

Charakterisierung der Rolle von PINK1 in Zellmodellen von *Morbus Parkinson*

Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Vorgelegt von Dajana Parganlija
Am 19.09.2011



Die vorliegende Diplomarbeit wurde am Interdisziplinären Zentrum für Neurowissenschaften der Universitätsklinik in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Auburger unter fortlaufender Unterstützung von PD Dr. Marina Jendrach verfasst.

Die Arbeit wird begutachtet von Prof. Dr. Georg Auburger (Experimentelle Neurologie Frankfurt) und Prof. Dr. Enrico Schleiff (Institut für molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt).

Inhaltsübersicht

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XII
Kurzfassung.....	XIII
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	20
3. Ergebnisse.....	43
4. Diskussion und Ausblick.....	94
5. Literaturverzeichnis.....	102
Danksagung.....	111
Erklärung.....	112

2.2.1.6. Umstellung der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen auf ein Galaktose-haltiges Medium.....	33
2.2.1.7. Herstellung der Zelllysate.....	33
2.2.1.8. Behandlung der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen mit H ₂ O ₂	34
2.2.2. Genetische Arbeiten.....	35
2.2.2.1. RNA-Isolation.....	35
2.2.2.2. DNase-Verdau und cDNA-Synthese.....	35
2.2.2.3. Quantitative PCR.....	35
2.2.2.4. DNA-Isolation.....	36
2.2.2.5. Amplifikation der mitochondrialen DNA.....	36
2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.2.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	38
2.2.4. Bestimmung des ATP-Gehaltes.....	40
2.2.5. Respirometrie.....	40
2.2.6. Mikroskopie.....	41
2.2.7. Statistische Analyse.....	42
3. Ergebnisse.....	43
3.1. Genexpression in Zellmodellen von <i>Morbus Parkinson</i>	43
3.1.1. Stabiler knockdown von PINK1 führt bei Serumdeprivation zur Herunterregulation Parkinson-relevanter Gene in SH-SY5Y Zellen.....	44
3.1.2. Transienter knockdown von PINK1 kann die mRNA-Befunde aus den SH-SY5Y Zellen mit stabilem PINK1 KD nicht reproduzieren.....	55
3.1.3. HeLa Zellen mit einem transienten knockdown von PINK1 weisen eine Hochregulation von SH3GLB1 und MFN1 auf.....	58
3.1.4. Kortikale Neurone.....	60
3.1.4.1. Kortikale Neurone aus PINK1 knockout Mäusen zeigen eine Abweichung in der Expression diverser Parkinson-relevanter Gene.....	60
3.1.4.2. PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierende kortikale Neurone zeigen eine Herunterregulation von Map1lc3a, sowie der mitochondrialen Fissionsfaktoren Fis1, Sh3glb1 und Mib.....	64
3.2. PINK1 KD führt bei Serumentzug zu einer Herunterregulation des mitochondrialen Teilungsfaktors FIS1 in SH-SY5Y Zellen.....	66

3.3. Der knockdown von PINK1 verursacht keine Beeinträchtigung der mtDNA-Integrität in den SH-SY5Y Zellen.....	70
3.4. PINK1 KD SH-SY5Y Zellen weisen bei Serumentzug keine erhöhte Sensitivität gegenüber H ₂ O ₂ auf.....	73
3.5. PINK1 KD führt zu einer Verminderung der Energieladung in SH-SY5Y Zellen unter Serumdeprivation.....	74
3.6. Respirometrie.....	75
3.6.1. PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung.....	75
3.6.2. Die Reduktion des Serums und der Glucose im Medium hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung in PINK1 KD SH-SY5Y Zellen.....	78
3.6.3. Mit Glucose- und Serumreduktion vorkultivierte PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung im Galaktose-haltigen Medium.....	80
3.7. Mitochondriale Morphologie.....	83
3.7.1. PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Morphologie bei Serumdeprivation.....	83
3.7.2. PINK1 KD SH- SY5Y Zellen zeigen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Morphologie nach Umstellung auf Galaktose.....	84
3.7.3. Bei Serumdeprivation vorkultivierte PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen keine Abweichung im mitochondrialen Phänotyp nach Aminosäurenentzug.....	86
4. Diskussion und Ausblick.....	94
5. Literaturverzeichnis.....	102
Danksagung.....	111
Erklärung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

