{ dps}}{185000 \text{ dps}} = 1,88 \times 10^{-11} \text{ mol } ^{32}\text{P}$$

Pro Mol Δ N-PINK1-GST

$$\text{eingebautes } ^{32}\text{P: } \frac{1,88 \times 10^{-11} \text{ mol } ^{32}\text{P}}{3,28 \times 10^{-11} \text{ mol } \Delta\text{N-PINK1-GST}} = 0,573 \text{ mol } ^{32}\text{P/mol } \Delta\text{N-PINK1-GST}$$

Die anschließende zweidimensionale Auftrennung der chymotryptischen Peptide ergab ein Muster von vier „Spots“, wobei Spot 1 mit 16% der

Gesamtradioaktivität besonders stark war (siehe Tabelle 1 und Abb.: 13). Die in den Spots enthaltenen Peptide wurden nun massenspektrometrisch bestimmt (siehe Tabelle 2). Nur in den zwei stärksten Spots, Spot 1 und 2 wurden dabei Phosphopeptide identifiziert und in beiden fanden sich einerseits Peptide, welche das T313 und andererseits solche, die Thr333 und S335 enthalten. Die übrigen Peaks beider Spots, werden nicht in Tabelle 2 aufgeführt, da sie entweder unphosphorylierten Peptiden zugeordnet werden können, oder auch in der Leerkontrolle enthalten waren. Die Peaks der Leerkontrolle stammen aus dem für den Verdau verwendeten Chymotrypsin und aus Verunreinigungen durch Keratin. Die Intensität der Peaks entspricht nicht der Phosphorylierung des jeweiligen Peptids, sondern ist von dessen Moleküleigenschaften abhängig. Die unten abgebildete Phosphopeptidkarte und auch die hier bestimmten Phosphopeptide konnten in drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden. Der Abgleich der massenspektrometrisch erhaltenen Peptidmassen erfolgte mit virtuell ermittelten Peptidmassen (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>).

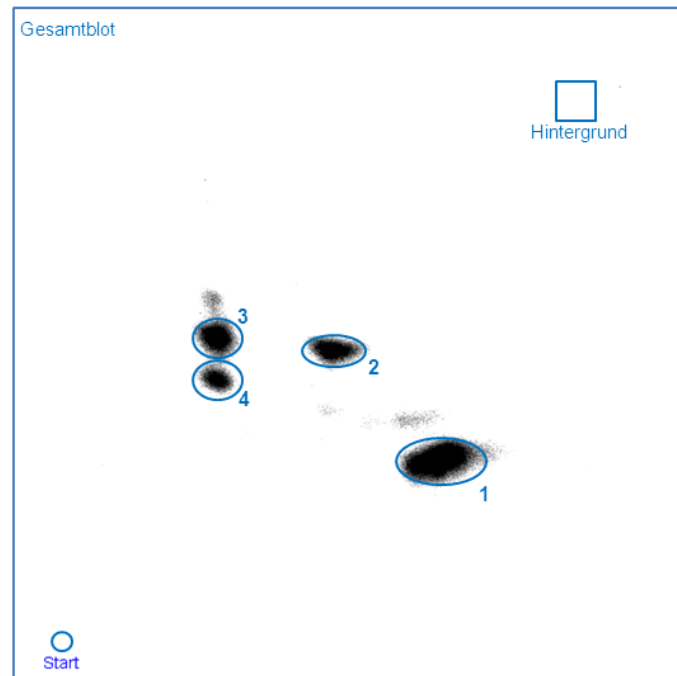


Abbildung 13: Phosphopeptidkarte von Δ N-PINK1 nach MARK2^{T208E} Phosphorylierung und anschließendem chymotryptischen Verdau. Peptide wurden zweidimensional durch Dünnschicht-Elektrophorese (horizontal) und anschließende Dünnschicht-Chromatographie (vertikal) getrennt.

Tabelle 1: Anteil der Phosphorylierung der Spots in der Phosphopeptidkarte. Intensitäten sind auf die Fläche des jeweiligen Spots bezogen. In Spalte 3 wurde der Hintergrund entsprechend der jeweiligen Fläche abgezogen.

| Feld | Intensität [PSL] | Intensität – Hintergrund [PSL] | % der Gesamt-Counts |
|-------------|------------------|--------------------------------|---------------------|
| Startpunkt | 162,2 | 3,5 | 0,003 |
| Gesamtblot | 237781,8 | 99352,4 | 100 |
| Hintergrund | 441,2 | 0 | 0 |
| 1 | 16978,6 | 16004,9 | 16,1 |
| 2 | 7496,9 | 6908,6 | 6,95 |
| 3 | 7180,4 | 6656,4 | 6,7 |
| 4 | 4837,0 | 4378,7 | 4,41 |

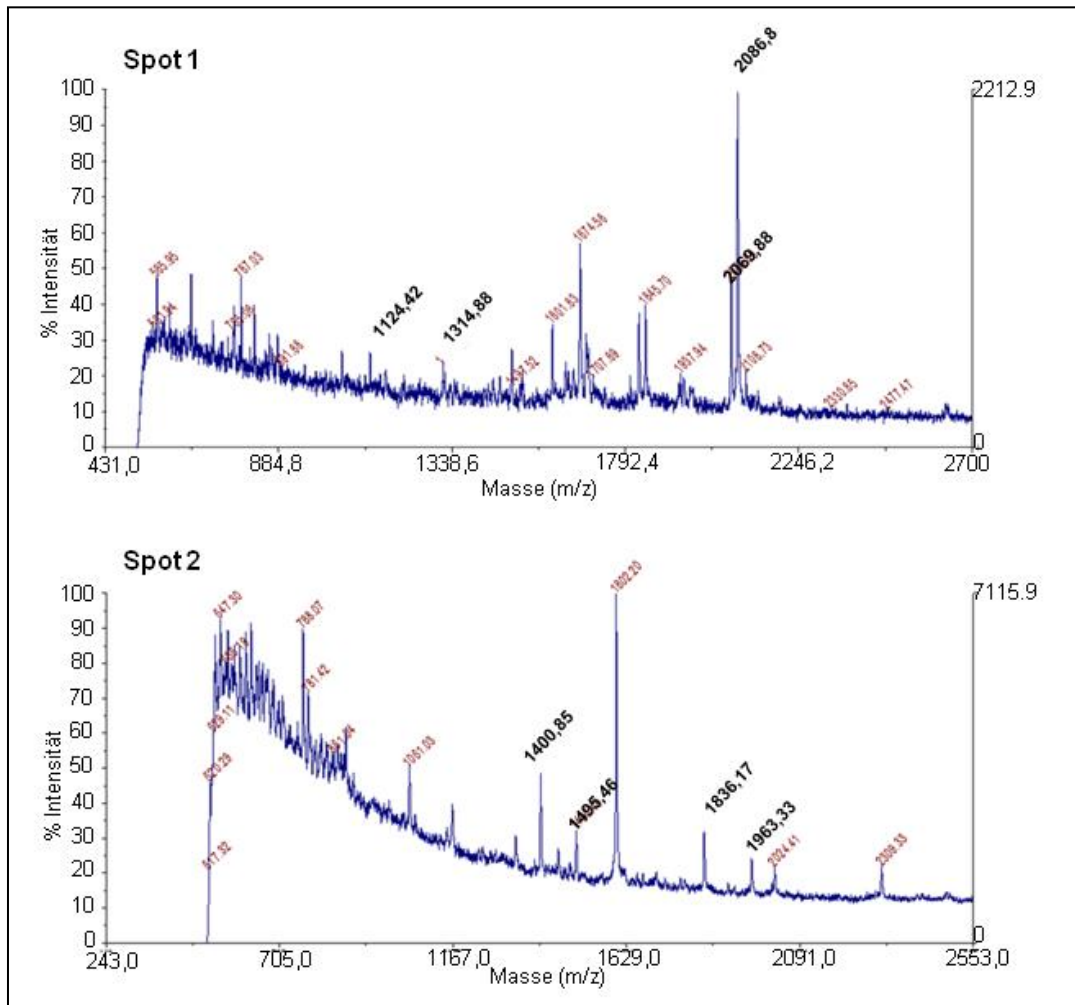


Abbildung 14: Massenspektrometrische Analyse der Δ N-PINK1-Peptide, isoliert aus Spot 1 und Spot 2 der Phosphopeptidkarte

Tabelle 2: Zuordnung der massenspektrometrischen Peaks zu PINK1-Phosphopeptiden

| Peptide-map-Spot | Counts pro Spot % | m/z (gemessen) | m/z (kalkuliert) | PINK1-Peptid | Anzahl Phospho-stellen | Position Phosphorylierung |
|------------------|-------------------|----------------|------------------|--------------|------------------------|---------------------------|
| 1 | 16 | 1124,42 | 1124,2 | 330-339 | 1 | T333, S335 |
| 1 | 16 | 1314,88 | 1313,39 | 243-253 | 1 | S245 |
| 1 | 16 | 2069,68 | 2070,23 | 217-234 | 2 | S225, S228, S229, S230 |
| 1 | 16 | 2086,8 | 2088,4 | 310-325 | 1 | T313, T324 |
| 2 | 6,95 | 1400,85 | 1401,47 | 304-316 | 1 | T313 |
| 2 | 6,95 | 1495,46 | 1493,41 | 445-466 | 2 | S463, S465 |
| 2 | 6,95 | 1836,17 | 1835,05 | 330-344 | 2 | T333, S335 |
| 2 | 6,95 | 1963,33 | 1963,14 | 432-449 | 1 | S432 |

Im Folgenden wurde sich auf die Aminosäure T313 konzentriert, da T313M eine bekannte und häufig auftretende Mutation bei Patienten mit vererbbarem frühem Parkinson ist (Zhang et al. 2005, Chisti et al. 2006, Mills et al. 2008). Patienten mit dieser Mutation zeigen Symptome, wie asymmetrischen Tremor und Dystonie. Eine heterozygote Mutation muss die Krankheit nicht auslösen, offenbar spielen weitere Faktoren eine Rolle (Chisti et al. 2006). Da T313 in der Kinasedomäne von PINK1 liegt, führt diese Mutation möglicherweise zu einem Verlust der PINK1-Funktion.

5.2.2 Bestätigung der Phosphorylierungsstelle durch Mutation von Δ N-PINK1 in Δ N-PINK1-T313A

Mittels punktspezifischer Mutagenese mit entsprechenden Primern wurde das T313 in Alanin umgewandelt um eine nicht mehr oder geringer phosphorylierbare Mutante von Δ N-PINK1 zu erhalten.

Anschließend wurde zur Bestätigung, dass es sich bei der Phosphorylierungsstelle T313 in PINK1 tatsächlich um die MARK2-Phosphorylierungsstelle handelt, in drei unabhängigen Versuchen vergleichend

das Δ N-PINK1-GST und das Δ N-PINK1^{T313A}-GST zusammen mit MARK2^{T208E}-His und ³²P für 1 Stunde phosphoryliert. Anschließend wurden die Proteine gefällt und mittels SDS-Page getrennt. Die Auswertung der Autoradiogramme ergab dabei im Mittel eine Reduktion der PINK1-Phosphorylierung auf $40 \pm 3\%$ für die T313A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb.: 15A). Die relative Phosphorylierung von Δ N-PINK1-GST wurde für die Auswertung als 100% gesetzt und die Normalisierung der Phosphorylierungswerte für Δ N-PINK1-GST und Δ N-PINK1^{T313A}-GST erfolgte anhand der Autophosphorylierung von MARK2^{T208E}. Die Autophosphorylierung von MARK2^{T208E} diente dabei als Maß für dessen Aktivität, welche sich durch leichte Schwankungen im Versuchsansatz ändern konnte.

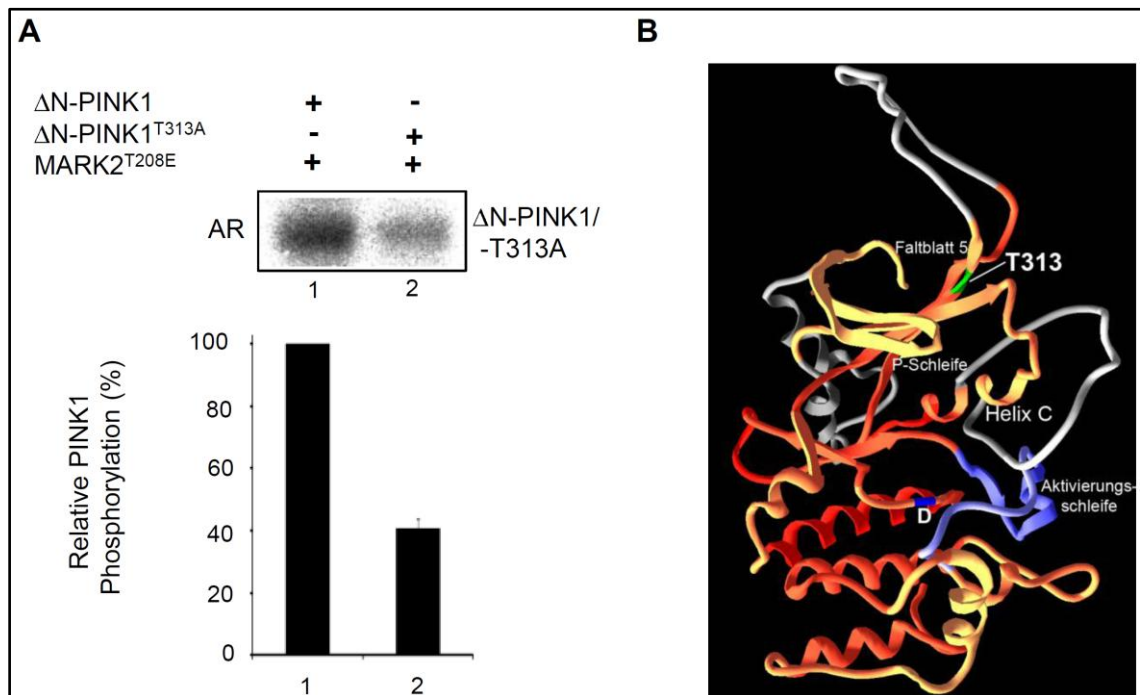


Abbildung 15: (A) Mutation von T313 zu Alanin in Δ N-PINK1 führt zu einer 60% Reduktion der MARK2^{T208E}-induzierten Phosphorylierung gegenüber Δ N-PINK1. Autoradiogramme zeigen die Phosphorylierungen von Δ N-PINK1 und Δ N-PINK1^{T313A} (Spur 1 und 2). In der quantitativen Analyse ist die MARK2^{T208E} induzierte Phosphorylierung von Δ N-PINK1 gleich 100% gesetzt (Spur 1). Für Δ N-PINK1^{T313A} reduziert sich die Phosphorylierung auf 40% (Spur 2). Dreifache Experimente zeigen den Mittelwert \pm SE. (B) Strukturmodell von PINK1 auf der Basis der bekannten CaMK1 durch SwissModell erstellt durch Dr. Thomas Timm. Graue Bereiche entsprechen solchen, die nicht mit anderen Kinasen übereinstimmen. Das katalytische Aspartat (D) ist blau, die Aktivierungsschleife violett und das T313 im Falblatt 5 grün markiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über 50% der PINK1-Phosphorylierung an T313 stattfindet. Möglicherweise könnte durch zusätzliche Mutation von T333 oder S335 eine weitere Reduktion der Phosphorylierung erreicht werden.

Die Phosphorylierungsstelle T313 liegt nach einem Struktur-Modell (Abb. 15B, grüne Markierung), welches auf Basis der verwandten Kinase CaMK1 (PDB-ID 1fotA) über SwissModell erstellt wurde, im β -Faltblatt 5 der Kinase. Dieses Faltblatt könnte bei einer Konformationsänderung, beispielsweise ausgelöst durch die Phosphorylierung an T313, mit der Helix C oder dessen Insert interagieren. Da die Helix C zusammen mit der P-Schleife das Gerüst zur Fixierung von Mg-ATP bildet, ist sie für die Aktivität der Kinase von Bedeutung.

5.3 PINK1 und MARK2 regulieren den Mitochondrientransport

5.3.1 PINK1^{FL} und Δ N-PINK1 ändern die Mitochondrienlokalisierung in primären Cortex-Zellen

Um festzustellen, welchen Einfluss PINK1 und MARK2 auf zelluläre Prozesse haben, wurden zunächst Cortex-Zellen adenoviral mit CFP-MARK2^{WT}, PINK1^{FL}-YFP oder Δ N-PINK1-YFP einzeln oder in den jeweiligen Kombinationen transfiziert. Da PINK1 und MARK2 mit Mitochondrien kolokalisieren, wurde anschließend in fixierten Zellen die Verteilung der Mitochondrien ausgewertet. Mitochondrien in untransfizierten Zellen sind weitgehend gleichmäßig in Axon und Zellkörper verteilt, wobei sie sich innerhalb des Zellkörpers in Richtung Axonhügel häufen (Abb. 16, Bild 1). An dieser Verteilung ändert sich wenig, außer einer leichten Verdichtung der Mitochondrien in Richtung Axon (Abb. 16, Bild 3), wenn CFP-MARK2^{WT} transfiziert wird. Auch kann man wiederum die teilweise Kolokalisation von MARK2 mit den Mitochondrien beobachten (Abb. 16, Bild 2 und 3).

Wird PINK1^{FL}-YFP transfiziert, verschiebt sich die Lokalisation der Mitochondrien in Richtung Axonhügel, im Axon selbst scheinen nur wenige Mitochondrien lokalisiert zu sein (Abb. 16, Bild 5).

Eine dazu gegensätzliche Verteilung der Mitochondrien zeigt sich, wenn die

Zellen mit ΔN -PINK1 transfiziert wurden. Aus Abb. 16, Bild 7 wird deutlich, dass Mitochondrien einerseits im Zellkörper lokalisiert sind, andererseits kann eine Anhäufung oder Verklumpung von Mitochondrien im Dendriten beobachtet werden. Auch ΔN -PINK1 kolokalisiert dabei mit den Mitochondrien (Abb. 16, Bild 6 und 7, weißer Pfeil).

Offenbar verstärkt werden die genannten Effekte von PINK1^{FL} und ΔN -PINK1 wenn sie jeweils zusammen mit MARK2^{WT} transfiziert werden. Im Falle von PINK1^{FL} und MARK2^{WT} können Mitochondrien fast ausschließlich im Zellkörper beobachtet werden (Abb. 16, Bild 10, weißer Pfeil), umgekehrt zeigen sich wieder Mitochondrienanhäufungen in den Zellfortsätzen wenn ΔN -PINK1 zusammen mit MARK2^{WT} transfiziert wird (Abb. 16, Bild 13, weiße Pfeile). Die starke Vakuolenbildung in der ΔN -PINK1-YFP + CFP-MARK2^{WT} transfizierten Zelle deutet außerdem auf eine verminderte Vitalität der Zelle hin.

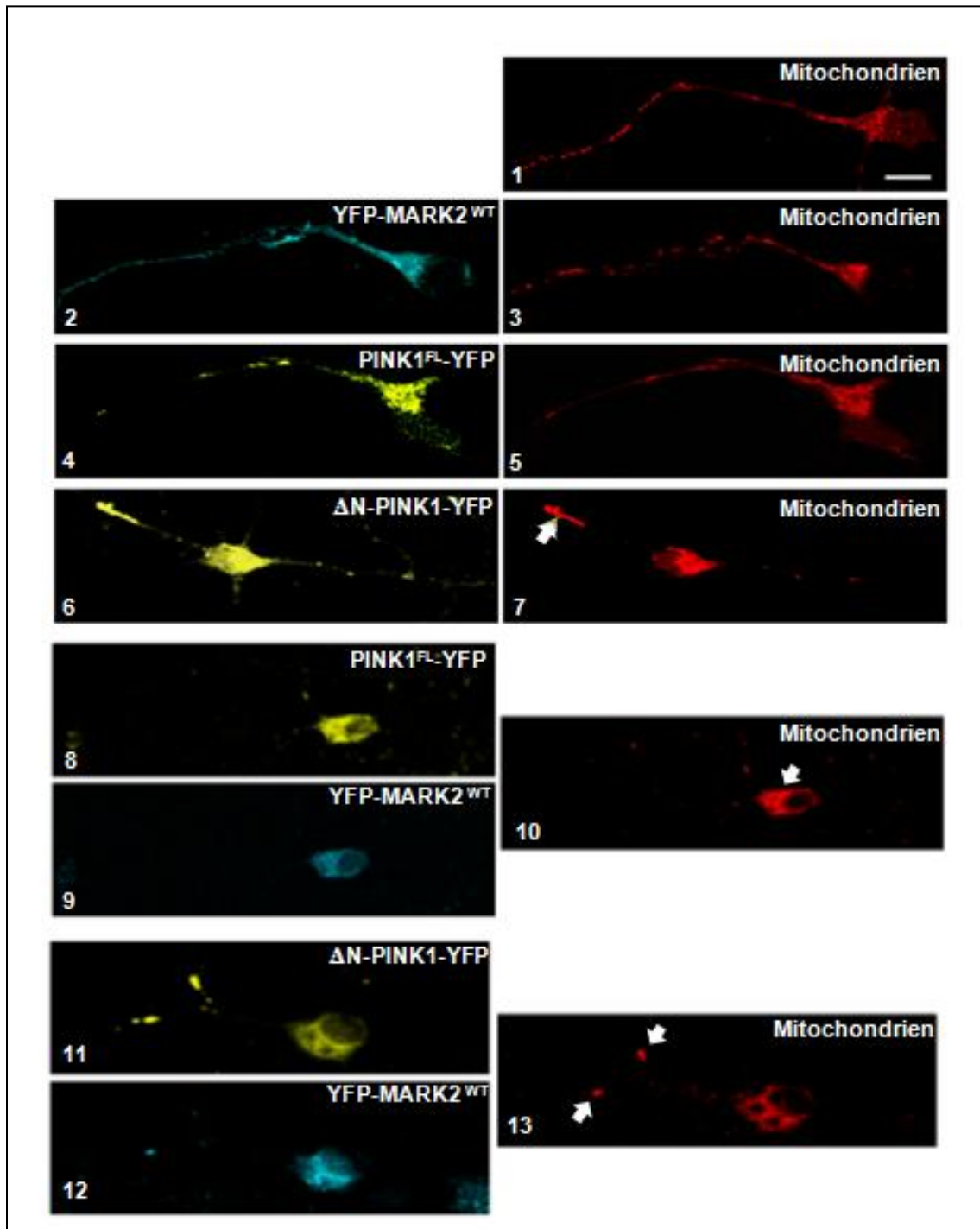


Abbildung 16: PINK1^{FL} (gelb) und ΔN-PINK1 (gelb) verändern die Mitochondrienverteilung in primären Ratten Cortex-Zellen. Mitochondrien sind in untransfizierten und MARK2^{WT} (cyan)-transfizierten Zellen weitgehend gleichmäßig in Zellkörper und Axon verteilt (Bild 1 und 3). In PINK1^{FL}-transfizierten Neuronen liegen die Mitochondrien vorwiegend im Zellkörper vor (Bild 5) und in ΔN-PINK1-transfizierten Neuronen zeigen sich Mitochondrienakkumulationen im Zellkörper und in Dendriten (Bild 7, weißer Pfeil). MARK2^{WT} scheint die genannten Effekte von PINK1^{FL} und ΔN-PINK1 zu verstärken (Bild 10 und 13, weiße Pfeile). Maßstab: 10 μm

5.3.2 Δ N-PINK1 erhöht die Mitochondriendichte in Axonen von RGCs

Um die oben genannten Lokalisationsänderungen der Mitochondrien auch quantitativ zu erfassen, wurde eine Dichte-bestimmung der Mitochondrien durchgeführt. Hierfür wurden, wie auch in den anschließenden Transport-beobachtungen, frisch präparierte retinale Ganglienzellen aus Hühner-embryonen verwendet, da diese große Axone ausbilden und auch die Polarität der Axone sehr leicht festgestellt werden kann.

Die Transfektion erfolgte 24 h nach Präparation, sofern sich Axone gebildet hatten, durch Zugabe von CFP-MARK2^{WT}-, YFP-PINK1^{FL}- und YFP- Δ N-PINK1-Adenoviren beziehungsweise durch die Kombination von MARK2 und PINK1. Nach weiteren 24 h wurden die Mitochondrien angefärbt und die Zellen lebend fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Zur Auswertung wurden jeweils 50 μ m proximale Axonenabschnitte betrachtet. In Abb. 17A, Bild 4 und 6 ist bereits deutlich eine Häufung und teilweise Verklumpung der Mitochondrien erkennbar, wohingegen in untransfizierten, sowie CFP-MARK2^{WT}- und YFP-PINK1^{FL}-transfizierten Zellen die Mitochondrien gleichmäßig verteilt und tubulär erscheinen.

Die Quantifizierung der Mitochondriendichte (Abb. 17B) ergab entsprechend auch für die Δ N-PINK1-Transfektion einen Wert von $25,57 \pm 3,74$ Mitochondrien/50 μ m Axon im Vergleich zu $13,28 \pm 3,04$ Mitochondrien/50 μ m in untransfizierten Zellen. Eine weitere Erhöhung der Mitochondriendichte auf einen Wert von $33,16 \pm 3,60$ Mitochondrien/50 μ m kann beobachtet werden, wenn Δ N-PINK1 und MARK2^{WT} kotransfiziert werden.

Hingegen hat MARK2^{WT} keinen signifikanten eigenen Effekt auf die Dichte der Mitochondrien.

Die unprozessierte PINK1 hingegen zeigt mit einer geringen Signifikanz ($p < 0,5$) eine Abnahme der Mitochondriendichte auf einen Wert von $9,60 \pm 1,14$ Mitochondrien/50 μ m. Diese Verminderung ändert sich unter dem zusätzlichen Einfluss von MARK2^{WT} nicht signifikant. (Abb. 17B, Balken 3 und 4).

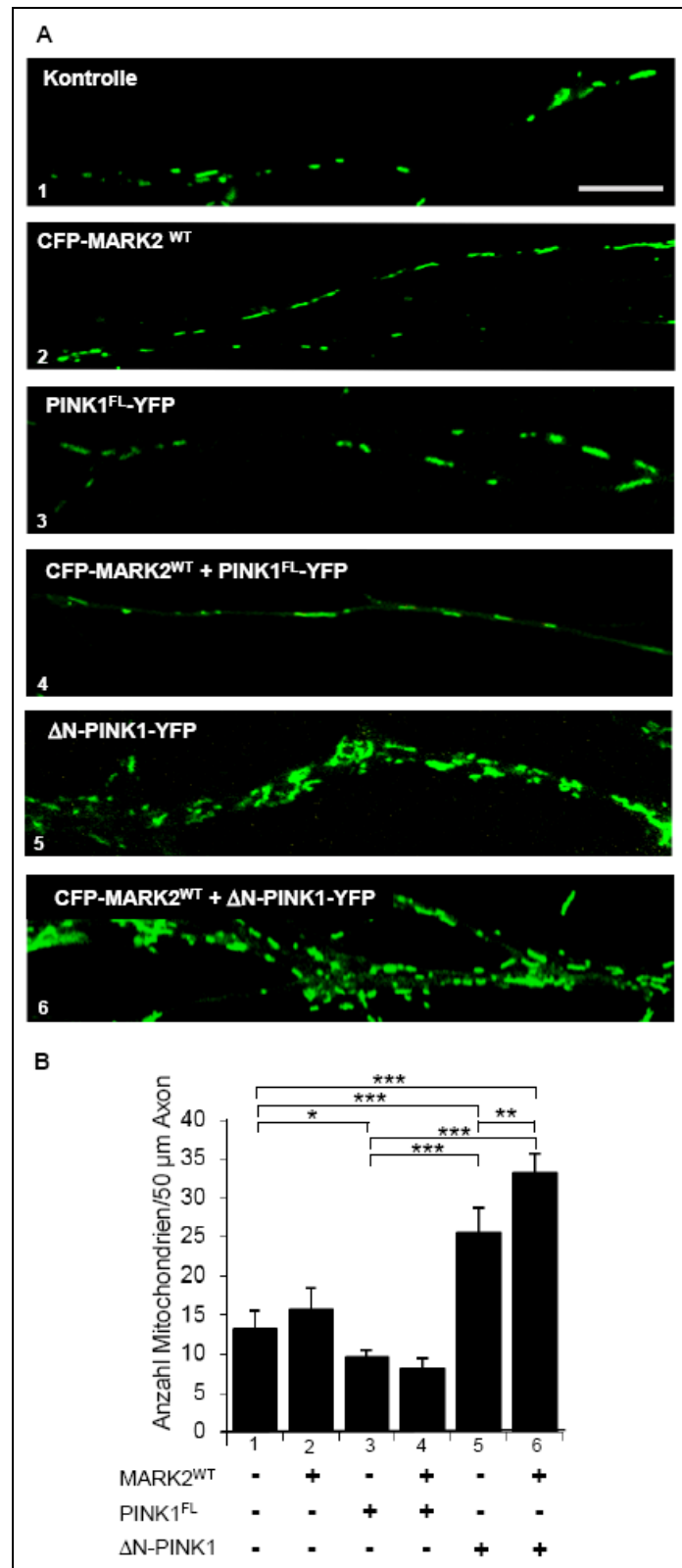


Abbildung 17: Δ N-PINK1 erhöht die Mitochondriendichte. (A) Ausschnitte von Axonen adenoviral transfizierter retinaler Ganglienzellen; angefärbt sind Mitochondrien. Maßstab 10 μ m. (B) Quantifikation der Mitochondrienzahl in 50 μ m Axon. Anzahl der Mitochondrien in Δ N-PINK1-transfizierten Zellen (Balken 5) verdoppelt sich gegenüber Untransfizierten und MARK2^{WT}-transfizierten (Balken 1 und 2). Verstärkt wird der Effekt von Δ N-PINK1 durch MARK2^{WT} (Balken 6). In PINK1^{FL}-transfizierten Zellen verringert sich die Zahl der Mitochondrien im Axon (Balken 3). Messwerte zeigen den Mittelwert \pm SE, signifikante Unterschiede sind vermerkt ($p < 0,05$, $n=5$, einfaktorische Varianzanalyse)

5.3.3 Bestimmung der Transportcharakteristika in untransfizierten RGCs

Für beide Kinasen MARK2 und PINK1 wurde bereits ein Zusammenhang mit axonalem Transport gezeigt. So begünstigt MARK2 den axonalen Transport von Vesikeln oder Zellorganellen, indem es Mikrotubuli-bindende Proteine (MAPs), wie zum Beispiel Tau, phosphoryliert und so von den Mikrotubuli ablöst. Dadurch können sich Motorproteine wie Kinesin leichter an die Mikrotubuli anheften (Mandelkow et al. 2004). Umgekehrt kann aber eine zu starke Aktivität der MARK2 zu einer gesteigerten Phosphorylierung und damit Ablösung der MAPs von den Mikrotubuli führen. Dieses hat dann den Zerfall der Mikrotubuli zur Folge, wodurch wiederum der mikrotubuliabhängige Transport zusammenbricht, da die MAPs für die Stabilisierung der Mikrotubuli verantwortlich sind (Drewes et al. 1997).

PINK1 hingegen wurde kürzlich als Teil des Mitochondrien-Transportkomplexes identifiziert. In diesem Komplex wirken die GTPase Miro und das Adapterprotein Milton zusammen mit PINK1 als Verbindungsstück zwischen der schweren Kette des Motorproteins Kinesin und den Mitochondrien (Weihofen et al. 2009). Es kann somit ein gemeinsamer Einfluss beider Kinasen auf den Mitochondrientransport angenommen werden.

Von Mitochondrien ist bekannt, dass sie entsprechend des zellulären Energiebedarfes in den Axonen verteilt werden können (Chada und Hollenbeck, 2003), indem sie anterograd oder retrograd entlang der Mikrotubuli transportiert werden. Zwischenzeitlich kommt es auch zum Stopp der Mitochondrien. Die genauen molekularen Mechanismen, welche die Bewegungsrichtung und den Stopp regulieren, sind noch weitgehend unbekannt.

Zunächst sollten in den Axonen untransfizierter retinaler Ganglienzellen die Charakteristika „Geschwindigkeit“, „durchschnittliche Pausenzeit“, „Anteil stationärer Mitochondrien“ und „Bewegungsrichtung“ bestimmt werden.

Zur Auswertung wurden die Axone in Bereiche geteilt, und die Bewegungen innerhalb der Bereiche mittels des Programms ImageJ Kymograph (http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html) aufgezeichnet. Anhand des Kymographen (Abb. 18A) konnten anschließend die Bewegungen ausgemessen und daraus Geschwindigkeit und Pausen berechnet werden.

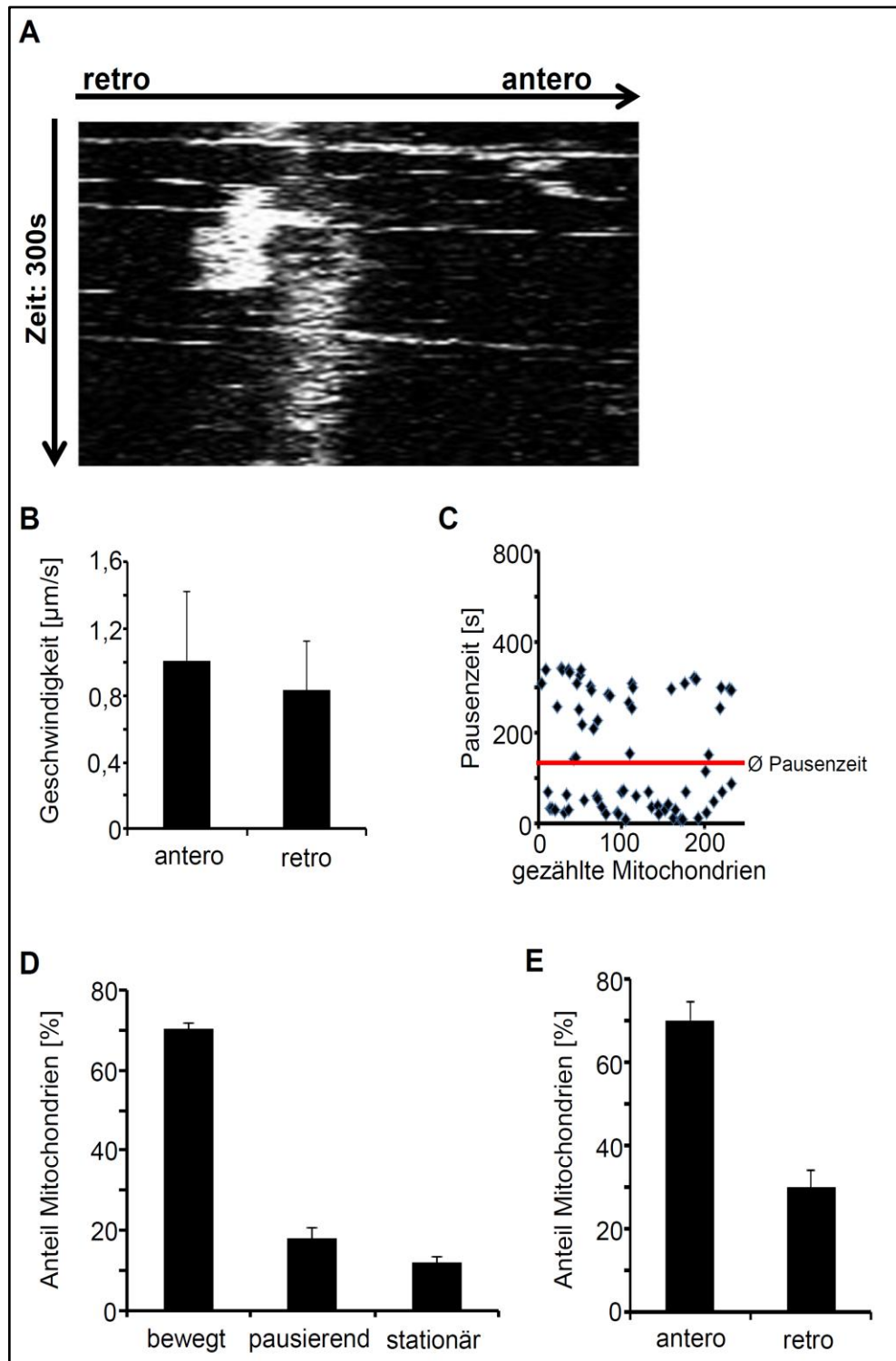


Abbildung 18: Charakterisierung der Mitochondrienbewegung in untransfizierten retinalen Ganglienzellen. Mitochondrien sind überwiegend in Bewegung und bewegen sich vorwiegend anterograd. Ein Teil der Mitochondrien verweilt stationär. (A) Kymograph zeigt die Mitochondrienbewegung in einem 10 μm Axonausschnitt über eine Zeit von 300 s. (B) Anhand von Kymographen ermittelte Geschwindigkeiten für antero- und retrograde Bewegungen. Beide Geschwindigkeiten liegen im Bereich von 1 $\mu\text{m/s}$. (C) Einzelmesswerte der Pausenzeiten und der ermittelte Durchschnittswert von 132 s. Es ergeben sich zwei Populationen, pausierende verweilen <132 s, stationäre verweilen >132 s. (D) Anteil bewegter, pausierender und stationärer Mitochondrien; 70% sind bewegt. (E) Mitochondrien bewegen sich zu 70% anterograd. Messwerte zeigen die Mittelwerte $\pm\text{SE}$

Für die Bewertung der Mitochondrienbewegung wurde als Geschwindigkeit für einen aktiven, Kinesin-getragenen Transport (siehe Kap. 2.3.2) der Wert von $0,3 \mu\text{m/s}$ als Mindestwert festgelegt, entsprechend vorangegangener Experimente (Trinczek et al. 1999). Die Geschwindigkeit der anterograd transportierten Mitochondrien liegt bei ca. $1 \mu\text{m/s}$, allerdings mit einer großen Abweichung von $0,4 \mu\text{m/s}$. Die mittlere Geschwindigkeit der retrograd transportierten Mitochondrien liegt bei $0,83 \pm 0,29 \mu\text{m/s}$ und damit offenbar etwas niedriger als die der anterograd transportierten Mitochondrien (Abb. 18B). Mitochondrien, die eine geringere Geschwindigkeit als $0,3 \mu\text{m/s}$ aufwiesen, wurden als stehende Mitochondrien bewertet und auf ihre durchschnittliche Pausenzeit untersucht. Dabei zeigt sich, dass es zwei Populationen stehender Mitochondrien gibt, wobei die durchschnittliche Pausenzeit bei 132 s liegt. Die eine Population liegt mit $\leq 100 \text{ s}$ deutlich unter, die andere mit $\sim 300 \text{ s}$ deutlich über dem Durchschnitt (Abb. 18C). Aus diesem Grund wurden Mitochondrien mit weniger als 132 s Pausenzeit als „pausierend“ und solche mit mehr als 132 s Pausenzeit als „stationär“ bezeichnet.

Anhand der obigen Einteilung ergibt sich für untransfizierte retinale Ganglienzellen ein Anteil von $70,2 \pm 1,4\%$ bewegter, $17,9 \pm 2,9\%$ pausierender und $11,9 \pm 1,5\%$ stationärer Mitochondrien (Abb. 18D). Die Bewegung der Mitochondrien ist dabei mit $70,2 \pm 4,2\%$ vorwiegend anterograd orientiert (Abb. 18E).

Die im Folgenden abgebildeten Kymographen (Abb. 19) unterschiedlich transfizierter retinaler Ganglienzellen wurden anhand der in diesem Abschnitt festgelegten Rahmenbedingungen, „Mindestgeschwindigkeit“ und der Definition von „stationär“ vergleichend analysiert. Dabei wurden die Parameter „Geschwindigkeit“, „Transportstopp“ und „Bewegungsrichtung“ der Mitochondrien genauer ausgewertet. Auf den ersten Blick fällt bei der Betrachtung der Kymographen auf, dass für die $\Delta\text{N-PINK1}$ - und $\Delta\text{N-PINK1} + \text{MARK2}^{\text{WT}}$ -Transfektionen kaum noch Bewegung registriert werden kann.

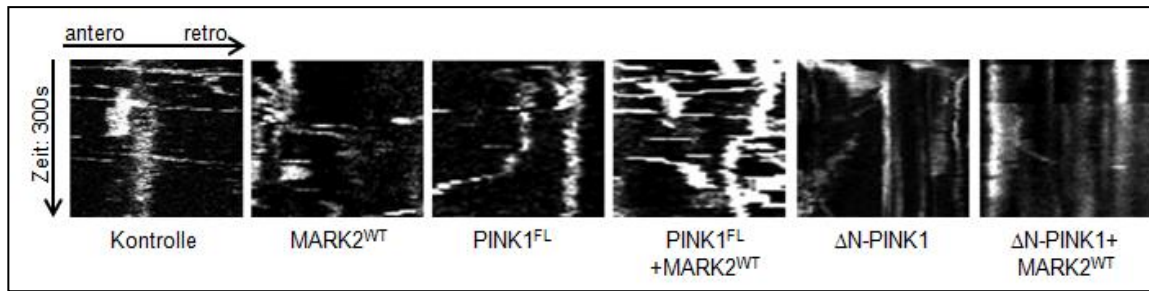


Abbildung 19: Kymographen erstellt in Axonen unterschiedlich transfizierter retinaler Ganglienzellen. Dargestellt wird jeweils die Bewegung der Mitochondrien in einem 10 μm Axonabschnitt über eine Zeit von 300s. Mitochondrien in $\Delta\text{N-PINK1}$ und $\Delta\text{N-PINK1+MARK2}^{\text{WT}}$ transfizierten Zellen zeigen kaum noch bis gar keine Bewegung.

5.3.4 MARK2 vermindert die mitochondriale Geschwindigkeit

Die in Abb. 16 gezeigte veränderte Mitochondrienlokalisierung und die in Abb. 17 gezeigte veränderte Mitochondriendichte nach Transfektion mit PINK1, MARK2 oder einer Kombination aus beiden kann in einer veränderten Transportgeschwindigkeit der Mitochondrien begründet sein. Zunächst wurden daher die Geschwindigkeiten der Mitochondrien, ausgemessen anhand der Kymographen, getrennt nach ihrer Bewegungsrichtung gemittelt (Abb. 20, A). Es wird deutlich, dass die Werte für alle Transfektionen stark streuen, so dass in dieser Abbildung nur eine Tendenz sichtbar wird. Die anterograde Geschwindigkeit wird durch die Transfektion von MARK2^{WT} reduziert. Allerdings können keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Eine mögliche Erhöhung der retrograden Geschwindigkeit für PINK1^{FL} -Transfektionen, wie man sie aus der verminderten Mitochondriendichte (Abb. 17) und der kernnahen Lokalisation der Mitochondrien (Abb. 16) hätte vermuten können, wird ebenfalls nicht sichtbar. Die mittlere anterograde Geschwindigkeit verringert sich allerdings von 1,0 $\mu\text{m/s}$ in Kontrollzellen auf ca. 0,6 $\mu\text{m/s}$ in MARK2^{WT} transfizierten Zellen. Um Effekte auf die mitochondriale Geschwindigkeit sichtbar zu machen, wurden daher zwei Geschwindigkeitsbereiche festgelegt – ein Bereich, der alle Mitochondrien erfasst, die sich mit einer Geschwindigkeit von 0,3-0,6 $\mu\text{m/s}$ bewegen und ein zweiter, der alle Mitochondrien erfasst, die schneller als 0,6 $\mu\text{m/s}$ sind.

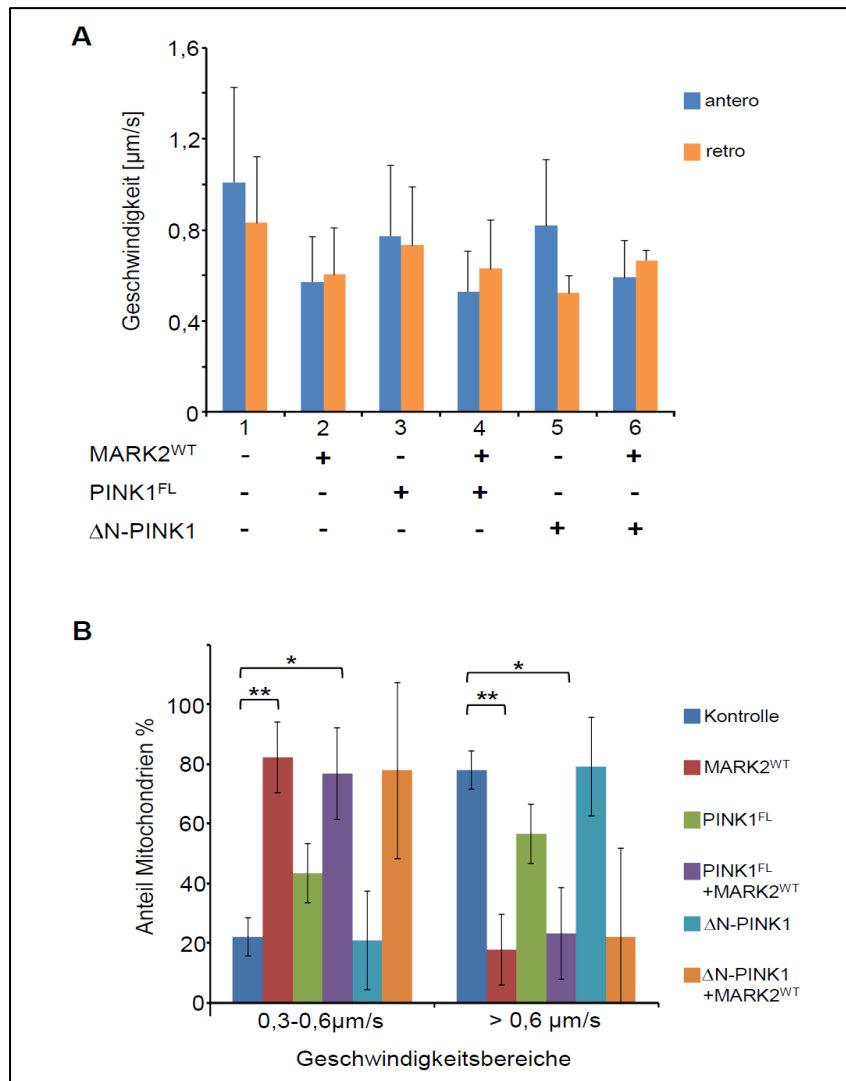


Abbildung 20: MARK2^{WT} reduziert die mitochondriale Geschwindigkeit. (A) Durchschnittliche anterograde und retrograde Geschwindigkeit der Mitochondrien ausgewertet anhand von Kymographen. Durch starke Schwankungen der Ergebnisse sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. (B) Einteilung der anterograden Mitochondrienbewegung in Geschwindigkeitsbereiche von 0,3-0,6 μm/s und >0,6 μm/s. Mitochondrien in Kontrollzellen bewegen sich 80% schneller als 0,6 μm/s, wohingegen nach MARK2^{WT}-Transfektion nur noch ca. 20% schneller als 0,6 μm/s sind. ΔN-PINK1 und PINK1^{FL} haben keinen Einfluss auf die mitochondriale Geschwindigkeit. Gezeigt sind Mittelwerte ±SE. Signifikante Unterschiede sind vermerkt (p<0,05, N≥3, n≥100; Fischer-Test)

Anhand dieser Darstellung kann gezeigt werden, dass sich Mitochondrien in Kontrollzellen zu $78 \pm 6,5\%$ schneller als $0,6 \mu\text{m/s}$ bewegen. Hingegen erreichen diesen Geschwindigkeitsbereich nur $17,6 \pm 11,7\%$ der Mitochondrien in MARK2^{WT}-, $23,2 \pm 15,5\%$ der Mitochondrien in MARK2^{WT} + PINK1^{FL}-, und nur $22,2 \pm 29,6\%$ der Mitochondrien in MARK2^{WT} + ΔN-PINK1- transfizierten Zellen. Dabei sind allerdings nur die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe mit den MARK2^{WT}- und den MARK2^{WT}+PINK1^{FL}-transfizierten signifikant.

Für den retrograden Transport wurden vergleichbare Unterschiede nicht festgestellt, und auch in Abb. 20A wird deutlich, dass Geschwindigkeitsunterschiede in Abhängigkeit der Transfektion noch geringer sind, als für den anterograden Transport.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MARK2 die anterograde Geschwindigkeit der Mitochondrien reduziert, wohingegen PINK1^{FL} und Δ N-PINK1 keinen Einfluss auf die mitochondriale Geschwindigkeit haben.

5.3.5 Δ N-PINK1 erhöht den Anteil stationärer Mitochondrien

Die in Abb. 17 gezeigte Veränderung der Mitochondriendichte kann auch ein Hinweis darauf sein, dass Mitochondrien in unterschiedlichem Maße stehen bleiben. Und tatsächlich geht offenbar eine hohe Mitochondriendichte mit einem hohen Anteil stationärer Mitochondrien einher (Vergl. Abb.: 17 und Abb.: 21).