- AA/BA Acrylamid / Bisacrylamid
- ANOVA “Analysis of Variance“, einfaktorische Varianzanalyse
- APS: Ammoniumperoxodisulfat
- Atg Autophagie-assoziiertes Gen
- a. u. “Arbitrary Units“, willkürliche Einheiten
- Ca Kalzium
- CaCl₂ Kalziumchlorid
- CCCP Carbonylcyanid- m- chlorophenylhydrazon
- CLSM “Confocal Laser Scanning Mikroskop“, konfokales Laserrastermikroskop
- DBS Deep Brain Stimulation
- DIV “Days *in vitro*“, Tage in Kultur
- DMSO Dimethylsulfoxid
- EDTA Ethylendiamintetraacetat
- ER Endoplasmatisches Reticulum
- Exp. Experiment
- FCS “Fetal Calf Serum“, fetales Kälberserum;
auch FBS (“Fetal Bovine Serum“)
- Fragm. Fragment
- Ggf. gegebenenfalls
- HBSS “Hank`s Buffered Salt Solution“
- HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure
- Höchst 3342 bis Benzimid H 3342 Trihydrochlorid
- Kap. Kapitel
- Kat.-Nr. Katalog-Nummer
- KCl Kaliumchlorid
- KD “knockdown“, Herunterregulierung
- KL8 Klon8 (PINK1 KD SH-SY5Y Zellen)
- KO “knockout“
- Konz. Konzentration
- MEM “Minimum Essential Medium“
- MEM NEAA MEM nicht essentielle Aminosäuren
- Mg Magnesium
- MgCl₂ Magnesiumchlorid
- Mit. mitochondrial

- mtDNA mitochondriale DNA
- MTR Mitotracker Red
- NaCl Natriumchlorid
- NT “non target“
- od. oder
- PAS Präautophagosomale Strukturen
- PBS “Phosphate-Buffered Saline“
- Pen / Strep Penicillin / Streptomycin
- PFA Paraformaldehyd
- QPCR Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
- Rpm “Revolutions per minute“, Drehzahl
- RPMI “Roswell Park Memorial Institute“ (Zellkulturmedium)
- Tab. Tabelle
- TEMED N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
- scrRNA “scrambled“ RNA
- SDS-PAGE Natrium Dodecyl Sulfat- Polyacrylamid
Gelelektrophorese
- siRNA “short interfering“ RNA
- WT Wildtyp
- z. B. zum Beispiel
- z. T. zum Teil

Abbildungsverzeichnis

▪ Abb.1: Molekulare Pathogenese der Parkinson-Erkrankung.....	4
▪ Abb.2: Mitochondriale Dynamik in den Tierzellen.....	7
▪ Abb.3: Molekularer Mechanismus der Mitophagie.....	9
▪ Abb.4: Molekularer Mechanismus der Autophagie.....	12
▪ Abb.5: Regulation der mitochondrialen Biogenese in den Skelettmuskeln durch PGC1 α	14
▪ Abb.6: Die Entstehung und Entgiftung von ROS	15
▪ Abb.7: Die Proliferation von SH-SY5Y NT (non target) und PINK1 KD Zellen bei Serumdeprivation.....	19
▪ Abb.8: PINK1 mRNA Expression in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 10% FCS im Kulturmedium, bzw. unter trophischem Stress (5% FCS im Kulturmedium).....	45
▪ Abb.9: Relative mRNA-Expression diverser an der mitochondrialen Homöostase beteiligten Gene in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS.....	46
▪ Abb.10: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Fissionsfaktoren in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS.....	47
▪ Abb.11: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Fusionsfaktoren in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS.....	48
▪ Abb.12: Relative mRNA-Expression der Autophagie-assoziierten Gene in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS.....	49
▪ Abb.13: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Transkriptionsfaktoren PGC1 α und NRF2 in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS.....	50
▪ Abb.14: Relative mRNA-Expression von α SYNUCLEIN und GLO1 in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS.....	51
▪ Abb.15: Relative mRNA-Expression in SH-SY5Y Zellen mit transientem PINK1 KD 72h nach der Transfektion.....	57
▪ Abb.16: Relative mRNA-Expression in den PINK1 KD HeLa Zellen 48h nach Transfektion.....	59
▪ Abb.17: Relative mRNA-Expression von Pink1 und Map1lc3a in den PINK1 KD und A53T α Synuclein überexprimierenden kortikalen Neuronen nach 28 Tagen in Kultur.....	65