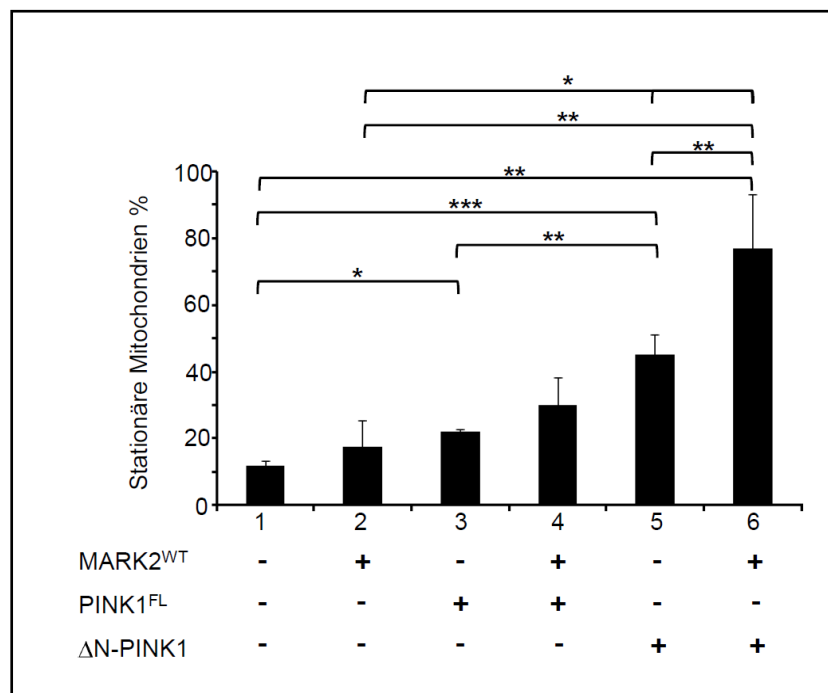


Abbildung 21: Δ N-PINK1 erhöht den Anteil stationärer Mitochondrien und MARK2^{WT} verstärkt den Effekt. Quantifizierung des Anteils stationärer Mitochondrien anhand von Kymographien. PINK1^{FL} (Balken 3) zeigt eine leichte, Δ N-PINK1 (Balken 5) eine deutliche Erhöhung des stationären Mitochondrienanteils gegenüber untransfizierten und MARK2^{WT}-transfizierten Zellen (Balken 1 und 2). Die Kotransfektion von Δ N-PINK1 und MARK2^{WT} steigert den Anteil nochmals auf über 75% (Balken 6). Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede sind vermerkt ($p < 0,05$, $N \geq 3$, $n \geq 100$, einfaktorielles und zweifaktorielles Varianzanalyse).

In untransfizierten Zellen liegt nach der obigen Definition (Kap. 5.3.3) der Anteil stationärer Mitochondrien bei $11,86 \pm 1,47\%$, wohingegen die ΔN -PINK1-transfizierten einen Wert von $45,0 \pm 6,0\%$ und die ΔN -PINK1 + MARK2^{WT}-kotransfizierten sogar einen Wert von $76,85 \pm 16,1\%$ aufweisen.

MARK2^{WT} allein zeigt keinen Einfluss auf den Anteil stationärer Mitochondrien und PINK1^{FL} erhöht den Anteil auf $22,23 \pm 0,49\%$. Eine weitere Erhöhung durch die Kotretransfektion von PINK1^{FL} und MARK2^{WT} wird nicht beobachtet. Umgekehrt kann allerdings auch eine Minderung der stationären Mitochondrien durch PINK1^{FL}, wie durch die Auswertung der Mitochondriendichte hätte angenommen werden können, hier nicht gezeigt werden. (Abb.: 21, Balken 3 und 4)

Insgesamt wird deutlich, dass die prozessierte Form ΔN -PINK1 einen Einfluss auf den Anteil stationärer Mitochondrien hat und dieser Effekt durch MARK2^{WT} verstärkt wird.

5.3.6 PINK1^{FL} und MARK2^{WT} ändern die Bewegungsrichtung der Mitochondrien

Wie bereits in Abb. 18E gezeigt, bewegen sich Mitochondrien in den Axonen untransfizierter retinaler Ganglienzellen vor allem in anterograder Richtung (Abb. 22A, B Balken 1). Bei der Auswertung der Bewegungsrichtung in MARK2^{WT}- und PINK1^{FL}-transfizierten Zellen hingegen verschiebt sich dieses Verhältnis fast zu einem Gleichgewicht beider Richtungen (Abb. 22A, B, Balken 2 und 3). Werden beide Kinasen, PINK1^{FL} und MARK2^{WT}, kotransfiziert wird die retrograde Bewegungsrichtung deutlich mit $77,74 \pm 11,3\%$ bevorzugt (Abb. 22A, B, Balken 4, roter Kasten). PINK1^{FL} und MARK2^{WT} haben somit einen starken Einfluss auf die Bewegungsrichtung der Mitochondrien. Ob allerdings die Interaktion von PINK1^{FL} und MARK2^{WT} zu dieser Verschiebung führt, kann statistisch nicht gezeigt werden. Möglich ist hier, dass sich die einzelnen Effekte addieren.

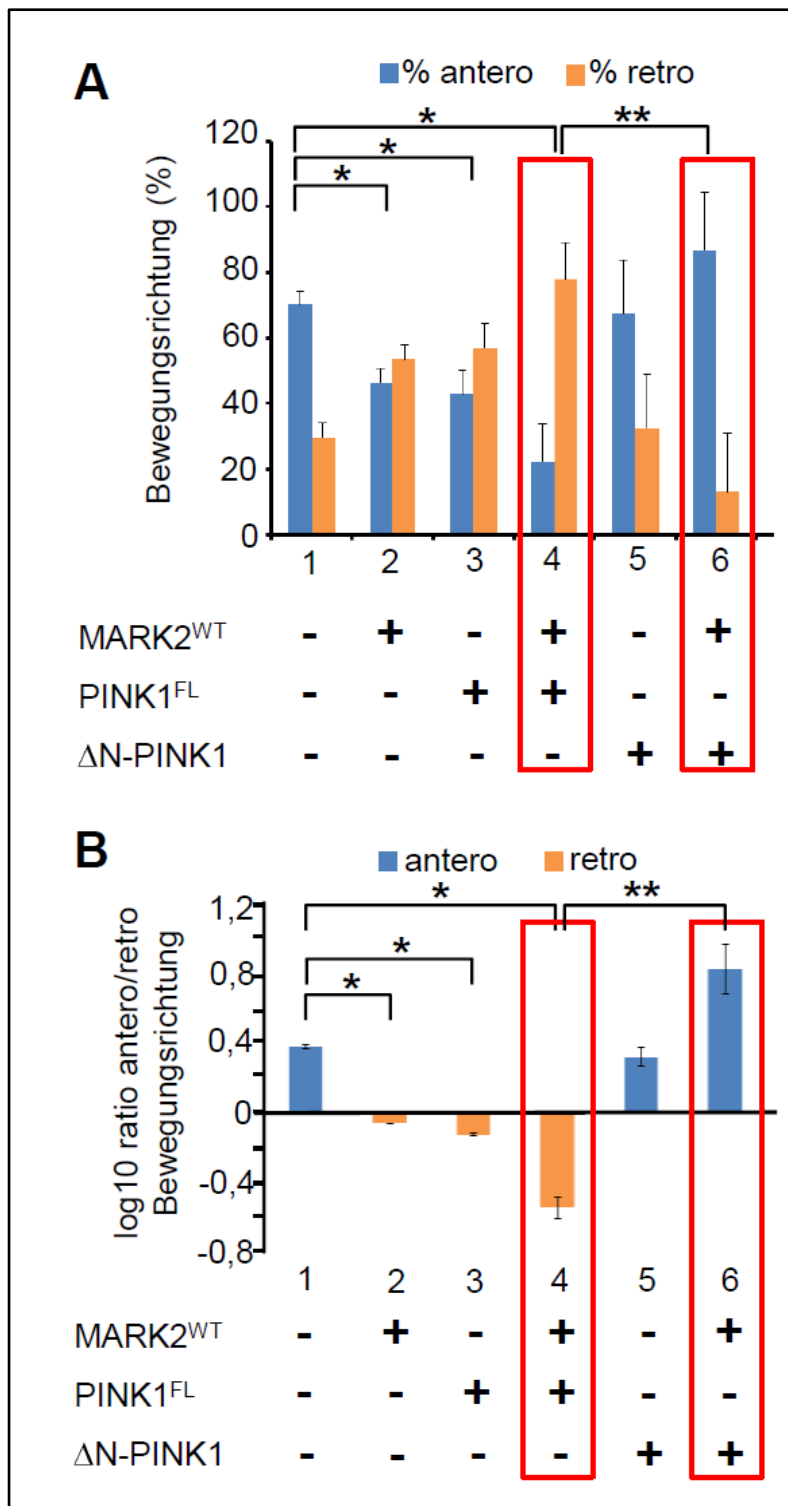


Abbildung 22: PINK1^{FL} und MARK2^{WT} fördern den retrograden Transport von Mitochondrien. (A) Auswertung des Anteils anterograder und retrograder Bewegung. Transfektion von MARK2^{WT} oder PINK1^{FL} macht beide Bewegungsrichtungen gleichwertig (Balken 2 und 3). Eine Kotransfektion beider führt zu einer deutlichen Bevorzugung des retrograden Transportes (Balken 4, roter Kasten). ΔN-PINK1 (Balken 5) ändert die Transportrichtung gegenüber untransfizierten Zellen (Balken 1) nicht, allerdings scheint eine stärkere Bevorzugung der anterograden Richtung vorzuliegen, wenn ΔN-PINK1+MARK2^{WT} kotransfiziert werden (Balken 6, roter Kasten). (B) logarithmische Darstellung der antero/retro-Ratio der Bewegungsrichtung. Messwerte zeigen die Mittelwerte ±SE, signifikante Unterschiede sind dargestellt (p<0,05, N≥3, n≥100, einfaktorielles Varianzanalyse mit anschließendem Fischer Test)

Einen von PINK1^{FL} deutlich divergenten Einfluss auf die Bewegungsrichtung der Mitochondrien hat Δ N-PINK1, da in Δ N-PINK1 transfizierten Zellen die Mitochondrien ein vergleichbares Verhältnis der Bewegungsrichtungen aufweisen, wie die Mitochondrien untransfizierter Zellen (Abb. 22A, B, vgl. Balken 1 und 5). Dies ändert sich auch nicht, wenn Δ N-PINK1 und MARK2^{WT} kotransfiziert werden, eher scheint es, als würde der anterograde Transport noch weiter verstärkt werden (Abb. 22 A, B, Balken 6). Dies kann allerdings nicht statistisch belegt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MARK2^{WT} und PINK1^{FL} den retrograden und Δ N-PINK1 den anterograden Transport fördert. Beide Effekte werden von MARK2^{WT} verstärkt.

5.3.7 PINK1 und MARK2^{pT208} und Kinesin kolokalisieren mit Mitochondrien besonders im Wachstumskegel von Zellausläufern

Die Auswirkungen von PINK1 und MARK2 auf den mitochondrialen Transport lassen vermuten, dass PINK1 und MARK2 möglicherweise einen Effekt auf Motorproteine haben könnten. Bekannt ist, dass PINK1^{FL} sowie Δ N-PINK1 zusammen mit der GTPase Miro und dem Adapterprotein Milton an das Motorprotein Kinesin binden. Es wurde daher angenommen, dass möglicherweise PINK1 in seiner Funktion als Kinase Kinesin regulieren kann.

Zunächst sollte betrachtet werden, wie PINK1, MARK2 und Kinesin in sich differenzierenden PC12-Zellen lokalisiert sind. Dabei konnte beobachtet werden, dass sowohl PINK1 als auch Kinesin vor allem in den Wachstumskegeln der Zellausläufer gehäuft vorliegen (Abb. 23, Bild 2 und 6). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der endogenen Anfärbung von aktiver MARK2^{pT208}. (Abb. 23, Bild 4).

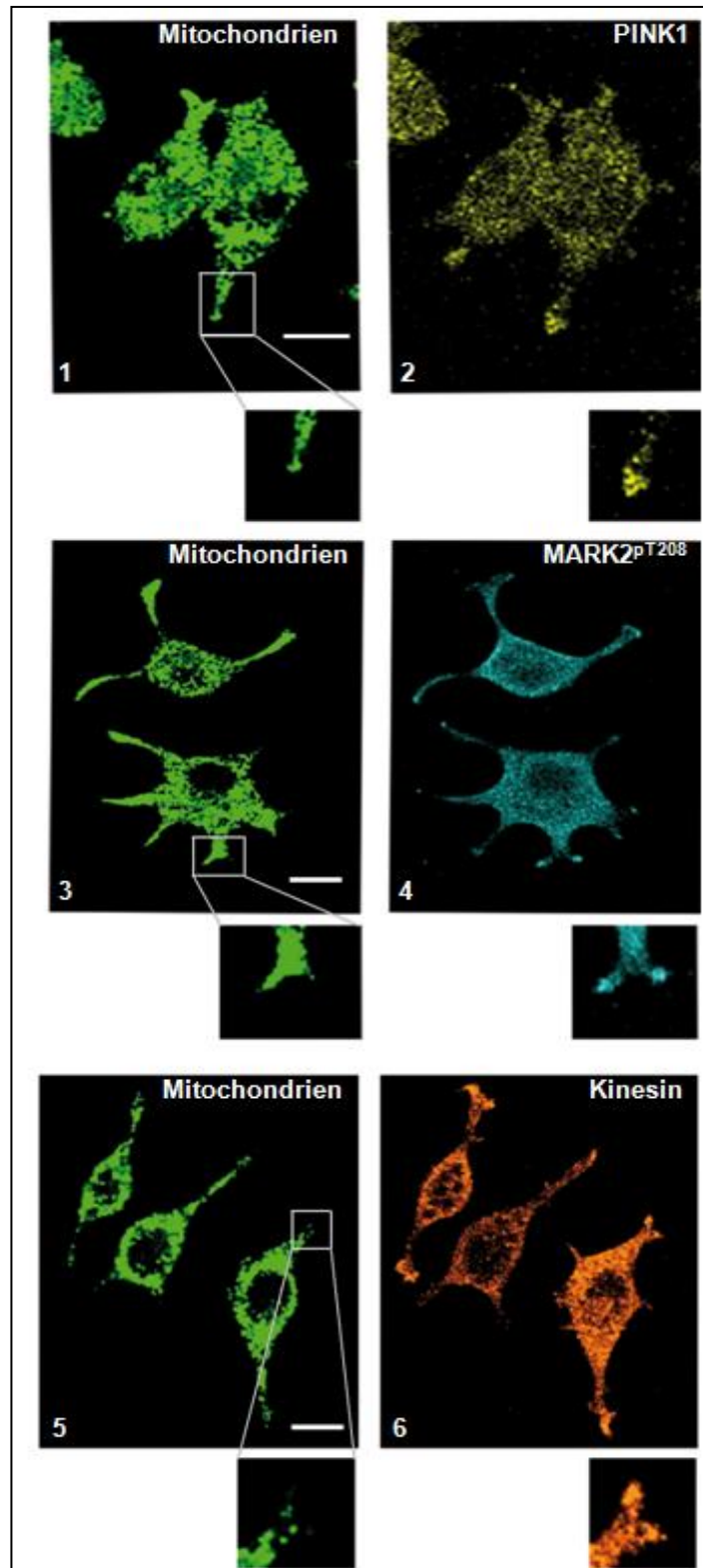


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von endogener PINK1, endogener aktiver MARK2^{pT208} und endogenem Kinesin. PC12-Zellen wurden nach ihrer Differenzierung (15 h NGF) gefärbt gegen endogene PINK1 (gelb, Bild 2), aktive MARK2^{pT208} (cyan, Bild 4), endogenes Kinesin (orange, Bild 6) und Mitochondrien (grün, Bild 1,3 und 5). In den Vergrößerungen wird deutlich, dass sich alle drei Proteine vor allem in den Spitzen der Wachstumskegel anhäufen und die Mitochondrien kurz dahinter lokalisiert sind. Maßstab: 10 μ m

Diese Proteinverteilung in den Zellen deutet ebenso wie der beobachtete Transportstopp in den retinalen Ganglienzellen auf einen selektiven Transporteffekt durch Δ N-PINK1 und MARK2 hin. Es sollte daher geprüft werden, ob dieser Transporteffekt durch die Phosphorylierung der schweren Kette des Kinesins erklärt werden kann. Dafür wurde die schwere Kette des Kinesins 5C, welches mit dem Mitochondrientransport assoziiert ist, in einen pGEX-Vektor kloniert, so dass ein GST-Fusionsprotein in *E.coli* hergestellt werden konnte. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend allein, zusammen mit Δ N-PINK1-GST, MARK2^{T208E}-His oder in Kombination mit beiden unter Einfluss von ³²P inkubiert. Im Autoradiogramm der durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine zeigte sich im dreimalig durchgeführten Versuch keine Phosphorylierung des Kinesins.

5.3.8 Mutation von T313 zu Met oder Glu in PINK1 ist toxisch für CHO und Cortex-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PINK1 und MARK2 einen Einfluss auf den Transport von Mitochondrien haben und dass PINK1 und MARK2 phosphorylierungsabhängig miteinander interagieren, sollte beobachtet werden, welchen Effekt die Mutation der MARK2 Phosphorylierungsstelle T313 auf Zellen hat.

Für die Transfektion von primären Cortex-Zellen sollten dafür entsprechende Adenoviren hergestellt werden. Einerseits sollte eine T313M-Mutante hergestellt werden, welche an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden kann und der Parkinson-Mutation entspricht. Andererseits sollte eine Phosphorylierungsmutante PINK1 T313E produziert werden. Bereits die Herstellung der Adenoviren (freundlicherweise produziert und zur Verfügung gestellt von Dr. J. Biernat), deren Amplifizierung in 293-Zellen erfolgt, gestaltete sich als schwierig. Die Zellen produzierten entweder nur sehr geringe Mengen des Virus oder starben.

Lediglich von dem Konstrukt ΔN -PINK1^{T313M} konnte eine geringe Menge Virus hergestellt werden. Gerade eben so viel, dass damit für einen Versuch primäre Cortex-Zellen infiziert werden konnten. In der Immunfluoreszenz der infizierten Cortex-Zellen zeigt sich, dass nur ganz wenige infizierte Zellen zu finden sind und diese erscheinen nur noch als Klumpen. Die Neuriten sind vollständig zurückgebildet oder abgebaut und die Mitochondrien sind akkumuliert (Abb. 24A). Es wurde im Folgenden versucht CHO-Zellen mit den verschiedenen PINK1-Mutanten zu transfizieren. Hierbei zeigte sich in mit ΔN -PINK1^{T313M}-transfizierten CHO-Zellen ein ähnliches Bild wie in den Cortex-Zellen – stark verklumpte Mitochondrien (Abb. 24B, 1-3, weiße Pfeile). Ein anderes Bild erhielt

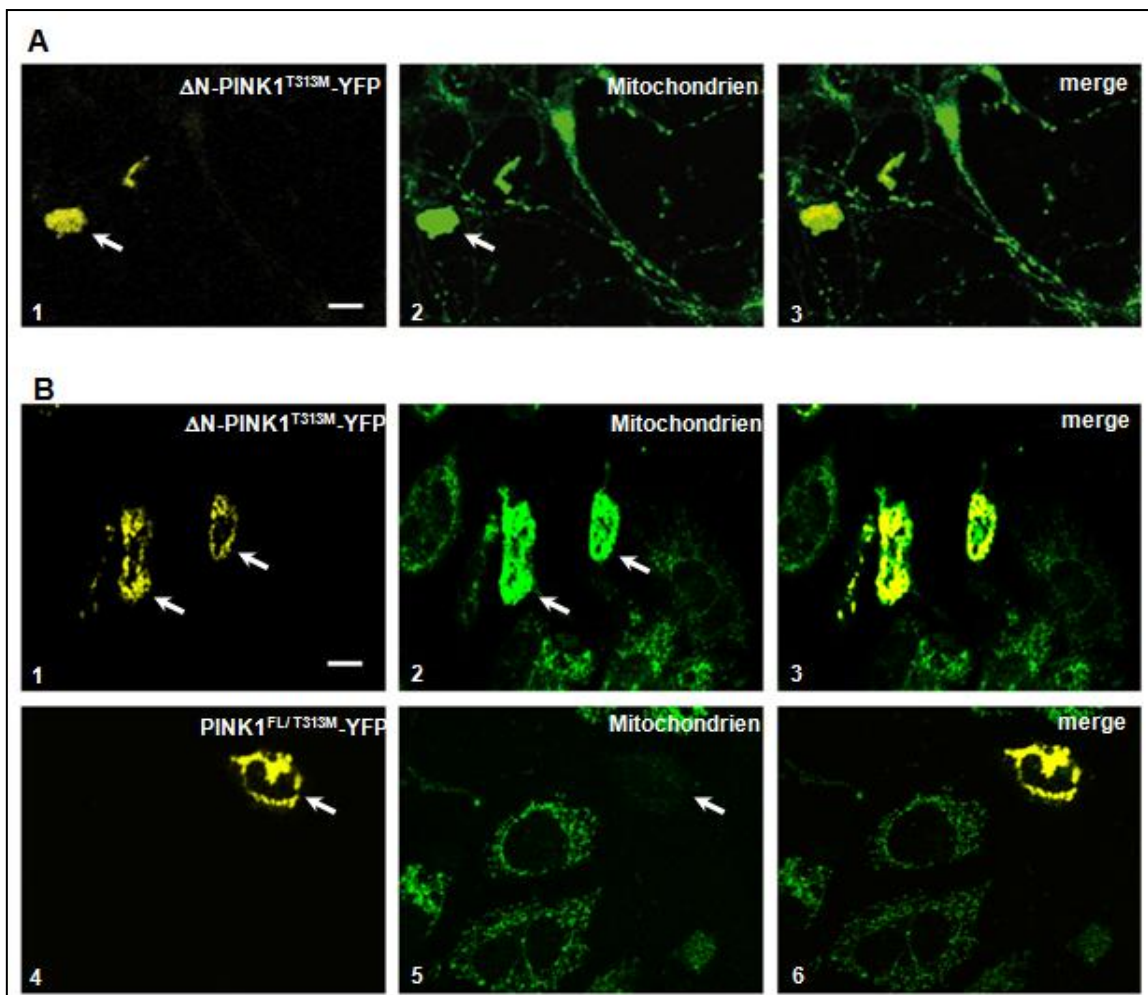


Abbildung 24: T313M-Mutation von ΔN -PINK1 und PINK1^{FL} ist toxisch für primäre Ratten Cortex-Zellen und CHO-Zellen. (A) Verteilung der Mitochondrien in primären Ratten Cortex-Zellen nach adenoviraler Transfektion von ΔN -PINK1^{T313M}. Zellen zeigen keine Neuriten und starke Akkumulation der Mitochondrien im Zell-Soma (Bild 2, weißer Pfeil). (B) Verteilung von ΔN -PINK1^{T313M} und PINK1^{FL/T313M} sowie Mitochondrien in Taxol-stabilisierten CHO-Zellen. Die Zellen sind klein und die Mitochondrien akkumulieren im Fall der ΔN -PINK1^{T313M}-Mutante (Bild 2, weiße Pfeile) oder werden degradiert im Fall der PINK1^{FL/T313M}-Mutante (Bild 5, weiße Pfeile). Maßstab: 10 μ m

man, wenn die Zellen mit PINK1^{FL/T313M} transfiziert wurden. Hier konnte nur noch anhand der YFP-Fluoreszenz die transfizierte Zelle identifiziert werden – die Mitochondrien hingegen werden offenbar abgebaut (Abb. 24B, 4-6, weiße Pfeile).

CHO-Zellen, welche mit Δ N-PINK1^{T313E} transfiziert wurden, zeigten gar keine transfizierten Zellen – vermutlich weil die Zellen bereits abgestorben waren.

Zusammenfassend kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass sich sowohl die fehlende Möglichkeit zur Phosphorylierung in PINK1 an T313, als auch Phosphorylierungsmutation an dieser Stelle toxisch auf die Zellen auswirkt.

5.4 Identifizierung neuer PINK1 Interaktionspartner

5.4.1 Hefe-2-H-Screen einer fötalen menschlichen Gehirn cDNS-Bank

Eine weit verbreitete Methode zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern ist der Hefe-2-H Screen (4.3.3). Hiermit war es möglich eine fötale menschliche Gehirn cDNS-Bank nach potentiellen Bindungspartnern zu durchmustern. Als Köder-Protein diente die Kinase-Domäne von PINK1 (AS 156 – 511) im pGBKT7 Vektor, welche freundlicher Weise von Dr. D. Matenia (MPASMB) zur Verfügung gestellt wurde. Zu Beginn der Arbeit waren keine „downstream“ Interaktionspartner der Kinase PINK1 bekannt. PINK1-156-511_pGBKT7 wurde zusammen mit der cDNS-Bank in kompetente Hefen des Stammes AH109 transformiert und diese anschließend auf -Leu/-Trp/-His/+Ade-Selektionsplatten ausgestrichen.

Die erzielte Transfektionseffizienz betrug $1,2 \times 10^3$ cfu/ μ g cDNS und liegt damit noch im optimalen Bereich von $1-10 \times 10^3$ cfu/ μ g cDNS.

Die verwendete fötale menschliche Gehirn cDNS-Bibliothek bestand aus 3×10^6 unabhängigen Klonen, von denen im durchgeführten Screen 6×10^5 Klone durchmustert werden konnten. Die Klone, die sich nach weiterer Analyse als eindeutig positiv erwiesen, wurden mittels DNS Sequenzierung und Vergleich mit der NCBI Datenbank (BLAST) identifiziert (4.3.3.3.4). Die wesentlichen Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht der im Hefe-2-H-Screen mit PINK1¹⁵⁶⁻⁵¹¹ (Kinasedomäne) gefundenen Interaktionspartner.

| Zelllokalisierung | Proteintyp | Protein | Funktion | NCBI |
|---------------------------|----------------------|--|---|--|
| zytoplasmatische Proteine | Transkriptionsfaktor | RNF216, Ring Finger Protein 216 | Inhibition des TNF- und IL1-induzierten NF-kappa B Signalweges; evt. Funktion als E3 Ubiquitin Ligase | NM_207111.3 und NM_207116.2 |
| | Enzym | AMPD2, Adenosin Monophosphat Deaminase 2 | Deaminierung von AMP in IMP im Purin-Stoffwechsel | NM_004037.6, NM_139156.2 und NM_203404.1 |
| | | CRYL1, Crystallin, lambda 1 | Enzym im alternativen Glucose-Metabolismus | NM_015974.2 |
| | | LSS, Lanosterol Synthase | Biosynthese von Cholesterol, Steroid-Hormonen und Vitamin D | NM_001001438.2, NM_001145436.1, NM_001145437.1 und NM_002340.5 |
| | | PHGDH, Phosphoglycerat Dehydrogenase | Serin-Biosynthese | NM_006623.3 |
| | | PYGB, Glycogen Phosphorylase | Glycogen Degradation v.a. im Gehirn | NM_002862.3 |
| | | SGSH, N-Sulfoglucosamin Sulfohydrolase | lysosomale Heparan Sulfat Degradation | NM_00199.3 |
| | | USP21, Ubiquitin Spezifische Peptidase 21 | Protein-Degradation | NM_001014443.2 und NM_012475.4 |
| | andere | DVL2, dishevelled, dsh Homolog 2 | Signaltransduktion im Wnt-Signalweg | NM_004422.2 |
| | | ATN1, Athrophin 1 | Protein-Bindung, Entwicklung des Nervensystems | NM_001007026.1 und NM_001940.3 |
| Kernproteine | Transkriptionsfaktor | CUX1, cut-like homeobox 1 | DNA-Bindeprotein, Regulation der Gen-Expression, Morphogenese und Differenzierung | NM_181500.1 und NM_181552.2 |
| | | MTA1, metastasis associated 1 | Chromatin Umstrukturierung | NM_004689.3 |
| | | ZFP36L1, Zink Finger Protein 36, C3H type like 1 | Regulation von Wachstumsfaktoren | NM_004926.2 |
| | | ZNF74, Zink Finger Protein 74 | unbekannt | NM_003426.2 |
| | RNA-Spleißen | SRSF9, Serin/Arginin-rich Spleiß-Faktor 9 | Teil des mRNA-Spleißosoms | NM_003769.2 |
| Mitochondriale Proteine | | COX5B, Cytochrom C Oxidase Untereinheit 5B | Regulation der Cytochrom C Oxidase | NM_001862.2 |
| | | MRPL30, Mitochondriales ribosomales Protein L30 | Mitochondrien Proteinsynthese | NM_145212.2 |
| Membranproteine | Ionenkanal | GRIK5, Glutamat-Rezeptor, Ionotroph, Kainate 5 | Glutamat-gebundener Ionenkanal | NM_002088.3 |
| | Transmembranprotein | TMEM14A, Transmembranprotein 14A | unbekannt | NM_14051.3 |
| | | TSPAN7, Tetraspanin 7 | vermittelt Signaltransduktion, Regulation von Zell- und Neuriten-Wachstum | NM_004615.3 |
| | | ITGAE, Integrin alpha E | E-Cadherin-bindendes Integrin, Adhäsionsfunktion, Hilfsmolekül für IEL-Aktivierung | NM_002208.4 |
| andere | | EIF3F, eukaryotischer Translations Initiations Faktor 3, Untereinheit F | Translations Initiation? | NM_003754.2 |
| | | LRP3, Lipoprotein, Rezeptorverwandtes Protein 3 | unbekannt | NM_002333.3 |
| | | MAGED1, Melanom Antigen Familie D, 1 | im p75 Neutrophin Rezeptor vermittelten Apoptose Signalweg | NM_001005332.1, NM_001005333.1 und NM_006986.3 |

5.4.2 Identifizierte Hefe-2-H-Screen-Klone

Die Auswertung der positiven Klone des Hefe Zwei-Hybrid Screens ergab ein sehr breites Spektrum an möglichen neuen Bindungspartnern von PINK1 (Tab. 3).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine genauere Untersuchung der Bindung von PINK1 an die Untereinheit 5B der Cytochrom-c-Oxidase erfolgen. Dies schien aus folgenden Gründen von Interesse. Zum einen wurde bereits gezeigt, dass PINK1 unter anderem bei der Regulation der mitochondrialen Atmungskette mitwirkt, wobei hier besonders gut erforscht ist, dass PINK1 einen Einfluss auf den Komplex I, NADH-Hydrogenase, der Atmungskette hat (Liu et al. 2009). Ein Zusammenhang mit der Cytochrom-c-Oxidase wurde aber ebenfalls mehrfach festgestellt. Weiterhin wird die Cytochrom-c-Oxidase mit der Alzheimerschen Erkrankung in Verbindung gebracht (Pérez-Garcia et al. 2008) und letztlich wurde in Mausmodellen gezeigt, dass MARK2 auch im Zellmetabolismus eine Rolle zukommt (Hurov und Piwnica-Worms 2007).

Es galt daher zu untersuchen, inwieweit alle drei Proteine, PINK1, MARK2 und COX5B in einem Zusammenhang stehen könnten und welche zellulären Konsequenzen eine Interaktion dieser Proteine haben könnte.

Der im Hefe-2-H Screen gefischte Klon umfasste das vollständige COX5B-Gen. Für die weiterführenden Arbeiten wurde der gefischte Klon mittels PCR in verschiedene Vektoren subkloniert (Kapitel 4.1.1).

5.5 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2, PINK1 und COX5B

5.5.1 Kartierung der Interaktionsdomänen von PINK1 und COX5B im direkten 2-H-Test

Nachdem COX5B als Interaktionspartner der PINK1-Kinasedomäne (AS:156-511) gefunden worden war, sollte in einem direkten Hefe-2-H-Test diese Interaktion bestätigt werden. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die Interaktion auch mit dem vollständigen PINK1^{FL} möglich ist. Es wurden daher drei PINK1-Konstrukte (ebenfalls freundlicherweise von Dr. D. Matenia

(MPASMB) zur Verfügung gestellt) für den Gegentest gewählt, PINK1^{FL}, PINK1 156-511 und Δ N-PINK1. Im direkten 2-Hybrid-Test konnte die stärkste Interaktion mit der katalytischen Domäne/Kinasedomäne (PINK1 156-511) bestätigt werden. Aber auch mit dem vollständigen PINK1^{FL} Protein konnte eine Interaktion nach-gewiesen werden, wenngleich diese deutlich schwächer war (Abb. 25).

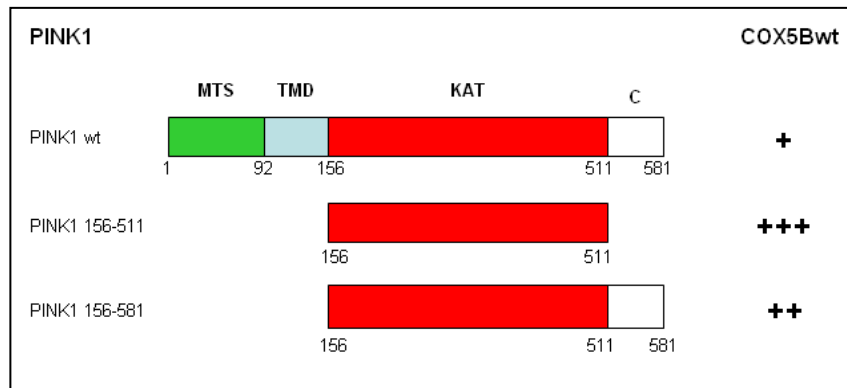


Abbildung 25: Kartierung der Interaktionsdomäne von PINK1 mit COX5B mittels direktem Hefe-2-H-Test. Schematische Darstellung der PINK1-Domänen und Darstellung der Interaktionsstärke: - keine Interaktion, + schwache Interaktion, ++ starke Interaktion, +++ sehr starke Interaktion.

5.5.2 Kartierung der Interaktionsdomänen von MARK2 und COX5B im direkten 2-H-Test

Ein direkter Hefe-2-H-Test von COX5B mit MARK2 erschien aus zwei Gründen sinnvoll. Einerseits wurde bereits eine direkte Interaktion zwischen PINK1 und MARK2 gezeigt, wobei auch eine Aktivierung der Kinaseaktivität von PINK1 durch MARK2 nachgewiesen werden konnte. Andererseits konnte im Rahmen dieser Arbeit auch eine Assoziation von MARK2 mit Mitochondrien ermittelt werden. Vor dem Hintergrund, dass MARK2 am Zellmetabolismus mitwirkt (Hurov und Piwnica-Worms 2007) lag somit der Schluss nahe, dass die Interaktion der drei Proteine PINK1, MARK2 und COX5B einen Einfluss auf die Regulation der Cytochrom-c-Oxidase haben könnte.

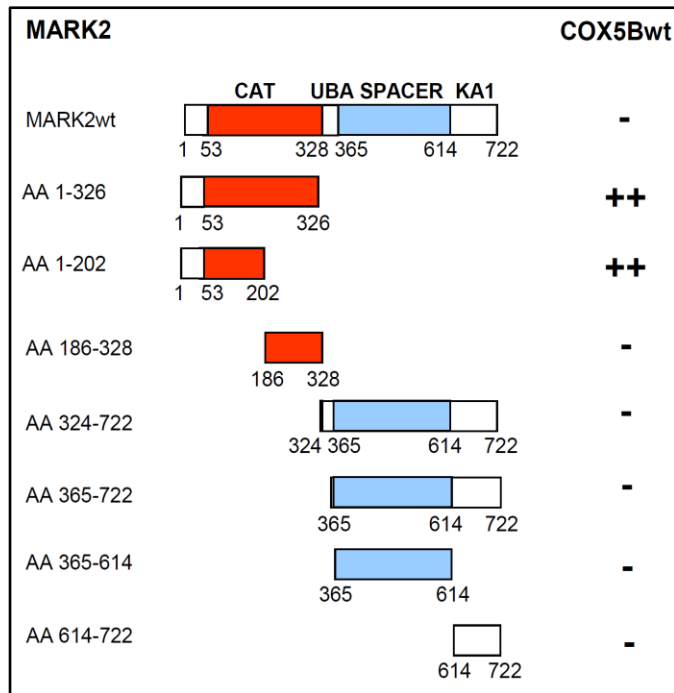


Abbildung 26: Kartierung der Interaktionsdomäne von MARK2 mit COX5B mittels direktem Hefe-2-H-Test. Schematische Darstellung der MARK2-Domänen und Darstellung der Interaktionsstärke: - keine Interaktion, + schwache Interaktion, ++ starke Interaktion, +++ sehr starke Interaktion.

Im direkten 2-Hybrid-Test wurden Konstrukte der verschiedenen MARK2-Domänen (ebenfalls von Dr. D. Matenia zur Verfügung gestellt) auf ihre Interaktion mit COX5B getestet. Dabei ergab sich, dass die Bindung mit der katalytischen Domäne erfolgt, wobei offenbar der N-terminale Teil dieser Domäne von Bedeutung ist, da die Aminosäuren 186-328 nicht mit COX5B interagieren.

Außerdem scheinen Spacer- und KA1-Domäne die Bindung eher zu stören, da mit diesen allein keine Wechselwirkung

stattfinden und auch das vollständige MARK2-Protein nicht binden kann (Abb. 26).

Insgesamt kann gesagt werden, dass sowohl PINK1 als auch MARK2 an COX5B binden, diese Interaktion aber jeweils über die katalytischen Domänen erfolgt. Die vollständigen Proteine müssen für eine erfolgreiche Bindung möglicherweise in einer offenen Konformation vorliegen, da ansonsten keine oder nur eine schwache Wechselwirkung möglich ist.

5.5.3 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen PINK1 und COX5B sowie MARK2 und COX5B

Die oben festgestellte Interaktion zwischen PINK1, MARK2 und COX5B sollte auch biochemisch gezeigt werden. Dieser Nachweis erwies sich in mehrfacher Hinsicht als schwierig. Zunächst konnten für eine Koimmunopräzipitation in 293- oder CHO-Zellen keine ausreichenden Expressionslevel der Proteine erreicht werden, sodass auch die anschließende KOIP fehlschlug. Um die niedrigen Expressionsniveaus zu umgehen, wurden daraufhin aufgereinigte Proteine für die KOIP verwendet. Hierbei ergab sich das Problem, dass falsch positive Bindungen über die verwendeten Antikörper auftraten.

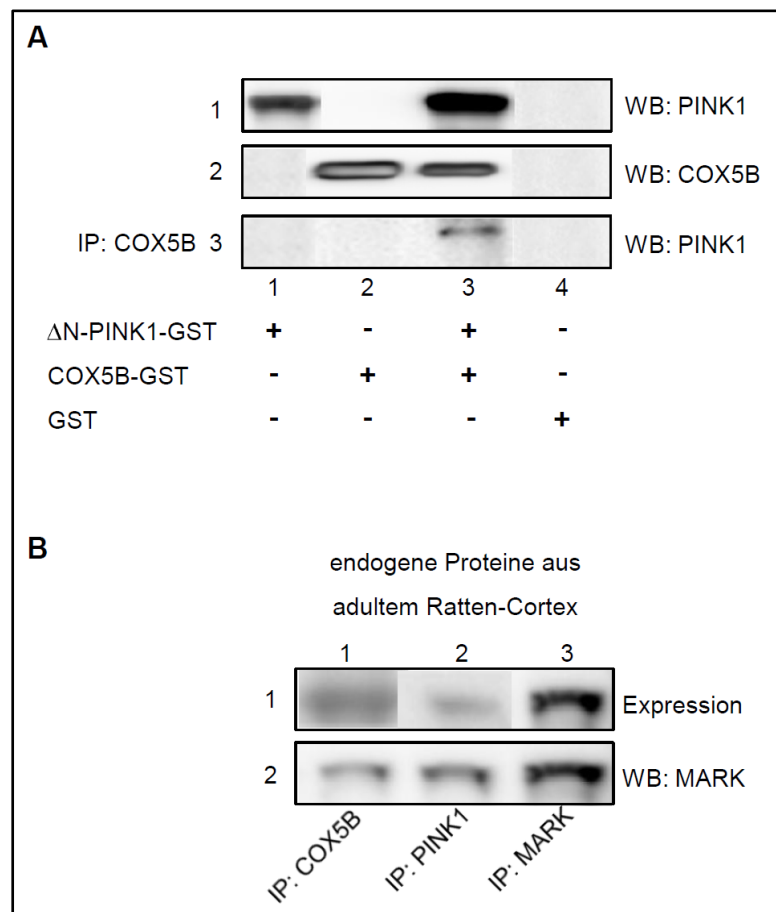


Abbildung 27: COX5B interagiert mit PINK1 und MARK. (A) Immunpräzipitation der aufgereinigten Proteine Δ N-PINK1-GST und COX5B-GST. Zeile 1 und 2 zeigen die Lysate nach Detektion mit anti-PINK1 bzw. anti-COX5B-AK. Zeile 3 zeigt in Spur 3 PINK1, welches mit COX5B immunpräzipitiert wurde. (B) Immunpräzipitation endogener Proteine aus adultem Ratten-Cortex. Zeile 1 zeigt die Expression von COX5B, PINK1 und MARK. Zeile 2 zeigt MARK, welches in Spur 1 mit COX5B und in Spur 2 mit PINK1 immunpräzipitiert wurde.

In Abb. 27A konnte dennoch die Bindung zwischen Δ N-PINK1 und COX5B nachgewiesen werden, nachdem nach der Immunpräzipitation mit COX5B im Westernblot Δ N-PINK1 gezeigt werden konnte. In der hier verwendeten Antikörper/Protein-Kombination traten keine falsch positiven Bindungen auf. Da über die aufgereinigten Proteine mit MARK2 in allen Antikörper/Proteinkombinationen falsch positive Bindungen auftraten und die zelluläre Expression, wie bereits erwähnt, zu gering war, wurde schließlich versucht, endogene Proteine aus adultem Rattenhirn zu isolieren und diese für eine KOIP zu verwenden. Die Expression von MARK2 im Rattenhirn erwies sich dabei als gut, wohingegen PINK1 und COX5B nur schwach exprimiert waren, daher wurde der Westernblot-Nachweis über MARK2 geführt, nachdem jeweils eine IP mit COX5B, PINK1 und MARK2 durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnte die Bindung von MARK2 sowohl an COX5B als auch an PINK1 gezeigt werden (Abb. 27B; Spur 1 und 2)

5.5.4 PINK1 und aktive MARK2 kolokalisieren mit COX5B an Mitochondrien

Im Folgenden sollte endogen in PC12-Zellen die Lokalisation von COX5B im Vergleich zu PINK1 und MARK2 untersucht werden. Da es sich bei COX5B um ein mitochondriales Protein handelt, wurden parallel Mitochondrien angefärbt. Es zeigt sich, dass COX5B erwartungsgemäß punktiert auftritt und dabei mit Mitochondrien kolokalisiert. In Abb. 28A, 2 ergibt die Anfärbung von PINK1 ebenfalls ein vesikuläres, mitochondrienassoziiertes Muster, so dass auf eine Kolokalisation und nach den obigen Ergebnissen auf eine Interaktion von PINK1 und COX5B an Mitochondrien geschlossen werden kann. Die Anfärbung von MARK2 weist eine recht gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung auf (Daten nicht gezeigt). Hingegen ergab sich für phosphorylierte MARK (MARK2^{pT208}) neben der zytoplasmatischen Lokalisation auch eine verstärkte Assoziation mit Mitochondrien und somit eine Kolokalisation mit COX5B (Abb. 28B).

Insgesamt bestätigt die Immunfluoreszenz der endogenen Proteine PINK1, MARK2^{pT208} und COX5B die in Kapitel 5.5.2 und 5.5.3 festgestellte Interaktion

dieser drei Proteine. Zusätzlich kann geschlossen werden, dass die Interaktion mitochondrienassoziiert ist und im Falle von MARK2 und COX5B offenbar von der MARK2-Phosphorylierung abhängig ist.

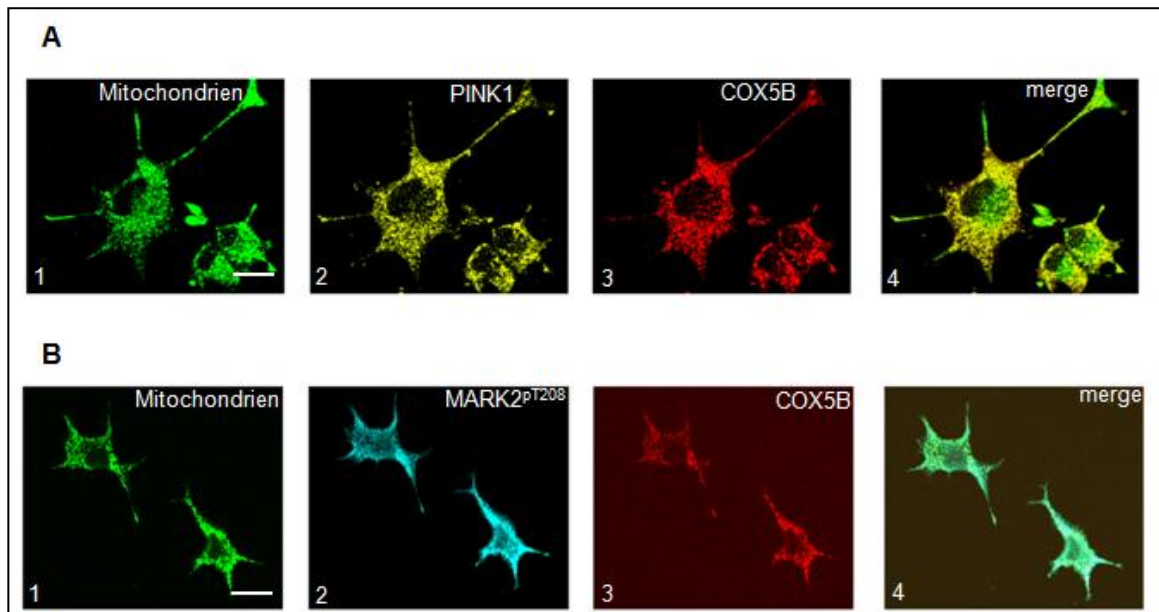


Abbildung 28: PINK1 und endogen aktive MARK2^{pT208} kolokalisieren mit COX5B an Mitochondrien. (A) PC12 Zellen, 48 h mit NGF differenziert, wurden anschließend mit anti-PINK-AK (FITC/gelb) und anti-COX5B-AK (TRITC/rot) und Mitochondrien-Farbstoff (Cy5, grün) angefärbt. PINK1 und COX5B zeigen beide ein gesprenkeltes Muster im Zellsoma und den Zellausläufern, welches weitgehend dem Färbungsmuster der Mitochondrien entspricht. (B) 48 h differenzierte PC12-Zellen, angefärbt mit anti-MARK2^{pT208}-AK (FITC/cyan), anti-COX5B-AK (TRITC/rot) und Mitochondrienfarbstoff (Cy5/grün). MARK2^{pT208} zeigt neben einer gleichmäßigen zytoplasmatischen auch eine gesprenkelte Färbung, welche mit Mitochondrien und COX5B kolokalisiert. Maßstab: 10 µm

5.6 MARK2 phosphoryliert COX5B – PINK1 hemmt die COX5B-Phosphorylierung

5.6.1 Test einer phosphorylierungsabhängigen Interaktion zwischen MARK2, PINK1 und COX5B

Da es sich bei PINK1 und MARK2 um Kinasen handelt und für COX5B bereits eine phosphorylierungsabhängige Interaktion mit PKA (Yang et al., 1998, Kadenbach et al. 2000) gezeigt wurde, sollte die Annahme geprüft werden, ob auch die Interaktion zwischen MARK2, PINK1 und COX5B phosphorylierungsabhängig ist. Zudem konnte im vorigen Kapitel gezeigt werden, dass vor allem die phosphorylierte Form von MARK2 mit Mitochondrien und COX5B kolokalisiert. Da bereits nachgewiesen wurde, dass PINK1 und vor

allein die katalytische Domäne von PINK1, durch MARK2 phosphoryliert und aktiviert wird (Matenia et al. 2011; eingereicht), wurde zunächst davon ausgegangen, dass COX5B in einer Phosphorylierungsreihe mit PINK1 und MARK2 liegt, d.h. dass COX5B durch MARK2-aktivierte PINK1 phosphoryliert wird.