- Abb.18: Relative mRNA-Expression von mitochondrialen Fusions- und Teilungsfaktoren in den PINK1 KD und A53T α Synuclein überexprimierenden kortikalen Neuronen nach 28 Tagen in Kultur.....65
- Abb.19: Relative Proteinexpression des mitochondrialen Teilungsfaktors FIS1 in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumentzug.....68
- Abb.20: Relative Proteinexpression der mitochondrialen Fissionsfaktoren DRP1 und MTP18 in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumentzug.....69
- Abb.21: Relative Proteinexpression des Transkriptionsfaktors PGC1 α in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumentzug.....69
- Abb.22: Relative Proteinexpression der Mitofusine in den bei 5% FCS kultivierten PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen.....70
- Abb.23: Relative Proteinexpression der E3 Ubiquitin Ligase PARKIN in den bei 5% FCS kultivierten PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen.....70
- Abb.24: Das 200bp und das 8,2kb Fragment der mitochondrialen DNA aus den bei 5% FCS und 10% FCS kultivierten NT (non target) und PINK1 KD Klon8 Zellen.....72
- Abb.25: Die Integrität der mtDNA in den bei 5% FCS und 10% FCS kultivierten PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden NT Zellen.....72
- Abb.26: Anteil der überlebenden NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen 24h nach Behandlung mit H₂O₂.....73
- Abb.27: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen (40 000 Zellen), die bei dem regulären FCS-Gehalt von 10% oder unter Serumentzug (5% FCS) kultiviert wurden.....76
- Abb.28: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen (60 000 Zellen), die unter dem üblichen FCS-Gehalt von 10% oder unter Serumentzug (5% FCS) kultiviert wurden.....77
- Abb.29: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei 5% FCS und 2g/L oder 1g/L Glucose im Wachstumsmedium kultiviert wurden.....79
- Abb.30: Extrazelluläre Ansäuerung bei den NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei 5% FCS und 2g/L oder 1g/L Glucose im Wachstumsmedium kultiviert wurden.....80

- Abb.31: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen, die nach der Kultivierung bei 5% FCS und 2g/L Glucose im Medium 24h vor der Messung auf ein Galaktose-haltiges Medium transferiert wurden.....81
- Abb.32: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen, die nach der Kultivierung bei 5% FCS und 1g/L Glucose 24h vor der Messung auf ein Galaktose-haltiges Medium transferiert wurden.....82
- Abb.33: Quantifizierung der Sauerstoffverbrauchsrate bei den NT und PINK1 KD Klon8 Zellen nach Injektion des RPMI.....83
- Abb.34: Mitochondriale Morphologie der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumdeprivation.....84
- Abb.35: Mitochondriale Morphologie der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 10% FCS und Kultivierung in Medium mit Glucose (a) oder Galaktose (b).....85
- Abb.36: Mitochondriale Morphologie der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 5% FCS und Kultivierung in Medium mit Glucose (a) oder Galaktose (b).....86
- Abb.37: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 2h Aminosäurenentzug.....87
- Abb.38: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 4h und 8h Aminosäurenentzug.....88
- Abb.39: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 12h, 16h und 24h Aminosäurenentzug.....89
- Abb.40: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS und 1g/L Glucose kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 4h und 8h Aminosäurenentzug.....91
- Abb.41: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS und 1g/L Glucose kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 12h, 16h und 24h Aminosäurenentzug.....92