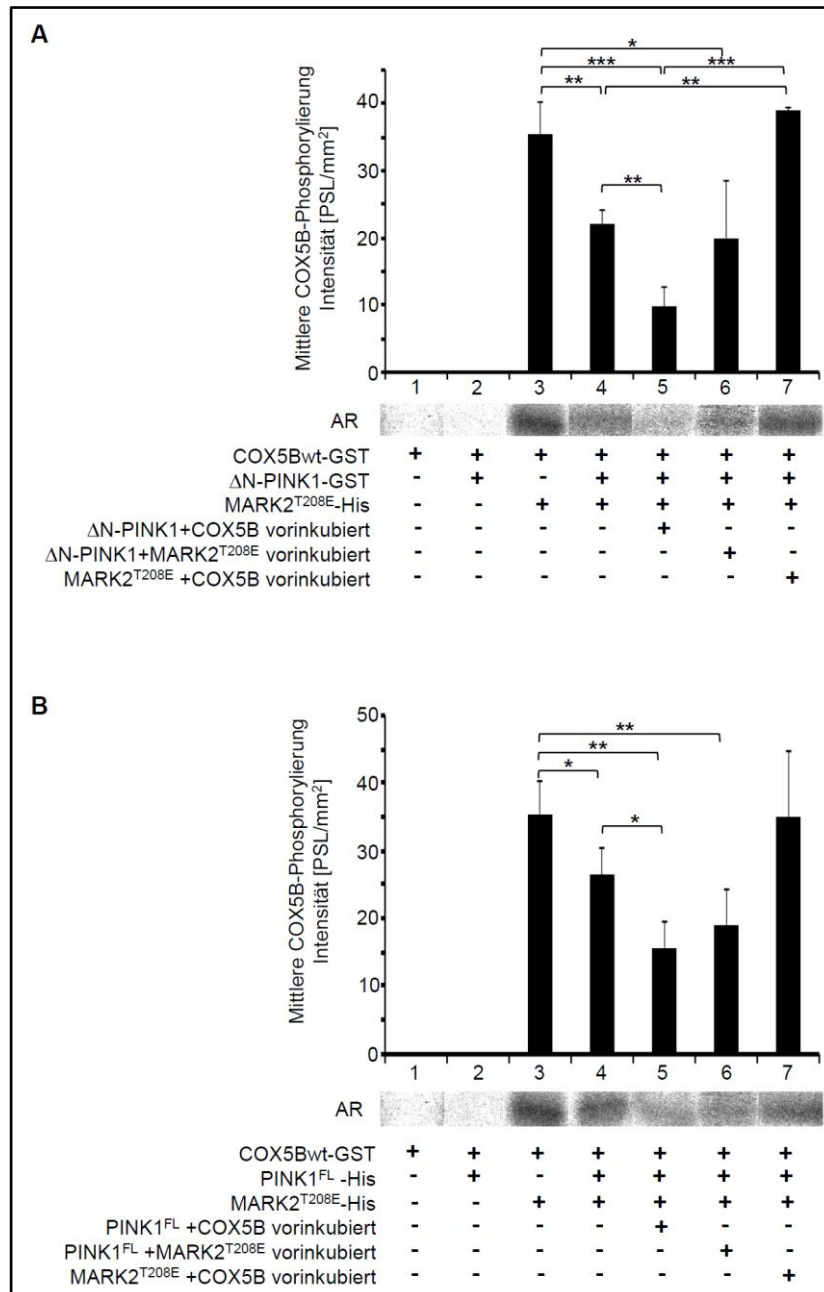


Abbildung 29: MARK2^{T208E} phosphoryliert COX5B - PINK1^{FL} und Δ N-PINK1 hemmen die Phosphorylierung. (A) Das Autoradiogramm (AR) zeigt die Phosphorylierung von COX5B durch MARK2^{T208E} (Spur 3). COX5B wird nicht autophosphoryliert (Spur 1) und Δ N-PINK1 kann COX5B nicht phosphorylieren (Spur 2). Δ N-PINK1 hemmt die Phosphorylierung von COX5B durch MARK2^{T208E} (Spur 4-6). Die Quantitative Auswertung zeigt, dass Δ N-PINK1 die COX5B-Phosphorylierung am stärksten hemmt, wenn sie vorher an COX5B binden kann (vgl. Balken 5 mit Balken 4), aber keinen Einfluss mehr hat, wenn COX5B bereits phosphoryliert wurde (Balken 7). (B) Entsprechende Auswertung wie in (A), aber unter Verwendung von PINK1^{FL}. Es zeigt sich der gleiche Effekt wie mit Δ N-PINK1, allerdings abgeschwächt. Messwerte sind Mittelwerte \pm SE. Signifikante Unterschiede sind dargestellt ($p < 0.05$, $n \geq 3$, Fischer Test)

Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Weder Δ N-PINK1 noch PINK1^{FL} phosphorylieren COX5B (Abb. 29A, B; jeweils Balken 2). Hingegen wird COX5B durch MARK2^{T208E} phosphoryliert (Abb. 29A, B; jeweils Balken 3) und entgegen der obigen Annahme wird diese Phosphorylierung besonders durch Δ N-PINK1 inhibiert (Abb. 29A; Balken 4). Da diese Inhibition einerseits darin begründet sein kann, dass PINK1 und COX5B um die Phosphorylierung durch MARK2 konkurrieren, andererseits aber auch PINK1 durch seine Bindung an COX5B dessen Phosphorylierung hemmen könnte, wurden die drei Proteine anschließend in unterschiedlichen Reihenfolgen vorinkubiert. Dabei kann eine deutliche Reduktion der COX5B-Phosphorylierung beobachtet werden, wenn COX5B vor der Phosphorylierung durch MARK2^{T208E} für 1 h mit Δ N-PINK1 oder mit PINK1^{FL} vorinkubiert wird (Abb. 29A, B; jeweils Balken 5), wobei dieser Effekt für Δ N-PINK1 stärker ist als für PINK1^{FL}. Diese Reduktion ist außerdem signifikant stärker, als bei einer gleichzeitigen Inkubation aller Komponenten (Abb. 29A, B; jeweils Balken 4) bzw. einer Vorinkubation von Δ N-PINK1/PINK1^{FL} mit MARK2^{T208E} (Abb. 29A, B; jeweils Balken 6). Umgekehrt kann die Inhibition durch PINK1 vollständig aufgehoben werden, wenn zunächst COX5B für 1 h mit MARK2^{T208E} vorinkubiert wird und erst anschließend Δ N-PINK1 bzw. PINK1^{FL} hinzugegeben wird (Abb. 29A, B; jeweils Balken 7). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl Δ N-PINK1 als auch PINK1^{FL} durch ihre Bindung an COX5B dessen Phosphorylierung durch MARK2^{T208E} hemmen können. Sie zeigen aber auch, dass diese Inhibition durch Δ N-PINK1 deutlich stärker ist, als durch PINK1^{FL}.

5.6.2 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in COX5B

Die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in COX5B erfolgte wie schon die Bestimmung in Δ N-PINK1 in den vier Schritten: Kinaseassay, chymotryptischer Verdau, zweidimensionaler Chromatographie und massenspektrometrischer Analyse. Im Unterschied zur Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von Δ N-PINK1, sollte im Fall von COX5B aber zusätzlich der Einfluss von Δ N-PINK1 auf die Phosphorylierung von COX5B durch MARK2^{T208E} berücksichtigt werden.

Aus diesem Grund wurden zwei parallele Versuche durchgeführt, wobei für den einen Versuch im Kinaseassay COX5B ausschließlich mit MARK2^{T208E} phosphoryliert wurde. In dem zweiten Ansatz wurde COX5B vor der Phosphorylierung durch MARK2^{T208E} für 1 h mit Δ N-PINK1 inkubiert.

Nach Durchführung des Kinaseassays wurden die Proteine mittels SDS-Gel-Elektrophorese getrennt und die Banden bei 40 kDa, welche dem COX5B-GST entsprechen, aus dem Gel ausgeschnitten. Die Radioaktivität der Proteinbanden, gemessen in Counts, wurde am Szintillationsmessgerät bestimmt und für die Berechnung (siehe Kasten) des Einbaus von ³²P in COX5B verwendet. Danach ergab sich ein Einbau von 0,626 mol ³²P/mol COX5B-GST, wenn COX5B direkt von MARK2^{T208E} phosphoryliert wurde. Hingegen wurde nur ein Einbau von 0,1288 mol ³²P/mol COX5B-GST erreicht, wenn COX5B vor der Phosphorylierung mit Δ N-PINK1 inkubiert wurde. Auch hier bestätigt sich somit die Inhibition der COX5B-Phosphorylierung durch Δ N-PINK1.

| | | |
|---|--|--|
| Berechnung des Einbaus von ³² P in COX5B-GST ohne Einfluss von PINK1: | | |
| Messung Counts Probe: 10276 dps | | |
| Messung Counts eingesetztes ³² P: 3700000 dps | | |
| Eingesetztes „kaltes“ ATP: 1,0x10 ⁻⁷ mol | | |
| Eingesetzte Menge COX5B-GST: 4,44x10 ⁻¹⁰ mol | | |
| Einbau mol ³² P: | $\frac{1,0 \times 10^{-7} \text{ mol ATP} \times 10276 \text{ dps}}{3700000 \text{ dps}}$ | = 2,78 x 10 ⁻¹⁰ mol ³² P |
| Pro Mol COX5B-GST eingebautes ³² P: | $\frac{2,78 \times 10^{-10} \text{ mol } ^{32}\text{P}}{4,44 \times 10^{-10} \text{ mol COX5B-GST}}$ | = 0,626 mol ³² P/mol COX5B-GST |
| Berechnung des Einbaus von ³² P in COX5B-GST unter Einfluss von PINK1: | | |
| Messung Counts Probe: 2116 dps | | |
| Messung Counts eingesetztes ³² P: 3700000 dps | | |
| Eingesetztes „kaltes“ ATP: 1,0x10 ⁻⁷ mol | | |
| Eingesetzte Menge COX5B-GST: 4,44x10 ⁻¹⁰ mol | | |
| Einbau mol ³² P: | $\frac{1,0 \times 10^{-7} \text{ mol ATP} \times 2116 \text{ dps}}{3700000 \text{ dps}}$ | = 5,72 x 10 ⁻¹¹ mol ³² P |
| Pro Mol COX5B-GST eingebautes ³² P: | $\frac{5,72 \times 10^{-11} \text{ mol } ^{32}\text{P}}{4,44 \times 10^{-10} \text{ mol COX5B-GST}}$ | = 0,1288 mol ³² P/mol COX5B-GST |

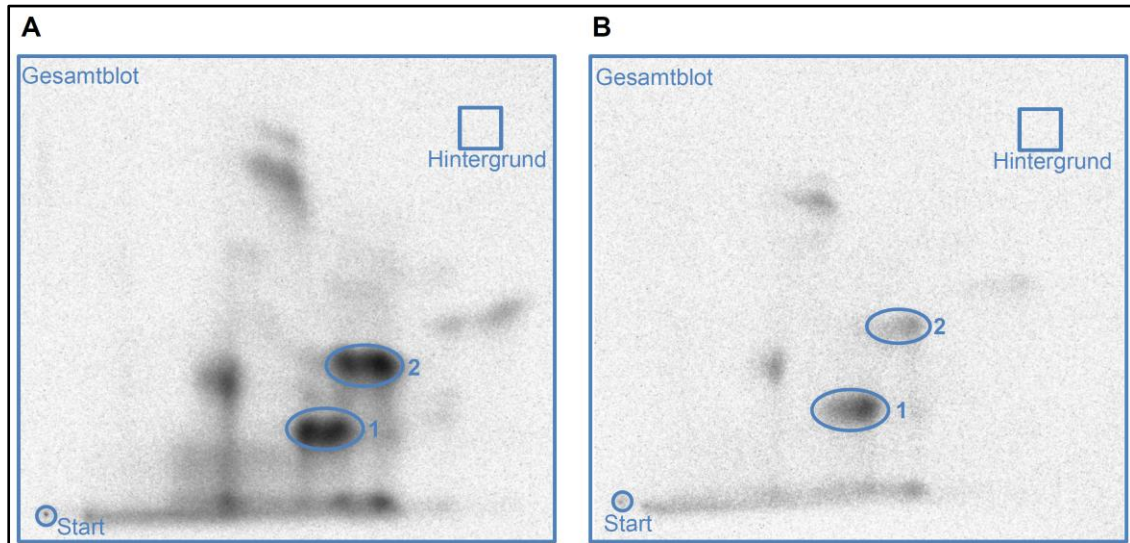


Abbildung 30: Phosphopeptidkarten für COX5B nach Phosphorylierung durch MARK2^{T208E}. (A) COX5B wurde direkt mit MARK2^{T208E} phosphoryliert und nach chymotryptischem Verdau zweidimensional aufgetrennt. In der Peptidkarte zeigen sich zwei Haupt-Spots. (B) COX5B wurde vor der Phosphorylierung durch MARK2^{T208E} mit ΔN-PINK1 inkubiert. Die Peptidkarte zeigt die gleichen Spots wie in (A), allerdings ist vor allem Spot 2 stark abgeschwächt.

Tabelle 4: Anteil der Phosphorylierung der Spots in den Phosphopeptidkarte. Intensitäten sind auf die Fläche des jeweiligen Spots bezogen. In Spalte 3 wurde der Hintergrund entsprechend der jeweiligen Fläche abgezogen.

| Bild | Feld | Intensität (PSL) | Intensität – Hintergrund (PSL) | % der Gesamt-Counts |
|---|-------------|------------------|--------------------------------|---------------------|
| A COX5B phosphoryliert durch MARK2 ^{T208E} | Startpunkt | 113,0 | 62,4 | 0,089 |
| | Gesamtblot | 194371,4 | 69825,8 | 100 |
| | Hintergrund | 560,5 | 0 | 0 |
| | 1 | 8508,7 | 7909,6 | 11,33 |
| | 2 | 11347,2 | 10390,9 | 14,88 |
| B COX5B 1h mit ΔN-PINK1 inkubiert, anschließend mit MARK2 ^{T208E} phosphoryliert | Startpunkt | 119,1 | 46,4 | 0,38 |
| | Gesamtblot | 119036,5 | 12061,0 | 100 |
| | Hintergrund | 380,4 | 0 | 0 |
| | 1 | 2863,1 | 2073,9 | 17,2 |
| | 2 | 1260,8 | 601,8 | 4,99 |

Die anschließende zweidimensionale Auftrennung der chymotryptischen Peptide wies für die direkte Phosphorylierung von COX5B ein Muster mehrerer „Spots“ auf, wobei zwei „Spots“ besonders hervorstechen. Spot 1 enthält dabei 11,33% und Spot 2 14,88% der Gesamtradioaktivität (siehe Tabelle 4 und Abb. 20A). Auch in der zweidimensionalen Auftrennung zeigte sich ein deutlicher Unterschied der direkt mit MARK2^{T208E} phosphorylierten COX5B (Abb. 30A) gegenüber der mit ΔN-PINK1 vorinkubierten COX5B (Abb. 30B). Zwar ergab sich ein ähnliches Muster an Spots, besonders aber der dem Spot 2 entsprechende Spot war in diesem Fall deutlich schwächer mit nur 4,99% der Gesamtradioaktivität. Außerdem wurden in diesem Ansatz nur 17% Gesamtradioaktivität gegenüber Ansatz A erreicht.

Die in den Spots aus Ansatz A enthaltenen Peptide wurden anschließend massenspektrometrisch bestimmt (Abb. 31 und Tab. 5). In Spot 1 konnte ein Peak identifiziert werden, welcher den Aminosäuren 225-230 des doppelt phosphorylierten GST-COX5B entspricht. In diesem Peptid gehört S226 dabei zu GST und S229 entspricht S3 in COX5B. In Spot 2 konnte ein weiterer Peak mit der Masse 1550,2 dem einfach phosphorylierten COX5B-Peptid 74-86 zugeordnet werden. Dieses Peptid enthält zwei mögliche Phosphorylierungsstellen, S81 und S83. Die übrigen Peaks beider Spots stammten entweder von unphosphorylierten Peptiden oder waren auch in der Leerkontrolle enthalten. Zusammenfassend kommen für COX5B als Phosphorylierungsstellen S3, S81 und S83 in Frage.

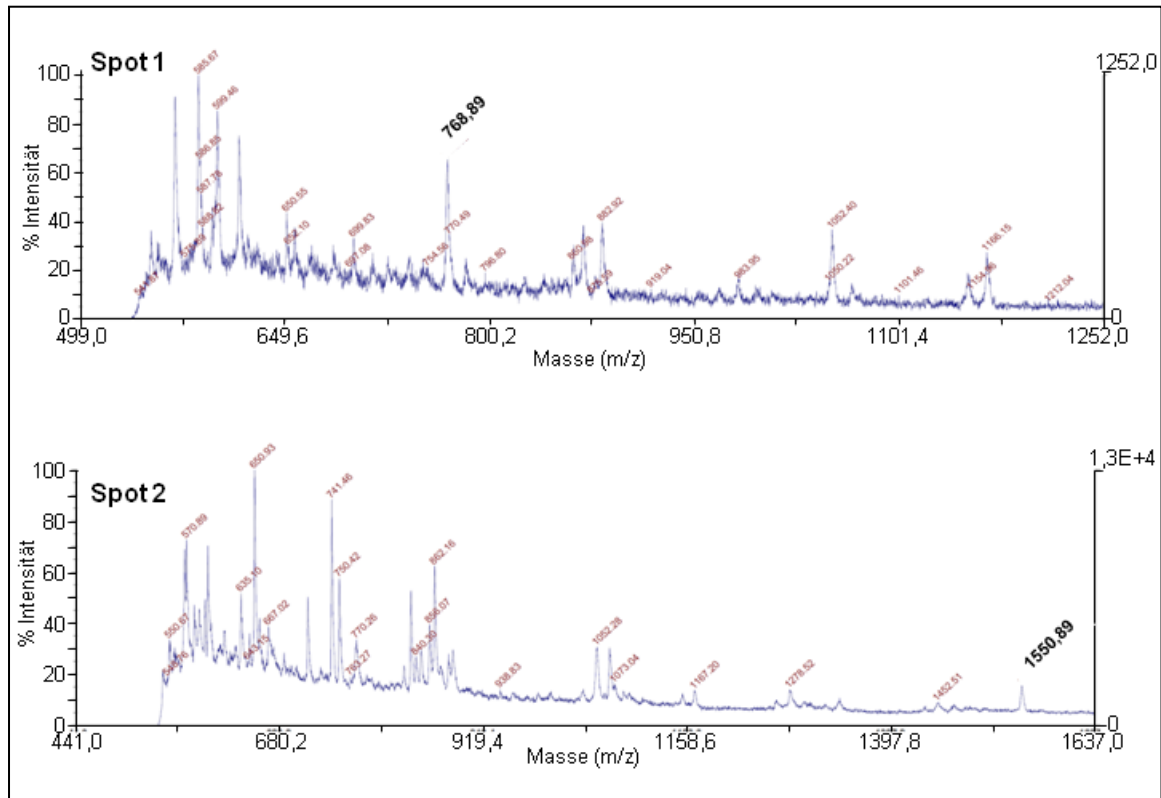


Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse der COX5B-Peptide, isoliert aus Spot 1 und Spot 2 der Phosphopeptidkarte A

Tabelle 5: Zuordnung der massenspektrometrischen Peaks zu COX5B-Phosphopeptiden

| Peptide-map-Spot | Counts pro Spot % | m/z (gemessen) | m/z (kalkuliert) | COX5B-Peptid | Anzahl Phospho-stellen | Position Phosphorylierung |
|------------------|-------------------|----------------|------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | 11,3 | 768,89 | 768,65 | 1-4; davor GST225-226 | 2 | S3 in COX5B S226 in GST |
| 2 | 14,88 | 1550,89 | 1550,61 | 74-86 | 1 | S81 oder S83 |

Die oben abgebildeten Peptidkarten konnten in drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden. Der Abgleich der massenspektrometrisch erhaltenen Peptidmassen erfolgte mit virtuell ermittelten Peptidmassen (unter <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>).

Eine Bestätigung dieser Phosphorylierungsstellen mittels eines Kinase-Assays unter Verwendung von nicht mehr phosphorylierbaren Mutanten war im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht mehr möglich.

5.7 MARK2 und PINK1 beeinflussen die mitochondriale Atmung über COX5B

5.7.1 Die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase wird durch MARK2^{T208E} gesteigert und durch Δ N-PINK1 negativ reguliert

Da von COX5B angenommen wird, dass sie eine regulatorische Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase darstellt, sollte überprüft werden, ob die Interaktion zwischen MARK2, PINK1 und COX5B einen Einfluss auf die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase hat. Da ein stärkerer Effekt bezüglich der Phosphorylierung mit Δ N-PINK1 erreicht wurde, wurde in diesem Experiment ausschließlich Δ N-PINK1 verwendet. htau40-stabilisierte CHO-Zellen wurden benutzt, da in diesen Zellen durch stabil exprimiertes Tau die Mikrotubuli vor dem Abbau durch aktive MARK2^{T208E} geschützt sind.

Nach 24 h Expression von Δ N-PINK1, COX5B und MARK2^{T208E}, bzw. der jeweiligen Kombinationen, wurden die Zellen geerntet und die Mitochondrien isoliert. In den frisch isolierten Mitochondrien wurde anschließend die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität photometrisch über die Oxidation von Ferrocycytochrom c zu Ferricytochrom c gemessen. Die möglichen Fehlerquellen dieser Methode, Proteinexpression, Anteil intakter/beschädigter Mitochondrien nach Isolation und Proteingehalt der Probe wurden, wie in Kapitel 4.2.8 beschrieben, berücksichtigt. Dennoch zeigen sich in den Ergebnissen starke Abweichungen. Möglicherweise spielen auch noch andere Faktoren, die rechnerisch nicht erfasst werden können, wie z.B. die Passage der Zellkultur und somit die Zellvitalität, eine Rolle.

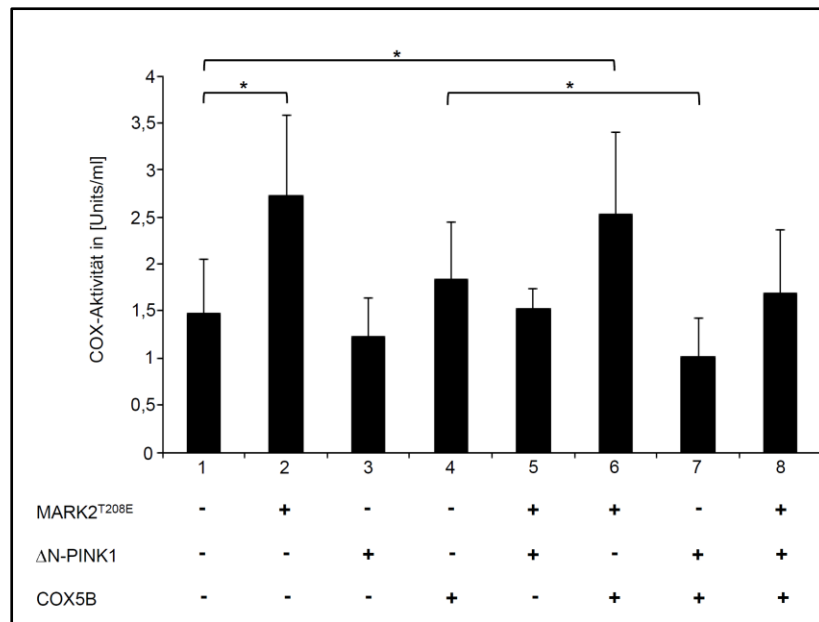


Abbildung 32: Messung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität in frisch isolierten Mitochondrien aus transfizierten CHO-htau40-Zellen. Mitochondrien aus MARK2^{T208E} transfizierten Zellen weisen eine nahezu doppelt so hohe Enzymaktivität auf als solche untransfizierter Zellen (Balken 1, 2 und 6). COX5B und ΔN-PINK1 zeigen keinen Einfluss, allerdings reduziert ΔN-PINK1 offenbar die durch MARK2^{T208E} erzeugte Aktivitätssteigerung (vgl. Balken 2 mit Balken 5 sowie Balken 6 mit Balken 8). Die einzelnen Messergebnisse wurden anhand des Proteingehaltes der Proben und anhand des Anteils intakter Mitochondrien normalisiert. Messwerte zeigen die Mittelwerte ±SEM. Signifikante Unterschiede sind dargestellt ($p < 0,05$, $n \geq 3$, Fischer Test)

Es wird dennoch deutlich, dass MARK2^{T208E} offenbar einen aktivierenden Einfluss auf die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität hat. Denn gegenüber den Mitochondrien untransfizierter Zellen zeigen die Mitochondrien von MARK2^{T208E} transfizierten Zellen eine nahezu doppelt so hohe Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität (Abb. 32, Balken 1 und 2). Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn in den Zellen MARK2^{T208E} und COX5B kotransfiziert werden (Abb. 32, Balken 1 und 6). ΔN-PINK1 und COX5B allein haben offenbar keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Abb. 32, Balken 3 und 4). Allerdings kann ein negativ regulatorischer Effekt von ΔN-PINK1 beobachtet werden. Wenn MARK2^{T208E} mit ΔN-PINK1 kotransfiziert wird, scheint sich der durch MARK2^{T208E} erzeugte Effekt wieder aufzuheben (Abb. 32, Balken 2 und 5). Ähnliches ergibt sich, wenn man die Mitochondrien aus COX5B-transfizierten mit COX5B + ΔN-PINK1 kotransfizierten Zellen (Abb. 32, Balken 4 und 7) oder die Mitochondrien aus MARK2^{T208E} + COX5B und MARK2^{T208E} + COX5B + ΔN-PINK1 kotransfizierten

Zellen vergleicht (Abb. 32, Balken 6 und 8).