Tabellenverzeichnis

▪ Tab.1: In <i>Morbus Parkinson</i> involvierte Genloci.....	2
▪ Tab.2: Allgemein verwendete Utensilien und Geräte.....	21
▪ Tab.3: Zellkulturgeräte und Utensilien.....	22
▪ Tab.4: Allgemeine Chemikalien.....	23
▪ Tab.5: Zellkulturmedien, Zusätze und Kits.....	24
▪ Tab.6: Reagenzien und Kits für genetische Arbeiten.....	25
▪ Tab.7: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Assays.....	26
▪ Tab.8: Reagenzien für biochemische Arbeiten.....	27
▪ Tab.9: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper.....	28
▪ Tab.10: Zusammensetzung der SDS-Gele.....	38
▪ Tab.11: Relative Genexpression der PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen von Okt. bis Dez. 2010 bei 10% FCS und bei 5% FCS im Kulturmedium.....	52
▪ Tab.12: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen von Jan. bis Juni 2011 bei 5% FCS im Kulturmedium.....	53
▪ Tab.13: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 5% FCS und 1g/L Glucose im Kulturmedium.....	54
▪ Tab.14: Relative Genexpression in SH-SY5Y Zellen mit transientem PINK1 knockdown 72h nach der Transfektion.....	56
▪ Tab.15: Relative Genexpression der PINK1KD HeLa Zellen 48h nach Transfektion.....	59
▪ Tab.16: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD kortikalen Neurone nach unterschiedlich langer Kultivierungszeit (14, 20 u. 28DIV).....	61
▪ Tab.17: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD kortikalen Neurone (20 DIV) nach unterschiedlich langer Behandlung mit HBSS (4h, 8h und 12h HBSS).....	62
▪ Tab.18: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD kortikalen Neurone (22DIV und 32DIV) mit und ohne 16h Aminosäuredeprivation.....	63
▪ Tab.19: Relative mRNA-Expression der 17 und 28 Tage kultivierten PINK1 KD und A53T alpha Synuclein überexprimierenden kortikalen Neurone.....	64
▪ Tab.20: Energiegehalt der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 5% FCS im Kulturmedium.....	74

Kurzfassung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Rolle der putativen mitochondrialen Kinase *PINK1* untersucht. Die Mutationen in diesem Gen sind für die PARK6 Form von *Morbus Parkinson* ursächlich. Dies ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche die Lebensqualität der Betroffenen weitgehend beeinträchtigt. Sie wird mit Dopamin-Ersatzmitteln und DBS (*Deep Brain Stimulation*) behandelt, beide nicht frei von Nebenwirkungen. Levodopa können bekannterweise zu schweren Fällen von Dyskinesie führen. Die Aufklärung der physiologischen Rolle von *PINK1* würde den Wissenschaftlern auf dem Weg zur Früherkennung und anderen Therapiemöglichkeiten verhelfen. Die PARK6 Form der Parkinson Erkrankung wird derzeit anhand von verschiedenen Modellorganismen (*M. musculus*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *C. elegans*), sowie von verschiedenen Zellmodellen (*HeLa*, *PC12*, *Fibroblasten aus PARK6 Patienten*) untersucht. Als neuronale Zelllinie eignen sich die SH-SY5Y Zellen besonders gut für die Forschung an der durch den Verlust von dopaminergen Neuronen gekennzeichneten Parkinson-Erkrankung und sind diesbezüglich als ein relevantes Zellmodell breit akzeptiert (Xie et al.2010). In der vorliegenden Diplomarbeit wurden mit einem adenoviralen Konstrukt generierte *PINK1* knockdown SH-SY5Y Zellen (M. Klinkenberg) als ein potentielles Zellmodell für die PARK6 Form von *M. Parkinson* analysiert. Als Kontrolle für die *PINK1*-abhängigen Effekte wurden NT (non target) Zellen herangezogen. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Zellmodells war die Beobachtung, dass die *PINK1* KD SH-SY5Y Zellen bei einer Reduktion des Serumgehaltes im Medium wesentlich langsamer wachsen als die NT Zellen (M. Jendrach). Die Serumdeprivation schien also der notwendige Stressfaktor zu sein, welcher zur Auslösung eines *PINK1*-abhängigen Phänotyps führen könnte. Daraus ergab sich die Frage, welche anderen *PINK1*-abhängigen Veränderungen unter Serumentzug zur Ausprägung kommen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde zunächst die relative Genexpression der *PINK1* KD SH-SY5Y Zellen in Bezug auf die NT Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass der *PINK1* KD bei reduziertem Serumgehalt zur Herunterregulation weiterer Parkinson-relevanter Gene führt, deren Produkte an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind. Die Effekte traten nur bei stabil transfizierten Zellen auf und waren durch einen transienten *PINK1* KD nicht reproduzierbar. Viele dieser Gene sind für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase bedeutsam und deshalb wurde die mitochondriale Funktion und Erscheinung in den *PINK1* KD SH-SY5Y Zellen genauer erforscht. Im Gegensatz zu früheren Befunden (Mai et al. 2010) wurde eine Herunterregulation des für die mitochondriale Teilung zuständigen Fis1-Proteins