Insgesamt kann also gezeigt werden, dass MARK2^{T208E} die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase steigert, wohingegen Δ N-PINK1 die Aktivität immer in Richtung des Levels untransfizierter Zellen herunter reguliert.

6 Diskussion

Mit der steigenden Lebenserwartung steigt auch die Zahl der Menschen, die an einer neurodegenerativen Erkrankung leiden. Die häufigste Erkrankung mit ca. 15 Millionen Menschen weltweit ist die Alzheimer Krankheit, die sich vor allem durch Gedächtnisverlust auszeichnet. Die zweithäufigste aber ebenso bedeutende neurodegenerative Erkrankung ist die Parkinson Krankheit, für die motorische Störungen charakteristisch sind.

Es ist daher wichtig die Mechanismen, welche zu diesen Krankheiten führen, aufzuklären. Schließlich können diese Erkenntnisse genutzt werden, geeignete Strategien zur Behandlung der Erkrankungen zu entwickeln.

Im Zusammenhang mit AD wird die Regulation und Wirkungsweise von MARK2 untersucht, einer Kinase, die für die Dynamik des Zytoskelettes wichtig ist. Vor Beginn dieser Arbeit wurde nach Interaktionspartnern für die Kinase MARK2 gesucht um mögliche weitere zelluläre Mechanismen aufzuklären. Dabei wurde eine direkte Interaktion mit der Kinase PINK1 entdeckt. Für diese Kinase werden vielfältige Regulationsmechanismen der Mitochondrienfunktion vor dem Hintergrund der Parkinson Erkrankung diskutiert. Die Interaktion mit MARK2 versprach unter anderem eine Verbindung zwischen den beiden neurodegenerativen Erkrankungen Alzheimer und Parkinson herzustellen. Geklärt werden sollte daher, in welcher Beziehung die beiden Kinasen miteinander stehen und auf welche zellulären Prozesse sie einwirken.

Die vorliegende Arbeit betrachtet die funktionellen Folgen der Interaktion zwischen den beiden Protein-Kinasen MARK2 und PINK1.

6.1 MARK2 ist ein vorgeschalteter Regulator von PINK1

In direkten Hefe-2-Hybrid-Tests zeigte sich, dass MARK2 und PINK1 über ihre Kinasedomänen interagieren (Matenia et al. 2011; eingereicht). Bei PINK1 handelt es sich um ein an Mitochondrien lokalisiertes und bei MARK2 um ein zytosolisches Protein. PINK1 kommt in Form verschiedener Spaltprodukte in der Zelle vor. PINK1^{FL} besitzt eine mitochondriale Zielsequenz und eine Transmembrandomäne, weshalb sie mit Mitochondrien kolokalisiert. Aber auch

die zwei Spaltprodukte von 54 kDa und 45 kDa können mit Mitochondrien assoziieren (Weihofen et al. 2009) oder im Zytoplasma vorliegen (Haque et al. 2008). Die 45 kDa-Form ist dabei die stabilste Variante (Lin et al. 2008), besteht aus der Kinasedomäne und dem C-Terminus und wird als ΔN -PINK1 bezeichnet. In der Immunfluoreszenz (Abb. 11) zeigt sich, dass sowohl PINK1^{FL} als auch ΔN -PINK1 mit MARK2 vor allem in den Zellausläufern von Neuronen kolokalisieren. ΔN -PINK1 ist vorwiegend in den Zellausläufern lokalisiert, daher wird dessen Kolokalisation mit MARK2 besonders deutlich (Abb. 11, 4-6). PINK1^{FL} hingegen ist stärker im Zellkörper zu finden, weshalb die Kolokalisation mit MARK2 nicht so offenkundig ist (Abb. 11, 7-9). Die Verteilung von PINK1 und MARK2 ist dabei nicht ubiquitär, sondern zeigt ein punktiertes Muster. Obwohl es sich bei MARK2 um eine zytosolische Kinase handelt, welche gleichmäßig in der Zelle vorkommt, wurde eine solche punktuelle Lokalisation für MARK2 bereits beschrieben (Schmidt-Ulms et al. 2009). Die Lokalisation von PINK1 an Mitochondrien legt die Vermutung nahe, dass MARK2 und PINK1 an den Mitochondrien interagieren. Möglich wäre, dass MARK2 durch PINK1 an die Mitochondrien rekrutiert wird. Tatsächlich kann für die konstitutiv aktive MARK2 eine Kolokalisation mit Mitochondrien festgestellt werden (Abb. 12A). Außerdem lässt sich MARK2 im Westernblot einer mitochondrialen Fraktion von N2A-Zellen nachweisen. MARK2 hat somit die Möglichkeit auf die mitochondrialen Funktionen einzuwirken. Denkbar wäre dies im Zusammenspiel mit PINK1 oder als Regulator von PINK1.

Damit MARK2 und PINK1 interagieren können, muss PINK1 im Zytoplasma oder an der Mitochondrienoberfläche vorliegen, da MARK2 keine mitochondriale Importsequenz besitzt. Die genaue Lokalisation von PINK1 ist bisher noch umstritten. Einerseits wird PINK1 als ein in die innere Mitochondrienmembran verankertes Protein beschrieben, welches in den Intermembranraum ragt (Silvestri et al. 2005). Es konnte aber bereits sowohl in der äußeren, als auch in der inneren Membran nachgewiesen werden (Gandhi et al. 2006) und wurde außerdem der mitochondrialen Matrix und auch dem Zytoplasma zugeordnet (Haque et al. 2008). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass PINK1 in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Dafür spricht auch die Transmembrandomäne, welche sich hinter der mitochondrialen

Zielsequenz befindet. Zhou et al. postulieren ein Modell, nachdem PINK1 in der äußeren Membran verankert ist, wobei seine Kinasedomäne in das Zytoplasma ragt (Zhou et al. 2008). Für ein solches Modell sprechen auch die Ergebnisse zur Beteiligung von PINK1 am mitochondrialen Transportkomplex (Weihofen et al. 2009) und der Rekrutierung des zytosolischen Proteins Parkin (Narendra et al. 2010). Eine Interaktion von MARK2 und PINK1 ist ebenfalls am ehesten möglich, wenn die Kinasedomäne von PINK1 aus dem Mitochondrium herausragt. Dies kann auch der Grund dafür sein, dass MARK2 *in vitro* bevorzugt mit Δ N-PINK1 interagiert (Matenia et al. 2011; eingereicht). Die mitochondriale Zielsequenz und die Transmembrandomäne des PINK1^{FL} könnten *in vitro* die Bindung zwischen MARK2 und PINK1 blockieren.

Diskussionspunkt ist derzeit auch die Bedeutung der PINK1-Spaltprodukte. Beschrieben werden PINK1-Fragmente von 60 kDa (Jin et al. 2010), 54 kDa und 45 kDa (Deas et al. 2009). Das 45 kDa-Fragment entspricht dem hier beschriebenen Δ N-PINK1 und beinhaltet die Kinasedomäne. Für PINK1^{FL} ist eine entscheidende Funktion für die Mitophagie nachgewiesen worden, indem es die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin zu defekten Mitochondrien rekrutiert (Vives-Bauza 2009, Narendra et al. 2010). In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass das Spaltprodukt Δ N-PINK1 nur ein Abbauprodukt in gesunden Mitochondrien darstellt, da es in diesen nicht für die Mitophagie benötigt wird (Jin et al. 2010). Andererseits konnte für dieses Fragment eine neuroprotektive Funktion gegen das dopaminerge Neurotoxin MPTP nachgewiesen werden (Haque et al. 2008). Auch eine Bindung mit dem Miro-Milton-Transportkomplex der Mitochondrien (näheres in Kapitel 6.2.) wurde für Δ N-PINK1 gezeigt (Weihofen et al. 2009). Andere Arbeiten zeigten außerdem, dass PINK1 in seiner Funktion als Kinase die mitochondrialen Chaperone TRAP1 und Omi/HtrA2 (Pridgeon et al. 2007, Plun-Flaveau et al. 2007) beeinflussen kann. Dabei konnte bisher aber noch kein Regulator der PINK1 nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit kann nun gezeigt werden, dass PINK1^{FL} und Δ N-PINK1 unterschiedliche Funktionen für den Transport von Mitochondrien besitzen (näheres in Kapitel 6.2) und dass MARK2 der erste und bislang einzige vorgeschaltete Regulator von PINK1 ist.

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die Interaktion zwischen MARK2 und PINK1 zu einer Phosphorylierung einer der beiden Kinasen führt. Es zeigte sich dabei, dass MARK2^{T208E} vor allem Δ N-PINK1 phosphoryliert und damit auch ihre Aktivität steigert (Matenia et al. 2011; eingereicht). Dadurch wurde MARK2 als erster Regulator von PINK1 identifiziert. Die Δ N-PINK1-Phosphorylierung wurde im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet. Durch Phosphopeptid-Kartierung und anschließender massenspektrometrischer Messung wurden verschiedene Phosphopeptide ermittelt. Besonders interessant war dabei das Threonin 313, da es in den zwei stärksten „Spots“ der Phosphopeptidkartierung gefunden wurde und T313M eine bereits beschriebene Mutation ist, die bei einer frühen, vererbaren Form von Parkinson auftritt (Zhang et al. 2005, Chisti et al. 2006, Mills et al. 2008). Für einen *in vitro* Kinaseassay wurde das T313 durch Alanin substituiert, um eine nicht phosphorylierbare, aber in ihrer Struktur ähnliche Mutante zu erhalten. Bei einer Messung der Phosphorylierung durch MARK2-T208E zeigte sich eine deutliche, aber nicht vollständige Reduktion der Δ N-PINK1 Phosphorylierung (Abb. 15a). Offenbar sind noch ein oder mehrere Phosphorylierungsstellen vorhanden – beispielsweise T333 und S335, welche ebenfalls in den zwei stärksten „Spots“ gefunden werden konnten (Tabelle 2).

Threonin 313 liegt im β -Faltblatt 5 der PINK1-Kinasedomäne (Abb. 15B, grüner Bereich) und könnte mit der C-Helix interagieren. Diese Helix fixiert zusammen mit der P-Schleife das Mg-ATP und ist somit für die Aktivität von PINK1 verantwortlich. Die Mutation von Threonin 313 in Methionin beeinflusst die Kinaseaktivität nachteilig (Cardona et al. 2010). Daher könnte sich diese Mutation auch auf die bisher bekannten PINK1-Substrate TRAP1, Omi/HtrA2 und Parkin (Pridgeon et al. 2007, Plun-Flaveau 2007, Sha et al. 2010) auswirken. Bei TRAP1 und Omi/HtrA2 handelt es sich um intramitochondriale Chaperone. Unter der Annahme, dass PINK1 in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist, bleibt aber offen, wie diese unter physiologischen Bedingungen von PINK1 phosphoryliert werden können. Parkin hingegen ist ein zytosolisches Protein, welches von PINK1 zu defekten Mitochondrien rekrutiert wird (Narendra et al. 2010). Sollte die bereits nachgewiesene Phosphorylierung von Parkin durch PINK1 (Sha et al. 2010) die

Mitophagie beeinflussen, so könnte eine Mutation an T313 zu einer Verstärkung oder einer Abschwächung der Mitophagie führen.

Die physiologischen Effekte der PINK1-Mutation wurden in neuronalen Zellmodellen und in CHO-Zellen betrachtet. Dabei zeigten sich toxische Effekte sowohl bei der Verwendung der Phosphorylierungsmutante ΔN -PINK1^{T313E} als auch bei der nicht mehr phosphorylierbaren Parkinson assoziierten Mutante PINK1^{T313M}. Weder von der ΔN -PINK1^{T313E}-, noch von der PINK1^{FL/T313E}-Mutante ließen sich Adenoviren herstellen, da die HEK/293-Wirtszellen starben und in CHO-Zellen, welche mit diesen PINK1-Mutanten transfiziert wurden, konnten keine Transfektanden nachgewiesen werden. Möglicherweise führt diese Mutation zu einer starken Aktivierung der Mitophagie, sodass sich die Zahl der Mitochondrien soweit reduziert, bis die Zelle stirbt. Oder der mitochondriale Transport wird komplett unterbrochen, so dass die Energiezufuhr der Zelle zusammenbricht. Denkbar wäre auch, dass ein Enzym der Atmungskette derart beeinflusst wird, dass es zu einer starken ROS-Bildung kommt und die Zelle zugrunde geht.

Die Transfektion von ΔN -PINK1^{T313M} führt sowohl in Neuronen als auch in CHO-Zellen zu stark akkumulierten Mitochondrien (Abb. 24A und 24B, 1-3). Auch dies deutet auf eine Unterbrechung des mitochondrialen Transportes hin. Denkbar ist, dass weitere Phosphorylierungsstellen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr genauer charakterisiert werden konnten, eine Rolle spielen. Möglich wäre aber auch, dass die Mutation die Bindungseigenschaften zum Transportkomplex derart verändert, dass dieser sich auflöst und die Mitochondrien dadurch nicht weiter transportiert werden können. Akkumulierte Mitochondrien können auch auf einen Fehler in der Regulation der mitochondrialen Dynamik (Fusion und Teilung) hindeuten. Mitochondriale Dynamik und Transport stehen unter anderem über das Protein Mfn in einem direkten Zusammenhang. Mfn ist ein Protein, welches die Fusion der äußeren Membran vermittelt aber auch direkt am Mitochondrientransport beteiligt ist (Misko et al. 2010).

Eine verstärkte Degradation der Mitochondrien wird beobachtet, wenn CHO-Zellen mit PINK1^{FL/T313M} transfiziert werden (Abb. 24B, 4-6). Dies lässt auf eine Steigerung der Mitophagie schließen, so dass die Phosphorylierung an dieser

Stelle anscheinend nicht für die Rekrutierung und Aktivierung von Parkin erforderlich ist. Da die Gesamtphosphorylierung durch die ΔN -PINK^{T313A}-Mutation *in vitro* aber nicht zu einem vollständigen Verlust der Phosphorylierung führt (Abb. 15A), kann dies auch bedeuten, dass andere Phosphorylierungsstellen für die Parkin-Aktivierung verantwortlich sind. Denkbar wäre auch, dass PINK1 durch die T313M-Mutation Parkin stärker binden kann und so die Mitophagie fördert.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung von PINK1 genau reguliert werden muss. Sowohl eine fehlende als auch eine zu starke Phosphorylierung an T313 wirken sich negativ auf die Zellvitalität aus.

6.2 MARK2 und PINK1 regulieren den Transport von Mitochondrien

Hinweise für einen funktionellen Effekt der MARK2-PINK1-Interaktion lieferten Fluoreszenzbilder transfizierter Neurone mit PINK1^{FL}, ΔN -PINK1, MARK2 und den Kombinationen dieser Kinasen. Hierbei wird deutlich, dass PINK1^{FL} und auch ΔN -PINK1 jeweils einen Effekt auf die Lokalisation von Mitochondrien haben. PINK1^{FL} führt zu einer Häufung der Mitochondrien im Zellkörper, wohingegen im Axon kaum Mitochondrien vorhanden sind. Im Gegensatz dazu findet sich bei ΔN -PINK1-transfizierten Zellen eine Anhäufung von Mitochondrien vor allem in den Axonen und Dendriten. MARK2 ändert die Lokalisation der Mitochondrien nicht, verstärkt aber die genannten Effekte von PINK1^{FL} und ΔN -PINK1 (Abb. 16). Diese Beobachtung wird noch deutlicher in transfizierten retinalen Ganglienzellen aus Hühner-Embryonen. In diesen Zellen kann in den Axonen bei der Mitochondriendichte eine statistisch signifikante Erhöhung für ΔN -PINK1 und eine signifikante Reduktion für PINK1^{FL} nachgewiesen werden (Abb. 17). Beide Ergebnisse zeigen unterschiedliche Effekte für PINK1^{FL} und ΔN -PINK1.

Mitochondrien in PINK1^{FL}-transfizierten Zellen werden entweder im Zellkörper zurück gehalten oder vermehrt in den Zellkörper zurück transportiert. Die anschließende *in vivo* Beobachtung der Mitochondrienbewegung in retinalen Ganglienzellen unterstreicht die Vermutung, dass in PINK1^{FL}-transfizierten

Zellen der retrograde Transport verstärkt ist. Um ca. 1/3 sinkt der Anteil der anterograd transportierten Mitochondrien im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 22, Balken 1 und 3). Dieses Ergebnis steht im Konsens mit Untersuchungen zur Funktion von PINK1^{FL} bei der Mitophagie.

Die Stabilität von PINK1^{FL} steht in Zusammenhang mit dem mitochondrialen Membranpotential und somit mit der Aktivität der Mitochondrien. PINK1^{FL} ist stabil bei einem geringen Membranpotential, also bei inaktiven oder defekten Mitochondrien. Wird die Mitochondrienfunktion unterbrochen, z.B. durch den NADH-Dehydrogenase-Inhibitor Paraquat, so wird auch der anterograde Transport blockiert, sowie der retrograde Transport gesteigert (Miller und Sheetz 2004). Es konnte gezeigt werden, dass PINK1^{FL} mit zwei für die Autophagie wichtigen Proteinen interagiert. Zum einen mit dem antiapoptotischen und Pro-Autophagie-Protein Beclin1 (Michiorri et al. 2010) zum anderen mit der zytosolischen E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (Narendra et al. 2008). Beclin1 interagiert ausschließlich mit der PINK1^{FL}-Form und kolokalisiert dabei mit Mitochondrien. PINK1 kann dabei die durch Beclin1 vermittelte Autophagie steigern, wobei Beclin1 allerdings nicht von PINK1 phosphoryliert wird (Michiorri et al. 2010). Das zytosolische Protein Parkin wird durch PINK1^{FL} nachweislich an die Mitochondrien rekrutiert (Vives-Bauza et al. 2009). Parkin markiert die Mitochondrien für die Mitophagie (Narendra et al. 2008) indem es das Kanalprotein der äußeren Mitochondrienmembran VDAC1 ubiquitiniert. Schließlich bindet das Autophagie-Adapterprotein p62 an die Ubiquitin-Ketten und führt die Mitophagie aus (Geisler et al. 2010). Da die Mitophagie in der Lysosomen-reichen, perinucleären Umgebung stattfindet, ist ein retrograder Transport der Mitochondrien erforderlich (Vives-Bauza et al. 2009). In dieser Arbeit konnte nun erstmals nachgewiesen werden, dass PINK1^{FL} den retrograden Transport der Mitochondrien fördert. Dabei könnte es zusammen mit der Deacetylase HDAC6 einen Transportkomplex mit Dynein bilden. Denn HDAC6 vermittelt die Bindung von Dynein an ubiquitinierte Proteine (Kawaguchi et al. 2003).

Interessant zu klären wäre, ob PINK1^{FL} sowohl defekte Mitochondrien zusammen mit Parkin, als auch gesunde Mitochondrien in einem Transportkomplex mit Miro retrograd transportiert. Denn auch das PINK1

interagierende Protein Miro ist mit am retrograden Transport beteiligt (Russo et al. 2009). Es stellt sich die Frage, ob es sich um ein und denselben Transportmechanismus handelt, an dem dann Miro, PINK1 und Parkin

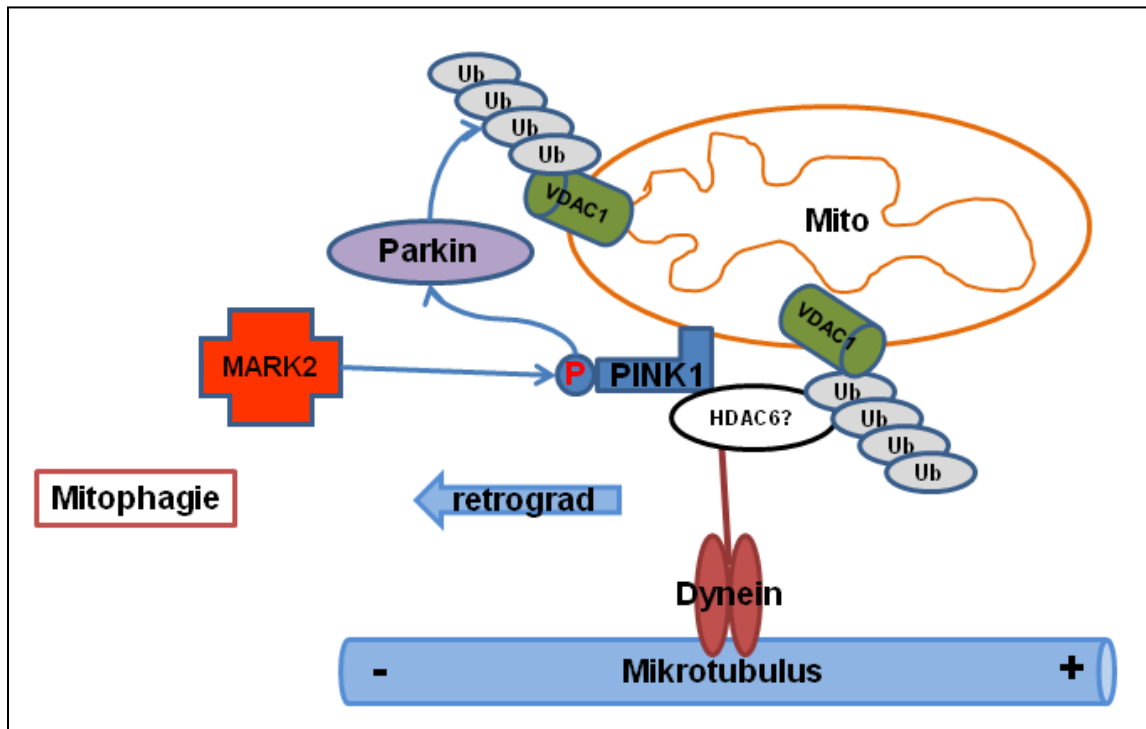


Abbildung 33: Hypothetisches Modell der Funktion von MARK2 und PINK1 für die Mitophagie. MARK2 phosphoryliert PINK1, welches dadurch wiederum Parkin rekrutieren und phosphorylieren könnte. Dies würde zu einer Steigerung der Mitophagie über die Rekrutierung von Parkin und der anschließenden Ubiquitinierung von VDAC1 führen.

mitwirken, oder ob es sich um zwei verschiedene Mechanismen handelt.

Auch MARK2 reduziert den Anteil der anterograd transportierten Mitochondrien im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 22, Balken 1 und 2). Werden PINK1^{FL} und MARK2 kotransfiziert steigt der Anteil der retrograd transportierten Mitochondrien auf 80% (Abb. 22, Balken 4). Da MARK2 PINK1 phosphoryliert und dessen Aktivität steigert, kann davon ausgegangen werden, dass der PINK1-Effekt auf den retrograden Transport durch MARK2 gesteigert wird. Dies erfolgt vermutlich über die PINK1-Phosphorylierung, welche wiederum eine stärkere Rekrutierung von Parkin zur Folge haben könnte und damit zu einem stärkeren retrograden Transport und Abbau der Mitochondrien führt (Abb. 33). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich hierbei auch um einen additiven Effekt handeln könnte. Da die einzelnen Transfektionen PINK1^{FL} und MARK2 jeweils in ähnlichem Maße den retrograden Transport fördern, könnte

es sich auch um zwei voneinander unabhängige Mechanismen handeln, die beide zusammenwirken. Der Effekt der Einzeltransfektion von MARK2 kann aber auch über seine Wirkung auf endogen exprimiertes PINK1 erklärt werden. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass der durch PINK1^{FL} vermittelte, retrograde Transport phosphorylierungsabhängig durch MARK2 verstärkt wird. Die Bedeutung der Phosphorylierungsstelle T313 für den retrograden Transport wird in Kapitel 6.1 erläutert.