ermittelt, darüber hinaus aber keine Änderung der mitochondrialen Morphologie auch nach induziertem Zellstress beobachtet (Dagda et al. 2009, Lutz et al. 2009). Ein Defizit in der mitochondrialen Atmung wurde festgestellt, nachdem die Zellen bei 1g/L Glucose kultiviert und für 24h auf ein Galaktose-haltiges Medium transferiert wurden. Außerdem wurde ähnlich zu Amo et. 2010 al eine leicht verminderte Energieladung der betreffenden Zellen gefunden. Keine Beeinträchtigung der mtDNA-Integrität oder der Überlebensrate bei H₂O₂-induziertem oxidativen Stress wurde beobachtet. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die in den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen beobachteten Veränderungen in der Genexpression auf weitere Zellmodelle (PINK1 KD HeLa, kortikale Neurone aus PINK1 KO und PINK1 KO / A53T alpha Synuclein überexprimierenden Mäusen) übertragbar sind. Dabei wurden einige Gemeinsamkeiten zwischen den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen und den PINK1 KO / A53T α Synuclein überexprimierenden kortikalen Neuronen ermittelt. Angesichts des Verlustes von dopaminergen Neuronen in *M. Parkinson* wäre es bedeutsam nachzuvollziehen, ob und wie die verminderte Expression Parkinson-relevanter Gene in diesen PINK1 KD Zellmodellen kompensiert wird, so dass die Zellen trotz der genetischen Einschränkung bei idealisierten *in vitro* Bedingungen gut überleben können. Hier ist es vorstellbar, dass zusätzlicher Zellstress die Gemeinsamkeiten zwischen den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen und den PINK1 KO / A53T SNCA überexprimierenden Neuronen erweitern könnte. Diesbezüglich wäre es auch relevant zu erforschen, unter welchen Umständen die potentiellen Kompensationsmechanismen versagen, so dass das Zellüberleben nicht mehr gewährleistet wird. Im Licht des altersbedingten Ausbruchs der Symptome bei *M. Parkinson* würden diese neuen Erkenntnisse dazu beitragen, die möglichen auslösenden Faktoren zu erfassen und so ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen dieser schwerwiegenden Erkrankung zu erhalten.

1. Einleitung

Morbus Parkinson ist nach *Morbus Alzheimer* die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, die bei mehr als 1% aller Menschen in einem Alter von 50 Jahren, sowie bei mehr als 3% aller Menschen in einem Alter von über 75 Jahren auftritt (Pankratz 2010). Diese schwerwiegende neurodegenerative Erkrankung wurde erstmals 1817 von dem Londoner Arzt James Parkinson in seinem "Assay on the Shaking Palsy" beschrieben (Gerlach 2007, Kap.1), welches in Detail die Hauptsymptome der Erkrankung darstellt, die auch heute zu ihrer Erkennung und Diagnose herangezogen werden. Laut den Beobachtungen von J. Parkinson beginnt die Krankheit mit einem einseitigen Tremor, der sich innerhalb von einem Jahr auf die andere Körperseite ausbreitet. Daraufhin wird der Gang nach vorne gebeugt und verlangsamt (Bradykinese). Innerhalb der nächsten Jahre werden die Schritte immer kleiner und es kommt zur Fallneigung (posturale Instabilität). Schließlich wird der Patient bettlägerig und auf die Hilfe anderer angewiesen. Seine kognitiven Fähigkeiten bleiben aber unbeeinträchtigt.

Heute weiß man, dass in der frühen Phase dieser Krankheit durchaus unspezifische Symptome auftreten in Form von Hyposmie (Beeinträchtigung des Geruchssinns), Obstipation, Depression und Schlafstörungen (Jendrach et al. 2009). Dafür sind Veränderungen im *Bulbus olfactorius* (Riechkolben) und bestimmten Stammhirnbereichen, dem dorsalen Vaguskerne und den Neuronen des Locus coeruleus verantwortlich. Die im weiteren Verlauf der Krankheit auftretenden lokomotorischen Symptome sind auf die Degeneration der dopaminergen Neurone zurückzuführen, welche von der Substantia nigra des Mittelhirns zum Striatum projizieren. In 20% der Fälle tritt schließlich eine Form von Demenz auf (Pankratz 2010). Die Parkinson-Erkrankung wird symptomatisch mit Dopamin-Substitutionstherapie und DBS (*Deep Brain Stimulation*) behandelt.