Die Erhöhung der Mitochondriendichte in Axonen retinaler Ganglienzellen (Abb. 17, Bild 5) und die Anhäufung der Mitochondrien in den Dendriten und Axonen von Neuronen (Abb. 16, Bild 7) nach Δ N-PINK1-Transfektion sprechen für einen Transportstopp nach einem vorwiegend anterograden Transport. Auch dies wird durch die *in vivo* Beobachtung des mitochondrialen Transportes untermauert. Δ N-PINK1 vervierfacht den Anteil der stationären Mitochondrien (Abb. 11, Balken 1 und 5), ändert aber im Vergleich zu untransfizierten Zellen die Bewegungsrichtung der Mitochondrien nicht (Abb. 22, Balken 1 und 5). Als Teil des anterograden Transportkomplexes wurde Δ N-PINK1 bereits beschrieben (Weihofen et al. 2009). In diesem Komplex bindet Δ N-PINK1 an die GTPase Miro und das Adapterprotein Milton, welches wiederum an die schwere Kette des Kinesins bindet (Glater et al. 2006, Weihofen et al. 2009). Δ N-PINK1 wird durch Proteolyse aus PINK1^{FL} gebildet, wenn das Membranpotential der Mitochondrien hoch ist (Narendra et al. 2010). Es handelt sich dann um aktive Mitochondrien, von denen bekannt ist, dass sie vorwiegend anterograd transportiert werden (Miller und Sheetz 2004).

Schließlich bewirkt Δ N-PINK1 den Transportstopp der Mitochondrien. 75% stationäre Mitochondrien wurden von Morris und Hollenbeck nahe des Wachstumskegels beobachtet (Morris und Hollenbeck 1993). Der Mechanismus des mitochondrialen Transportstopps wird aktuell diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivität der Mitochondrien für den Transportstopp von Bedeutung ist. So konnte gezeigt werden, dass eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials, sowie ein Einstrom von Ca²⁺ über den NMDA-Rezeptor (Rintoul et al. 2003, Hollenbeck und Saxton 2005) zum Transportstopp führt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die GTPase Miro, welche zusammen mit Milton, PINK1 und der schweren Kette des Kinesins den

mitochondrialen Transportkomplex bildet, in Abhängigkeit von Kalzium den Transport unterbricht. Dabei löst Kalzium nach seiner Bindung an das EF-Hand-Motiv von Miro eine Konformationsänderung im Kinesin aus, wodurch sich dessen Motor-Domäne vom Mikrotubulus ablöst (Wang und Schwarz 2009). Auch das Adapterprotein Milton besitzt durch seine Assoziation mit dem Enzym O-GlcNAc-Transferase (OGT) eine Regulationsmöglichkeit für den mitochondrialen Transport, da dieses Enzym als Sensor für die Glukosekonzentration der Umgebung dient (Murrey und Hsieh-Wilson 2008) und Milton glykolisieren kann (Glater et al. 2006).

Der Transportstopp der aktiven Mitochondrien bewirkt, dass Energie entsprechend des zellulären Bedarfes bereitgestellt werden kann. Besonders viel Energie wird in Neuronen in den Wachstumskegeln der Axone benötigt. Hier ist einerseits die Kalzium-Konzentration hoch, welche auf Miro einwirkt. Andererseits konnte in PC12-Zellen gezeigt werden, dass aktive MARK2 (MARK2^{pT208}) in den Wachstumskegeln verstärkt vorkommt (Abb. 23, Bild 4). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass MARK2 den durch Δ N-PINK1 vermittelten Transportstopp fördert (Abb.21). Es liegt der Schluss nahe, dass das durch MARK2 phosphorylierte Δ N-PINK1 eines der am Transport beteiligten Proteine phosphorylieren und so zum Transportstopp führen könnte. In der Immunfluoreszenz in PC12-Zellen wird erstens beobachtet, dass die drei endogenen Proteine PINK1, MARK2 und Kinesin mit Mitochondrien kolokalisieren und zweitens, dass sie sich im Wachstumskegel häufen, wohingegen die Mitochondrien dahinter zurück bleiben (Abb. 23). Dies vermittelt den Eindruck, dass sich am Zielort der Transportkomplex vom Mitochondrium ablöst. Die Mitochondrien selbst werden nur bis zur Basis des Wachstumskegels transportiert, da die Mikrotubuli hier enden. Mit der Vermutung, dass eventuell die schwere Kette des Kinesins ein Substrat von PINK1 ist und die Phosphorylierung des Kinesins zum Transportstopp führt, wurde ein Kinaseassay mit PINK1 und Kinesin durchgeführt. Dieser Assay ergab, dass Kinesin nicht von PINK1 phosphoryliert wird. Es bleibt zu klären, ob PINK1 eventuell Miro oder Milton phosphoryliert. Dies könnte eine Konformationsänderung im Transportkomplex auslösen, wodurch sich das Mitochondrium ablöst (Abb. 34).

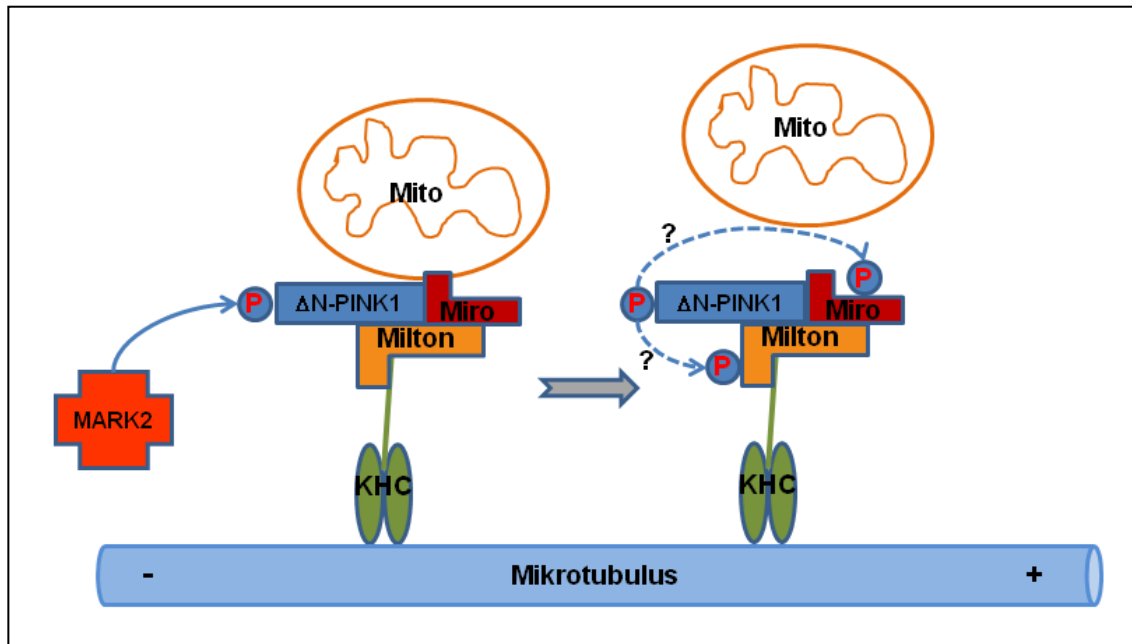


Abbildung 34: Ein Modell des mitochondrialen Transportstopps: MARK2 phosphoryliert Δ N-PINK1, welches wiederum Miro oder Milton phosphorylieren könnte. Dies könnte eine Konformationsänderung des Transportkomplexes bewirken, wodurch sich das Mitochondrium am Zielort ablöst.

Ein weiterer möglicher Komplex, welchen PINK1 durch Phosphorylierung beeinflussen könnte, ist der mitochondriale Anker Syntaphilin (snph) und die leichte Kette von Dynein LC8. snph besitzt eine Bindedomäne für Mikrotubuli und eine für LC8. Bindet LC8 an snph, so wird das snph-vermittelte Anheften von Mitochondrien an die Mikrotubuli verstärkt (Chen et al. 2009). Denkbar wäre, dass LC8 phosphorylierungsabhängig an snph bindet und das Anheften an die Mikrotubuli vermittelt. Δ N-PINK1 könnte durch die Phosphorylierung von LC8 diesen Effekt auslösen (Abb. 35). Ein ähnlicher Mechanismus ist von Huntingtin, einem Protein, das den Vesikel-Transport in Neuronen reguliert, bekannt. Huntingtin bindet an Dynactin, einem Ankerprotein, welches mit dem Motorprotein Dynein assoziiert ist. Hier bewirkt die Phosphorylierung des Huntingtin durch die Kinase Akt eine Umkehr der Bewegungsrichtung (Colin et al. 2008).

Interessant ist den Mitochondrientransport betreffend die Beobachtung, dass MARK2 im Gegensatz zu PINK1^{FL} und Δ N-PINK1 die anterograde Geschwindigkeit der Mitochondrien reduziert (Abb. 20). Dies steht im Widerspruch zur Aufgabe von MARK2, Tau von den Mikrotubuli abzulösen und so für Transportkomplexe frei zu halten (Stamer et al. 2002, Mandelkow et al.

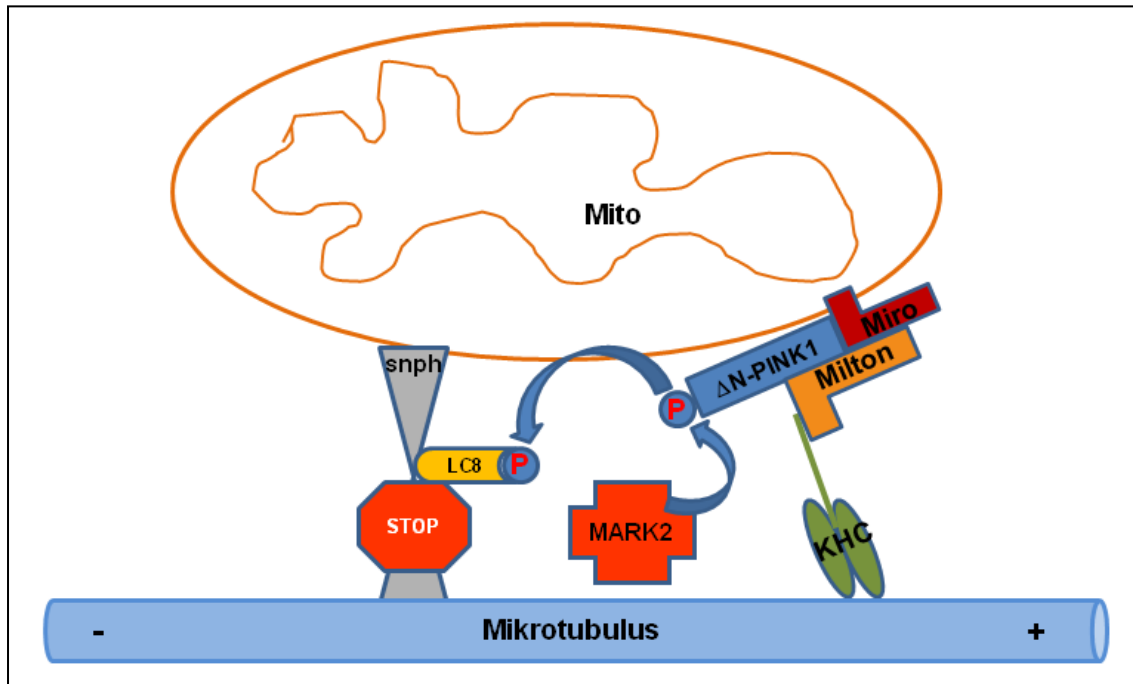


Abbildung 35: Hypothetisches Modell des mitochondrialen Transportstopps. MARK2 phosphoryliert Δ N-PINK1. Dieses wiederum könnte LC8, welches mit Syntaphilin (snph) assoziiert, phosphorylieren. Dadurch könnte das Anheften des Ankers snph an Mikrotubuli verstärkt werden.

2004, Matenia und Mandelkow 2009). Es legt den Schluss nahe, dass ein von der Tau-Regulation verschiedener Mechanismus vorliegt. Allerdings kann ein solcher Mechanismus nicht über PINK1 ablaufen, da in der Kofunktionsanalyse sowohl von Δ N-PINK1 mit MARK2, als auch von PINK1^{FL} mit MARK2 keine Reduktion der anterograden Geschwindigkeit beobachtet wird. Vielleicht kann MARK2 die Prozessivität des Kinesins verringern oder das Membranpotential der Mitochondrien und somit dessen Transporteigenschaften verändern.

Insgesamt wird deutlich, dass PINK1^{FL} und Δ N-PINK1 für den Mitochondrientransport unterschiedliche Aufgaben haben, retrograder Transport einerseits und Transportstopp andererseits. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass MARK2 beide Effekte verstärkt und die Ergebnisse weisen darauf hin, dass dies über die Phosphorylierung erfolgt.

6.3 Identifizierung neuer Interaktionspartner von PINK1

PINK1 ist eine wichtige Kinase für die Regulation der Mitochondrienfunktionen und Mutationen in dieser Kinase wurden mehrfach mit der Parkinson Krankheit assoziiert. Wenig ist aber bisher bekannt über die Wirkungsmechanismen von PINK1. Um mögliche Mechanismen aufzudecken, sollten in dieser Arbeit neue Interaktionspartner von PINK1 identifiziert werden. Hierfür wurde ein Hefe-2-H Screen durchgeführt mit dessen Hilfe die Klone einer menschlichen fötalen Gehirn cDNS-Bank durchmustert wurden. Die Auswertung ergab ein weites Spektrum an möglichen neuen Bindungspartnern für PINK1 mit einer großen funktionellen Vielfalt (Tab. 3). Dabei muss davon ausgegangen werden, dass nicht jedes identifizierte Protein auch in Zellen eine funktionelle Interaktion mit PINK1 eingeht. Die Einzelanalyse kann Aufschluss darüber geben, ob die ermittelte Interaktion in den Zellen wirklich stattfindet.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Interaktion mit dem Protein COX5B, einer Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase, dem Komplex IV der Atmungskette, näher untersucht. Dies erschien vielversprechend, da PINK1 bei der Regulation der mitochondrialen Atmungskette mitwirkt. Vor allem der Einfluss der Kinase auf den Komplex I, der NADH-Hydrogenase ist unumstritten, da ein Fehlen von PINK1 im Mausmodell die gleichen Symptome hervorruft, wie Rotenon, ein Inhibitor der NADH-Hydrogenase (Liu et al. 2009). Weiterhin konnte auch ein Zusammenhang zwischen PINK1 und den Komplexen III und IV nachgewiesen werden (Gautier et al. 2008). Gautier beschreibt dabei, dass das Fehlen von PINK1 nicht selbst zu einem Defekt der Mitochondrien führt, diese aber sensitiver gegenüber zellulärem Stress, wie beispielsweise Dopamin, werden (Gautier et al. 2008). Zudem wurde gezeigt, dass A β wichtige Enzyme des mitochondrialen Metabolismus, wie die α -Ketoglutarat- und Pyruvat-Dehydrogenase, aber auch die Cytochrom-c-Oxidase inhibiert und dass das APP-Vorläuferprotein eine mitochondriale Zielsequenz enthält (Pérez-Garcia et al. 2008). Für MARK2 wurde in Mausmodellen schließlich auch eine regulatorische Funktion im Glucose-Metabolismus beobachtet – dabei führt das Fehlen von MARK2 zu Wachstumsstörungen, geringeren Körperfettwerten als in Wild-Typ-Mäusen, sowie gesteigerter Nahrungsaufnahme (Hurov und Piwnica-Worms 2007). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass MARK2 eine

bedeutende Rolle im mitochondrialen Metabolismus einnimmt. Fehlt MARK2 so wird die Umsetzung der aufgenommenen Nahrung in Energie stark vermindert. MARK2 müsste demnach aktivierend auf einen Teil der Atmungskette einwirken.

In diesem zweiten Teil der Arbeit sollte daher die Möglichkeit untersucht werden, ob MARK2 und PINK1 die Cytochrom-c-Oxidase über die Untereinheit COX5B beeinflussen und zu welchen zellulären Konsequenzen die Interaktion führt.

6.4 COX5B interagiert mit den katalytischen Domänen von PINK1 und MARK2

In direkten Hefe-2-Htests wurde die gefundene Interaktion zwischen PINK1 und COX5B bestätigt. Daneben wurden ebenfalls direkte Hefe-2-Htests zwischen MARK2 und COX5B durchgeführt, um festzustellen ob MARK2 ebenfalls direkt mit COX5B interagiert, oder ob MARK2 seine Wirkung auf den Zellmetabolismus möglicherweise über PINK1 ausübt.

Für COX5B sind keine Domänen beschrieben, allerdings kann über den TargetP1.1-Server der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) eine mitochondriale Zielsequenz mit einer Schnittstelle an Methion 31 identifiziert werden. Für die direkten Interaktionstests wurde das gesamte COX5B-Protein und entweder verschiedene PINK1-Abschnitte oder MARK2-Domänen verwendet. Dabei zeigte sich, dass COX5B mit der Kinasedomäne von PINK1 am stärksten interagiert. Die mitochondriale Zielsequenz, Transmembrandomäne und der C-Terminus scheinen die Bindung eher zu stören. Ähnliches gilt für die Interaktion mit MARK2. COX5B interagiert mit dem N-terminalen Teil der Kinasedomäne. Dies könnte bedeuten, dass COX5B unabhängig mit PINK1 und mit MARK2 interagieren kann (Abb. 26). Da PINK1 und MARK2 auch über die Kinasedomänen interagieren (Matenia et al. 2011; eingereicht), könnte es zwischen den drei Proteinen aber zu einer kompetitiven Inhibition der Bindung kommen. In Koimmunopräzipitations-Experimenten konnte die Interaktion der drei Proteine abermals bestätigt werden (Abb. 27 A und B).

Charakterisiert wird die Cytochrom-c-Oxidase als eine Häm-Kupfer enthaltende Oxidase, wobei die Säuger-Cytochrom-c-Oxidase ein Dimer in der inneren Mitochondrienmembran bildet (Capaldi et al. 1990). Das Enzym katalysiert den Transfer von Elektronen von Cytochrom c über Kupfer- und Hämgruppen zum Sauerstoff, welcher dabei zu Wasser reduziert wird. Dieser Elektronentransfer ist gleichzeitig an eine Protonenpumpe gekoppelt, wodurch die frei werdende Energie in Form eines Protonengradienten gespeichert werden kann. Das Enzym besteht aus 13 Untereinheiten, wovon die drei katalytischen Untereinheiten vom Mitochondrium kodiert werden. Hingegen werden die anderen 10 Untereinheiten nucleär kodiert, an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und anschließend ins Mitochondrium transportiert. Für den Import können diese Untereinheiten positiv geladene Zielsequenzen besitzen (Taanmann 1997). Die genaue Bedeutung der nucleär kodierten Untereinheiten ist noch unbekannt. Es wird aber spekuliert, dass sie zur Optimierung der enzymatischen Aktivität von Bedeutung sind (Kadenbach et al. 1986).

Die in dieser Arbeit beschriebene Untereinheit COX5B ist auf der Matrix-Seite des Mitochondriums lokalisiert (Tsukihara et al. 1996). Daher stellt sich die Frage, wie diese Untereinheit mit der zytosolischen Kinase MARK2 und PINK1, welche vermutlich auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Zhou et al. 2008) interagieren kann. Die Interaktion muss somit stattfinden, bevor COX5B in das Mitochondrium transportiert wird. Möglicherweise erfolgt die Interaktion an der Mitochondrienoberfläche, denn auch für MARK2 konnte eine Assoziation mit Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 22A und B).

6.5 MARK2 und PINK1 regulieren die Cytochrom-c-Oxidase über die Phosphorylierung von COX5B an Mitochondrien

Um die funktionellen Auswirkungen der Interaktion mit COX5B zu untersuchen, wurden zunächst Kinase-Assays durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob COX5B phosphoryliert wird. Da PINK1 als Phosphorylierungssubstrat von MARK2 identifiziert wurde (Matenia et al. 2011; eingereicht) und PINK1 selbst eine Kinase ist, war die erste Annahme, dass COX5B durch PINK1 phosphoryliert wird. Dies bestätigte sich nicht. Im Gegenteil – COX5B wird durch MARK2 phosphoryliert und diese Phosphorylierung wird vor allem durch Δ N-PINK1 gehemmt. Dabei beruht die Inhibition nicht einfach auf einer Konkurrenz zwischen PINK1 und COX5B,

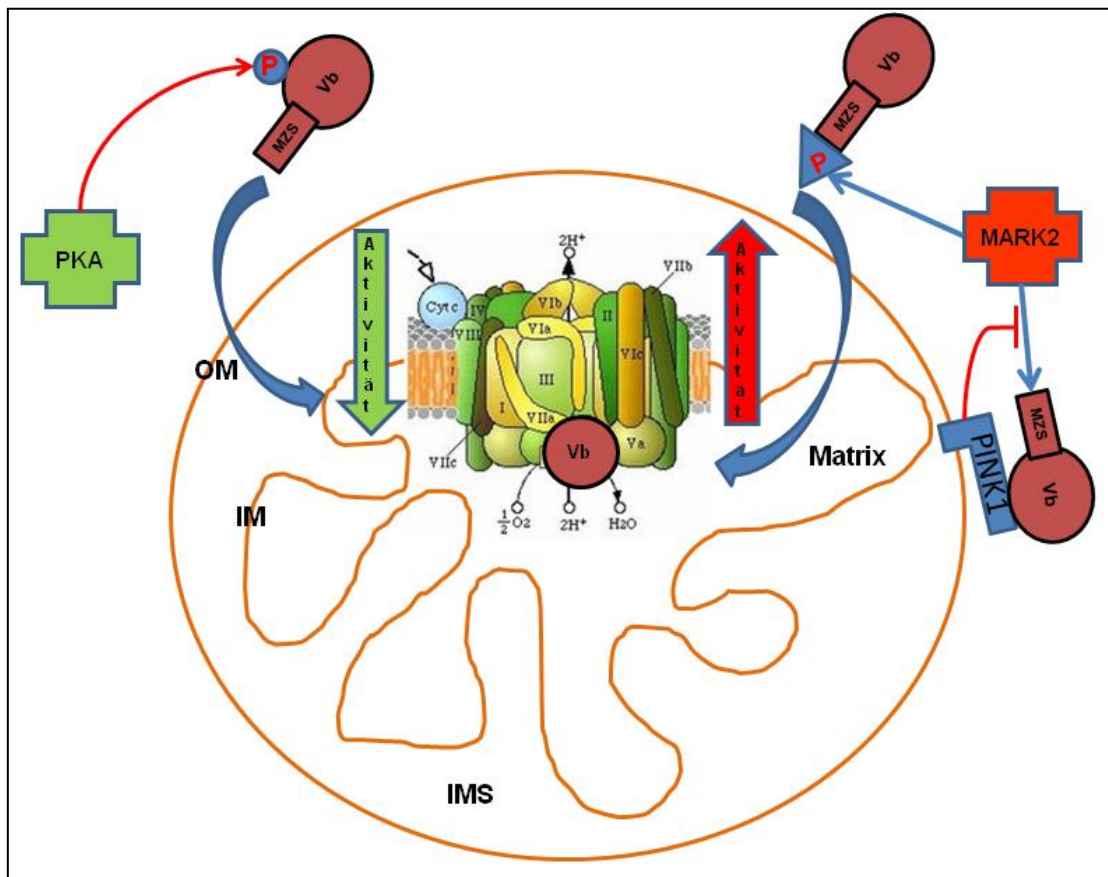


Abbildung 36: Hypothetische Regulation der Cytochrom-c-Oxidase über ihre Untereinheit COX5B. MARK2 könnte durch Phosphorylierung in der mitochondrialen Zielsequenz den Import von COX5B und damit letztlich die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase steigern. PINK1 hingegen hemmt die Phosphorylierung durch MARK2. Von PKA ist bekannt, dass sie COX5B phosphoryliert und dadurch die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase senkt (Kadenbach et al. 2000). Abbildung der Cytochrom-c-Oxidase entnommen aus:

<http://www.scienceblogs.de/lindaunobel/2009/06/hartmut-michel-warum-wir-atmen-atomar-gesehen.php>

sondern PINK1 hemmt offenbar durch seine Bindung an COX5B dessen Phosphorylierung durch MARK2. Dies zeigt sich, wenn COX5B und PINK1 zunächst inkubiert werden und erst anschließend MARK2 zum Versuchsansatz gegeben wird. Die COX5B Phosphorylierung vermindert sich in deutlich stärkerem Ausmaß, als wenn MARK2 und PINK1 gleichzeitig mit COX5B inkubiert werden (Abb. 29A, vergleiche Balken 3, 4 und 5).