Die oben beschriebenen Symptome treten bei einer Reihe von Störungen auf, die unter dem Begriff Parkinson-Syndrom zusammengefasst werden. Was hier als *Morbus Parkinson* bezeichnet wird, ist die Parkinson-Erkrankung im engeren Sinne, weiter bekannt als primäre Parkinson-Erkrankung. Ihr liegen genetische Mutationen zugrunde, die auf noch ungeklärte Weisen schließlich zum Absterben der dopaminergen Neurone führen. Im Gegensatz dazu sind die Ursachen der sekundären oder symptomatischen Parkinson-Erkrankungen weitgehend geklärt (z.B. Arzneimittel-induzierter Parkinsonismus). Die Parkinson-Erkrankung wird ferner anhand des Alters der Patienten beim Ausbruch der Symptome in die juvenile Form (Ausbruch der Krankheit bis zum 20ten Lebensjahr), die früh eintretende Form (Auftreten der

Symptome vor dem 50ten Lebensjahr) und die spät auftretende Form (Ausbruch der Krankheit nach dem 50ten Lebensjahr) eingeteilt. Bei weniger als 10% der Parkinsonpatienten ist eine klare genetische Grundlage feststellbar, d.h. die meisten Fälle sind sporadischer Natur (Thomas u. Beal, 2007). Bisher wurden 13 Gene entdeckt, deren Mutationen für die Entstehung diverser Formen der Parkinson-Erkrankung ursächlich sind (Tab.1).

Tab1: In *Morbus Parkinson* involvierte Genloci, übernommen nach Thomas u. Beal (2007).

AD = autosomal dominant; AR = autosomal rezessiv

Lokus	Gen	Vererbung	Putative Funktion
PARK1 / PARK4	α Synuclein	AD	presynaptisches Protein, Bestandteil der Lewy-Körperchen
PARK2	Parkin	AR	E3 Ubiquitin Ligase
PARK3	nicht bekannt	AD	nicht bekannt
PARK4	nicht bekannt	AD	nicht bekannt
PARK5	UCH-L1	AD	Ubiquitin C-terminale Hydrolase
PARK6	PINK1	AR	mitochondriale Kinase
PARK7	DJ-1	AR	Chaperon, Antioxidant
PARK8	LRRK2	AD	Kinase
PARK9	ATP13A2	AR	nicht bekannt
PARK10	nicht bekannt	AD	nicht bekannt
PARK11	nicht bekannt	AD	nicht bekannt
PARK12	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
PARK13	HTRA2	nicht bekannt	mitochondriale Serin-Protease

An der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung sind sowohl genetische Ursachen als auch Umwelteinflüsse beteiligt. Dies wird aus dem Verlauf der Krankheit deutlich, deren Symptome trotz des bestehenden genetischen Nachteils erst später im Laufe des Lebens auftreten. Der Verlust von dopaminergen Neuronen scheint also eines multikausalen Ursprungs zu sein, wobei mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress und Proteinphosphorylierung eine Rolle spielen (Thomas u. Beal 2007; Abb.1). Ferner tritt eine abnormale Proteinaggregation auf, die sich in der Lewy-Pathologie äußert. Die Proteinaggregate bestehen unter anderem aus α Synuclein (PARK1 / PARK4; Tab.1) und Ubiquitin und kommen sowohl in den Zellkörpern der Neurone ("Lewy-Körperchen") als auch in ihren Neuriten ("Lewy-Neuriten") vor. Interessanterweise kommen die Lewy-Körperchen in den wenigen überlebenden dopaminergen Neuronen vor (Bauza