Bei der anschließenden Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von COX5B wurden drei Stellen identifiziert: Serin 3, sowie Serin 81 und Serin 83. Eine Bestätigung dieser Phosphorylierungsstellen durch Kinaseassays mit nicht mehr phosphorylierbaren Mutanten war aus technischen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Serin 3 liegt in der mitochondrialen Erkennungssequenz von COX5B. MARK2 könnte an dieser Stelle durch Phosphorylierung und PINK1 durch Inhibition der Phosphorylierung Einfluss auf den mitochondrialen Import von COX5B nehmen. Es wurde beobachtet, dass ein Fehlen der Untereinheit COX5B zu einer Verminderung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität und gleichzeitig zu einer Steigerung von ROS führt (Campain et al. 2007, Galati et al. 2009). Dabei wird vermutet, dass die Untereinheit COX5B für den Zusammenbau des gesamten Enzyms von Bedeutung ist (Galati et al. 2009). Außerdem wurde nachgewiesen, dass auch der Zusammenbau von Komplex I, der NADH-Hydrogenase von einem kompletten Komplex IV abhängt (Li et al. 2007). MARK2 könnte demnach durch Phosphorylierung an S3 den Import von COX5B und somit die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase steigern. PINK1 würde demnach das Gegenteil bewirken und könnte dadurch seine neuroprotektive Funktion ausüben. Denn auch eine überhöhte Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität, führt zur Produktion von ROS (Kadenbach et al. 2000).

Um diese Hypothese zu untermauern wurden die Folgen der COX5B Phosphorylierung in einem abschließenden COX-Aktivitäts-Assay in isolierten Mitochondrien beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass die Transfektion der konstitutiv aktiven MARK2 nahezu zu einer Verdoppelung der COX-Aktivität führt. Hingegen führt die Überexpression von COX5B zu keiner Steigerung der COX-Aktivität. Die Transfektion von Δ N-PINK1 zieht offenbar die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität auf das Niveau der untransfizierten Zellen, auch wenn es mit

MARK2^{T208E} kotransfiziert wurde (Abb. 32). Diese Beobachtung entspricht der zuvor beschriebenen Phosphorylierung von COX5B durch MARK2 und der Inhibition dieser Phosphorylierung durch PINK1. Somit bewirkt die Phosphorylierung von COX5B durch MARK2 eine Erhöhung der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase, wohingegen PINK1 diese Aktivierung durch eine Inhibition der Phosphorylierung verhindert. In dieser Funktion könnte PINK1 letztlich die Bildung von ROS unterbinden und so die Mitochondrien vor oxidativem Stress schützen. Dies steht im Konsens mit der Beobachtung von Gautier, dass ein Fehlen von PINK1 die Mitochondrien sensitiver gegenüber oxidativem Stress macht (Gautier et al. 2008).

Ein weiterer Gegenspieler der MARK2-Phosphorylierung könnte die Phosphorylierung von COX5B durch die cAMP-abhängige PKA sein. COX5B ist Bindungspartner der regulatorischen Bindungsstelle RI α der PKA (Yang et al. 1998). Es zeigte sich, dass COX5B bei einer hohen ATP/ADP-Ratio cAMP-abhängig durch PKA phosphoryliert wird und dies zu einer ATP-Inhibition der COX-Aktivität führt. Umgekehrt steigt bei Energiebedarf die Kalzium-Konzentration, führt zu einer Dephosphorylierung von COX5B, dadurch zur Aufhebung der ATP-Inhibition der COX-Aktivität und somit zu einer gesteigerten Respiration (Kadenbach et al. 2000). MARK2 hingegen könnte als CaM-regulierte Kinase bei einem Anstieg der Kalzium-Konzentration durch Phosphorylierung der COX5B die COX-Aktivität verstärken. COX5B müsste dafür einerseits Phosphorylierungsstellen besitzen, welche sich inhibierend auf die COX-Aktivität auswirken, andererseits aber auch solche, welche die COX-Aktivität positiv beeinflussen. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen S81 und S83 könnten hierbei von Bedeutung sein. MARK2 selbst ist ein Beispiel für ein Protein, welches regulatorische Phosphorylierungsstellen enthält. S212 wirkt als inhibitorische und T208 als aktivierende Phosphorylierungsstelle (Timm et al. 2008).

6.6 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MARK2 die Transportgeschwindigkeit von Mitochondrien verlangsamt, sowie die Cytochrom-c-Oxidase Aktivität durch Phosphorylierung der Untereinheit COX5B steigert. Möglicherweise hängen beide Mechanismen miteinander zusammen, da eine erhöhte COX-Aktivität auch zu einem höheren Membranpotential führt und so das Schneiden von PINK1^{FL} zu Δ N-PINK1 fördert (Narendra et al. 2010). Δ N-PINK1 selbst stoppt den Transport von Mitochondrien und wird dabei von MARK2 vermutlich durch Phosphorylierung unterstützt. Der Einfluss von Δ N-PINK1 auf die COX-Aktivität scheint dabei von seinem Effekt auf den Mitochondrientransport losgelöst. Denn einerseits werden die Mitochondrien entsprechend des Energiebedarfes unter anderem Δ N-PINK1 vermittelt gestoppt, andererseits reduziert Δ N-PINK1 aber den Level der COX-Aktivität. PINK1^{FL} hingegen fördert den retrograden Transport der Mitochondrien und wird dabei ebenfalls von MARK2 unterstützt.

Um die genauen Mechanismen von Mitochondrientransport und COX-Aktivität zu klären, wäre es notwendig alle Phosphorylierungsstellen sowohl in PINK1 als auch in COX5B zu identifizieren und zu charakterisieren. Weiterhin müsste nach den Transportkomponenten gesucht werden, welche PINK1 beispielsweise durch Phosphorylierung beeinflusst. Letztlich wäre durch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials oder auch eine Messung der ROS-Bildung eine genauere Beurteilung der Funktionen von MARK2, PINK1 und COX5B auf die mitochondriale Atmung möglich. Durch die Identifizierung der PKA-Phosphorylierungsstellen in COX5B im Vergleich zu den MARK2 Phosphorylierungsstellen ließe sich beurteilen, inwieweit PKA und MARK2 einen antagonistischen Effekt auf die COX-Aktivität haben. Schließlich sollte geklärt werden, wie sich die Parkinson assoziierte PINK1^{T313M}-Mutation auf die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase auswirkt.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel neue Mechanismen, welche zu neurodegenerativen Erkrankungen führen, aufzudecken. Hier konnten nun anhand der Schlüsselkinasen MARK2 und PINK1 neue Möglichkeiten der Regulation des mitochondrialen Transportes, sowie der mitochondrialen Atmung aufgezeigt werden.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Zeitschriftenartikel

Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg Z. Psychiat. Psychisch.-Gerichtl. Med. 64, 1-2:146-148

Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat.Rev.Neurosci. 8:663-672

Beal MF (2005) Mitochondria Take Center Stage in Aging and Neurodegeneration. Ann Neurol 58:495-505

Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, Kesavapany S, Miller DW, Petsko GA, Cookson MR (2005) Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. Proc Natl Acad Sci U S A 102:5703-5708

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003) Biochemie. Spektrum Verlag

Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA, Kurkinen K, Yu SW, Savitt JM, Waldvogel HJ, Faull RL, Emson PC, Torp R, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL (2006) Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. Ann Neurol. 60(5):557-69.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science. 299(5604):256-9.

Braak H and Braak E (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. J.Neural.Transm.Suppl. 53:127-140

Büeler H (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. Experimental Neurology 218:235-246

Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. Cell. 138(4):628-44. Review.

Campain JL, Gao X, Qian M, Eaton JW (2007) Cytochrom-c-Oxidase Activity and Oxygen Tolerance. Journal of Biological Chemistry Vol.282, No.17:12430-12438

Capaldi RA (1990) Structure and assembly of cytochrome c oxidase. Arch Biochem Biophys. 280(2):252-62.

Cardona F, Sánchez-Mut JV, Dopazo H, Pérez-Tur J (2011) Phylogenetic and in silico structural analysis of the Parkinson disease-related kinase PINK1. Hum Mutat. 32(4):369-78.

- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA (2002) Beta amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J. Neurochem.* 80: 89-100
- Chada SR and Hollenbeck PJ (2004) Nerve growth factor signalling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr. Biol.* 14:1272-1276
- Chen Y-M, Gerwin C, Sheng Z-H (2009) Dynein Light Chain LC8 Regulates Syntaphilin-Mediated Mitochondrial Docking in Axons. *The Journal of Neuroscience* 29(30):9429-9438
- Chen H and Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics - fusion, fission, movement, and mitophagy - in neurodegenerative disease. *Human Molecular Genetics.* 18:R169-R176
- Chin JY, Knowles RB, Schneider A, Drewes G, Mandelkow EM, Hyman BT (2000) Microtubule-affinity regulating kinase (MARK) is tightly associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain: a fluorescence resonance energy transfer study. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 59:966-971
- Chisti MA, Bohlega S, Ahmed M, Loualich A, Carroll P, Sato C, St George-Hyslop P, Westaway D, Rogaeva E (2006) T313M PINK1 mutation in an extended highly consanguineous Saudi family with early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol.* 63(10):1483-5.
- Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pagès M, Li XJ, Saudou F, Humbert S (2008) Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J.* 6:2124-34
- Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW (2009) PINK1 function in health and disease. *EMBO Mol Med* 1, 152-165
- Deng H, Jankovic J, Guo Y, Xie W, Le W (2005) Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun* 337:1133-113
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008) Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.* 283(14):9089-100
- Ding TT, Lee SJ, Rochet JC, Lansbury PT Jr. (2002) Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 41(32):10209-17
- Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK - a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89: 297-308
- Drewes G, Ebnet A, Mandelkow EM (1998) MAPs, MARKs, and microtubule dynamics. *Trends Biochem.Sci.* 23:307-311
- Exner N, Treske B, Paquet D, Holmström K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Krüger R, Winklhofer KF, Vogel F, Reichert AS,

- Auburger G, Kahle PJ, Schmid B, Haass C (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27:12413-12418
- Galati D, Srinivasan S, Raza H, Prabu SK, Hardy M, Chandran K, Lopez M, Kalyanaraman B, Avadhani NG (2009). Role of nuclear-encoded subunit Vb in the assembly and stability of cytochrome c oxidase complex: implications in mitochondrial dysfunction and ROS production. *Biochem. J.* 420:439-449
- Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW, Revesz T (2006) PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 129:1720-31
- Gandre-Blabbe S and van der Blik AM. (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol.Biol.Cell.* 19:2402-2412
- Gasser T (2009) Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med.* 11:e22. Review.
- Gautier CA, Kitada T, Shen J (2008) Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *PNAS* vol.105 32:11364-11369
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12:119-131
- Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL (2006) Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J.Cell.Biol.* 173:545-557
- Glenner GG and Wong CW (1984) Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885-890
- Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, Kolch W, Prokisch H, Ueffing M (2006) The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet.* 15(2):223-32.
- Greggio E, Jain S, Kingsbury A, Bandopadhyay R, Lewis P, Kaganovich A, van der Brug MP, Beilina A, Blackinton J, Thomas KJ, Ahmad R, Miller DW, Kesavapany S, Singleton A, Lees A, Harvey RJ, Harvey K, Cookson MR (2006) Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis.* 23(2):329-41.
- Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Letters* 567:96-102
- Haass C and Mandelkow E (2010) Fyn-Tau-Amyloid: A Toxic Triad. *Cell* 142:356-358
- Habermann A, Schroer TA, Griffiths G and Burkhardt JK (2001) Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J.Cell Sci.* 114:229-240

- Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, Singleton A, Hanson M, Johnson J, Weiser R, Gallardo M, Ravina B, Gwinn-Hardy K, Crawley A, St George-Hyslop PH, Lang AE, Heutink P, Bonifati V, Hardy J, Singleton A (2003) Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol.* 54(2):271-4.
- Haque ME, Thomas KJ, D'Souza C, Callaghan S, Kitada T, Slack RS, Fraser P, Cookson MR, Tandon A, Park DS (2008) Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1716-1721
- Hoepken HH, Gispert S, Morales B, Wingerter O, Del Turco D, Mulsch A, Nussbaum RL, Muller K, Drose S, Brandt U, et al. (2007) Mitochondrial Dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiol Dis* 25:401-411
- Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci.* 118:5411-9
- Hurov JB, Watkins JL, Piwnica-Worms H (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr. Biol.* 14:736-741
- Hurov J and Piwnica-Worms H (2007) The Par-1/MARK family of protein kinases: from polarity to metabolism. *Cell Cycle* 6:1966-1969
- Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carri MT, Barone P (2007) Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum Mol Genet.* 16(11):1319-26.
- Ittner LM and Götz J (2010) Amyloid- β and tau – a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 12:67-72
- Jellinger KA (2005) Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) – Eine aktuelle Übersicht. *J.Neurol.Neurochir.Psychiatr.* 1:9-18
- Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol.* 29:933-42
- Kadenbach B (1986) Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis. *J Bioenerg Biomembr.* 18(1):39-54.
- Kadenbach B, Hüttemann M, Arnold S, Lee I, Bender E (2000) Mitochondrial Energy Metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of Cytochrome c Oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* Vol.29, Nos.3/4:211-221
- Kanki T und Klionski DJ. (2008) Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J.Biol.Chem.* 283:32386-32393
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 115(6):727-38.
- Kim HS, Lee JH, Lee JP, Kim EM, Chang KA, Park CH, Jeong SJ, Wittendorp MC, Soe JH, Choi SH, Suh YH (2002) Amyloid beta peptide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. *NeuroReport* 13, 1989-1993

- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 392(6676):605-8.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18:44-51
- Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT Jr. (2002) Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol.* 322(5):1089-102
- Leopold PL, McDowall AW, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST (1992) Association of kinesin with characterized membrane-bounded organelles. *Cell Motil Cytoskeleton.* 23:19-33
- Li Y, D'Aurelio M, Deng J-H, Park J-S, Manfredi G, Hu P, Lu J, Bai Y (2007) An Assembled Complex IV Maintains the Stability and Activity of Complex I in Mammalian Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* Vol.282, No.24:17557-17562
- Lin W, Kang UJ (2008) Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *J Neurochem.* 106:464-74
- Liu W, Vives-Bauza C, Acín-Peréz- R, Yamamoto A, Tan Y, Li Y, Magrané J, Stavarache MA, Shaffer S, Chang S, Kaplitt MG, Huang XY, Beal MF, Manfredi G, Li C (2009) PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS One.* 4(2):e4597.
- Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Mäkelä TP, Hardie DG, Alessi DR (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 23:833-843
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L (2006) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 10: 59-73
- Mandelkow E-M, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starving of synapses. *Neurobiol. Aging* 24, 1079-1085.
- Mandelkow E-M, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E (2004) MARK/Par1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J. Cell Biology* 167:99-110
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298(5600):1912-34.
- Martin LJ, Pan Y, Price AC, Sterling W, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Lee MK (2006) Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J Neurosci.* 26(1):41-50

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL and Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl.Acad.Sci.* 82:4245-4249

Matenia D, Mandelkow EM (2009) The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 34:332-342

Matenia D, Hempp C, Timm T, Eikhof A, Mandelkow E-M (2011, eingereicht) Microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2) turns PTEN-induced kinase 1 (PINK1) on at T313, a mutation site in Parkinson's disease: Effects on mitochondrial transport. *Journal of Biological Chemistry*

Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, Lombardi F, Romano F, Marongiu R, Nerini-Molteni S, Sale P, Vago R, Arena G, Torosantucci L, Cassina L, Russo MA, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G (2010) The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ.* 17(6):962-74.

Miller KE, Sheetz MP (2004) Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 117:2791-2804

Mills RD, Sim CH, Mok SS, Mulhern TD, Culvenor JG, Cheng HC (2008) Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 105:18-33

Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH (2010) Mitofusion 2 Is Necessary for Transport of Axonal Mitochondria and Interacts with the Miro/Milton Complex. *The Journal of Neuroscience* 30(12):4232-4240

Morais VA, Verstreken P, Roethig A, Smet J, Snellinx A, Vanbrabant M, Haddad D, Frezza C, Mandemakers W, Vogt-Weisenhorn D, Van Coster R, Wurst W, Scorrano L, De Strooper B (2009) Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med.* 1(2):99-111.

Morais VA, De Strooper B (2010) Mitochondrial Dysfunction and Neurodegenerative Disorders: Cause or Consequence. *Journal of Alzheimer's Disease* 20:S255-S263

Morris RL and Hollenbeck PJ (1993) The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *Journal of Cell Science* 104:917-927

Müller J, Ritt DA, Copeland TD and Morrison DK (2003) Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J.* 22:4431-4442

Murrey HE and Hsieh-Wilson LC (2008) The Chemical Neurobiology of Carbohydrates. *Chem.Rev.* 108(5):1708-31

Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell. Biol.* Vol.183, No.5:795-803

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8:e1000298

Navarro A, López-Cepero JM, Báñez MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Cadenas E, Boveris A (2008) Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294(2):R501-9.

Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441:1157-1161

Pérez-García E, Torrejón-Escribano B, Ferrer I (2008) Dystrophic neuritis of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathol* 116:261-268

Plowey ED, Cherra SJ 3rd, Liu YJ, Chu CT (2008) Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 105(3):1048-56.

Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N, Wood NW, Martins LM, Downward J (2007) The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol.* 9(11):1243-52

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Die SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047

Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1638-1643

Poon HF, Frasier M, Shreve N, Calabrese V, Wolozin B, Butterfield DA (2005) Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 18(3):492-8

Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L (2007) PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 5:e172

Reddy PH, Beal MF (2005) Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews* 49:618-632

Rensing L, Cornelius G (1988) *Grundlagen der Zellbiologie.* UTB Ulmer

Rintoul GL, Filiano AJ, Brocard JB, Kress GJ, Reynolds IJ (2003) Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J. Neurosci.* 23:7881-7888

Russo GJ, Louie K, Wellington A, Macleod GT, Hu F, Panchumarthi S, Zinsmaier KE (2009) *Drosophila* Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci.* 2009 29(17):5443-55

- Sapir T, Sapoznik S, Levy T, Finkelstein D, Shmueli A, Timm T, Mandelkow EM, Reiner O (2008) Accurate balance of the polarity kinase MARK2/Par1 is required for proper cortical neuronal migration. *J. Neurosci.* 28:5710-5720
- Schmitt-Ulms G, Matenia D, Drewes G, Mandelkow EM (2009) Interactions of MAP/microtubule affinity regulating kinases with the adaptor complex AP-2 of clathrin-coated vesicles. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:661-672
- Sha D, Chin LS, Li L (2010) Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Hum Mol Genet.* 19(2):352-63.
- Silverman DHS, Small GW, Chang CY, Lu CS, de Aburto MAK, Chen W, Czernin SJ, Rapoport SJ, Pietrini P, Alexander GE, Shapiro MB, Jagust WJ, Hoffmann JM, Welsh-Bohmer KA, Alavi A, Clark CM, Salmon E, de Leon MJ, Mielke R, Cummings JL, Kowell AP, Gambhi SS, Hoh CK, Phelps ME (2001) Positron Emission Tomography in Evaluation of Dementia: Regional Brain Metabolism and Long-term Outcome. *Advanced Drug Delivery Reviews* 286:2120-2127
- Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G (2005) Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet.* 14(22):3477-92.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2006) Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci.* 9(10):1231-3.
- Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG and Chan DC (2009) Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Mol. Biol. Cell* vol. 20 no. 15 3525-3532
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063
- Taanmann JW (1997) Human Cytochrome c Oxidase: Structure, Function, and Deficiency. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* Vol.29, No.2:151.163
- Thies E, Mandelkow EM (2007) Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by MARK2/Par-1. *J Neurosci* 27:2896-2907
- Timm T, Li XY, Biernat J, Jiao J, Mandelkow E, Vandekerckhove J, Mandelkow EM (2003) MARKK, a Ste-20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. *EMBO J* 22: 5090-5101
- Timm T, Balusamy K, Li X, Biernat J, Mandelkow E, Mandelkow EM (2008) Glycogen synthase kinase (GSK) 3-beta directly phosphorylates serine 212 in the regulatory loop and inhibits microtubule affinity regulating kinase (MARK) 2. *J Biol Chem* 283:18873-18882
- Timm T, Marx A, Panneerselvam S, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2008) Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. *BMC Neurosci.* 9 (Suppl 2), S9

- Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112: 2355-2367
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 272(5265):1136-44.
- Unoki M, Nakamura Y (2001) Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20:4457-4465
- Valente EM et al. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RLA, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrané J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S (2009) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *PNAS* doi:10.1073/pnas.0911187107
- Vives-Bauza C, Przedborski S (2010): Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. [Epub ahead of print]
- Wallingford JB and Habas R (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132:4421-4436
- Wang X and Schwarz TL (2009) The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell* 136:163-174
- Walsh DM and Selkoe DJ (2004) Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron* 44:181-193
- Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR, Selkoe DJ (2009) Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48:2045-2052
- West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci* 102(46):16842-7.
- Winklhofer KF, Haass C (2009) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* doi: 10.1016/j.bbdis.2009.08.013
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G, Stanyer L, Hargreaves I, Klupsch K, Deas E, Downward J, Mansfield L, Jat P, Taylor J, Heales S, Duchén MR, Latchman D, Tabrizi SJ, Wood NW (2008) PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 3:e2455
- Yang WL, Iacono L, Tang W-M, Chin K-V (1998) Novel Function of the Regulatory Subunit of Protein Kinase A: Regulation of Cytochrome-c-Oxidase Activity and Cytochrome c Release. *Biochemistry* 37:14175-14180

Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, Vogel H, Lu B (2008) Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(19):7070-5.

Yap L-P, Garcia JV, Han D, Cadenas E (2009) The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:1283-1298

Yu W, Sun Y, Guo S, Lu B (2011) The PINK/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet*. 20(16):3227-40

Zhang YH, Tang BS, Guo JF, Xia K, Xu B, Cai F, Deng HX, Yan XX, Chen T, Cao L, Pan Q, Long ZG (2005) [Mutation analysis of PINK1 gene in Chinese patients with autosomal recessive early-onset parkinsonism type 6]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 85(22):1538-41.

Zhou C, Huang Y, Shao Y, May J, Prou D, Perier C, Dauer W, Schon EA, Przedborski S (2008) The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12022-12027

7.2 Internetquellen

Deutsche Alzheimer Gesellschaft 2010

URL http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01_10.pdf

zuletzt abgerufen am 20.12.2011

2000 - 2011 American Health Assistance Foundation

URL <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html>

zuletzt abgerufen am 19.10.2011

Nature Publishing Group

URL http://www.humphath.com/IMG/jpg_parkinson_pathways_04_2.jpg

zuletzt abgerufen am 19.10.2011

Future Science Group

URL <http://img.medscape.com/article/711/447/711447-fig2.jpg>

Zuletzt abgerufen am 19.10.2011

University of California, San Francisco

URL <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>

zuletzt abgerufen am 19.10.2011

National Library of Medicine

URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

zuletzt abgerufen am 19.10.2011

Rietdorf J, Seitz A

URL http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html

zuletzt abgerufen am 19.10.2011

Technische Universität Dänemark

URL <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

zuletzt abgerufen am 19.10.2011

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Dr. Eva-Maria Mandelkow und Herrn Prof. Dr. Eckhard Mandelkow, dass ich das vorliegende interessante Thema in ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten konnte. Weiterhin danke ich ihnen für die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen.

Herrn Prof Dr. Christian Lohr danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Dorthe Matenia für ihre große Hilfsbereitschaft, die fortwährend konstruktive Kritik und die nützlichen Anregungen bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Xiaoyu Li und Edda Thies für die geduldige Unterweisung im Umgang mit verschiedenen Mikroskopier-Techniken. Herrn Dr. Thomas Timm danke ich für die Unterstützung bei der Phosphopeptidkartierung sowie der Modellierung des PINK1-Strukturmodells. Herrn Dr. Jacek Biernat danke ich für die hilfreichen Diskussionen zu aufgetretenen Problemen und Herrn Dr. Alexander Marx danke ich für seine hilfreichen Anregungen bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin gilt ein großer Dank Annika Eikhof, sowie auch Ilka Lindner und Sabrina Hübschmann, da sie mir jederzeit mit ihren Erfahrungen im Labor zur Seite standen.

Allen hier nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die netten Stunden in privater Runde.

Sehr herzlich danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, für ihre unermüdliche Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Olaf Berger, der jederzeit fest an mich glaubt.