u. Przedborski 2010), so dass noch nicht klar ist, ob sie eine Toxizität aufweisen oder einen möglichen Kompensationsmechanismus der Neurone darstellen, die überschüssigen nicht abgebauten Proteine in einer für die Zelle möglichst unschädlichen Form abzulagern. Eine Störung der Funktion des proteasomalen Systems (UPS) erfolgt, welche höchstwahrscheinlich zu ER-Stress und mitochondrialer Dysfunktion führt. Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion führt wiederum zu einem verminderten ATP-Gehalt in der Zelle, wodurch die proteasomale Aktivität zusätzlich beeinträchtigt und die Bildung weiterer Proteinaggregate begünstigt wird. Die E3-Ubiquitin Ligase Parkin könnte dabei protektiv wirken, indem sie die Aktivität des UPS fördert und durch die Aktivierung des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (TFAM) die mitochondriale Biogenese induziert. Mutationen in Parkin (PARK2) würden zum Verlust dieser protektiven Funktion führen. Ein weiteres Parkinson-assoziiertes Protein, DJ-1 (PARK7) schützt die Zelle vor oxidativem Stress und wirkt als Chaperon einer Aggregation von α Synuclein entgegen. Die bei PARK8 mutierte Kinase LRRK2 spielt möglicherweise eine Rolle beim Transport von synaptischen Vesikeln, sowie bei der Ausbildung von Neuriten. Mutationen in LRRK2 verursachen eine abnormale Phosphorylierung von Proteinen, die zu einem über die Mitochondrien vermittelten Zelltod führt. PINK1, auf dessen Funktion unten näher eingegangen wird, scheint eine neuroprotektive Wirkung zu haben, die sich hauptsächlich in der Hinderung der Entstehung einer mitochondrialen Dysfunktion äußert. Diverse genetische Nachteile verursachen letztendlich eine Anhäufung verschiedener Zellschäden, die wiederum dazu führt, dass das Zellüberleben nicht mehr gewährleistet werden kann. Dies wird davon bezeugt, dass Parkinson-Patienten häufiger eine Akkumulation von Deletionen in der mitochondrialen DNA aufweisen im Vergleich zu gesunden Individuen im selben Alter (Pallanck 2010). Neurone sind für ihre Energiegewinnung stark auf mitochondriale Atmung angewiesen und sind daher empfindlicher gegenüber mitochondrialen Schäden als andere Zelltypen. Die in dopaminergen Neuronen durch die Oxidation von Dopamin entstehenden Intermediate könnten die Ursache für ihre besonders starke Suszeptibilität gegenüber Zellstress sein, wobei die zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen noch nicht bekannt sind (Izumi et al. 2011).

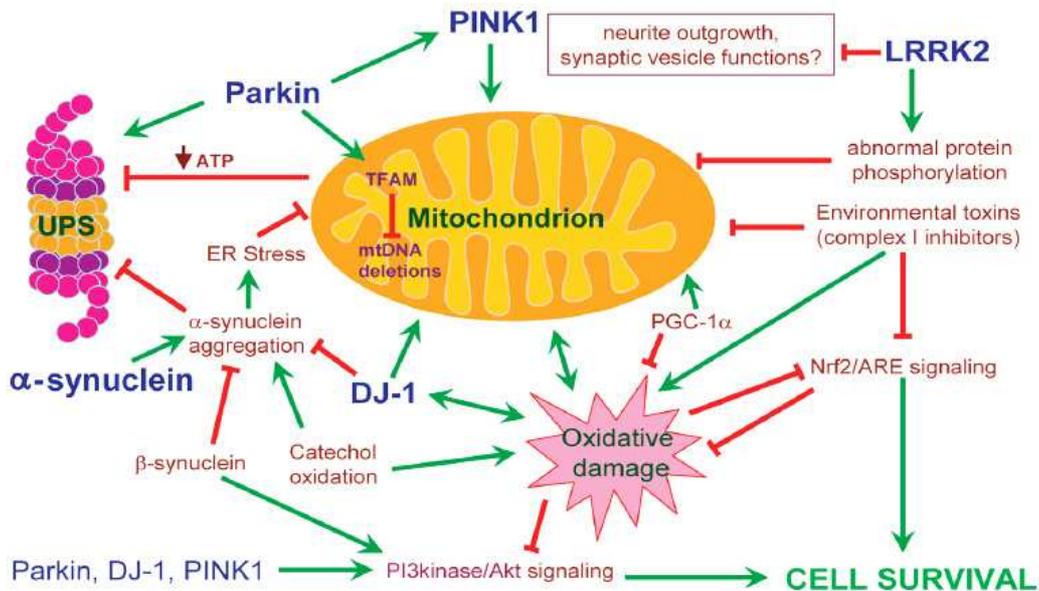


Abb.1: Molekulare Pathogenese der Parkinson-Erkrankung (Thomas u. Beal 2007). Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Interaktion der in die Entstehung der Parkinson-Erkrankung involvierten genetischen Ursachen und Umweltfaktoren. Die zugrundeliegende Beeinträchtigung der Zellphysiologie äußert sich in Form von Dysfunktion des proteasomalen Systems und der Mitochondrien, sowie in der Induktion von ER-Stress, abnormaler Proteinphosphorylierung und Bildung von Proteinaggregaten. In blau sind die in *M. Parkinson* mutierten Gene (α Synuclein, Parkin, DJ-1, PINK1 und LRRK2) dargestellt. Ihre fördernden oder hemmenden Effekte auf bestimmte Aspekte der Zellphysiologie sind durch grüne, bzw. durch rote Pfeile hervorgehoben.

1.1. PARK6 Form von *Morbus Parkinson*

Die PARK6 Form von *M. Parkinson* ist nach der PARK2-assoziierten Parkinson-Erkrankung die zweithäufigste Variante des früh auftretenden Parkinsonismus (Valente et al., 2004; Thomas u. Beal 2007). Sie tritt sporadisch auf, wird autosomal rezessiv vererbt und weist einen frühen Ausbruch etwa in einem Alter von 30 bis 40 Jahren auf (Schneider 2010). Ihr Verlauf ist insofern atypisch, dass sie eine milde Progression aufweist und die Dopaminsubstitution bei ihr eine lang anhaltende Wirkung zu zeigen scheint (Valente, Salvi et al. 2004; Kessler et al. 2005). Allerdings treten nicht selten schwere arzneimittelbedingte Fälle von Dyskinesie auf. Darüber hinaus kann diese Erkrankung schwer zu diagnostizieren sein, da sie bis auf die Zeit ihres Ausbruch und der guten Reaktion auf Levodopa in ihrer klinischen Manifestation der idiopathischen Parkinson-Erkrankung sehr ähnlich sein kann (Albanese et al. 2005).

PARK6 ist am Chromosom 1p35-36 loziert und besitzt 8 Exons (Valente et al. 2004; Schneider u. Klein 2010). Die häufigsten Mutationen sind SNPs (Einzelnukleotidpolymorphismen). Es gibt jedoch auch Fälle von Gendeletionen und Spleißstellenmutationen, die in der Produktion etlicher aberranter mRNAs resultieren (Marongiu et al. 2007). Interessanterweise wird die Expression von PARK6 *in vivo* durch nicht kodierende antisense RNAs reguliert.

Das Genprodukt von PARK6, PINK1 ("Phosphatase and Tensin Homolog Induced Putative Kinase 1") ist ein 581 Aminosäuren langes Protein mit einer N-terminalen mitochondrialen Lokalisierungssequenz und einer dem Cytosol zugekehrten Kinase-Domäne (Zhou et al. 2008). Seine Kinase Domäne ist stark konserviert und ähnlich zu den von Serin / Threonin Kinasen der Ca²⁺ Calmodulin Familie. Aufgrund seiner Lokalisierung und der Gegenwart einer Kinase-Domäne wird dem PINK1 eine putative Rolle in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase zugeschrieben, deren genauer Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Mehrere Befunde deuten darauf hin, dass Mutationen in PINK1 die Form und Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen. So wurde über ein Defizit in der mitochondrialen Respiration, sowie über Mutationen in der mitochondrialen DNA in Zellmodellen von PARK6 *M. Parkinson* berichtet (Gautier et al. 2008, Papa et al. 2009, Gegg et al. 2009). Nach neueren Erkenntnissen könnte der Einfluss von PINK1 auf die mitochondriale Atmung durch eine Regulation der mitochondrialen Fission zustande kommen (Liu et al. 2011). In diesem Zusammenhang zeigen einige Befunde, dass ein Verlust der PINK1-Funktion vor allem die Aktivität von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette beeinträchtigt (Morais et al. 2009, Amo et al. 2011). Außerdem wurde über eine Fragmentierung der Mitochondrien sowohl infolge eines stabilen PINK1 knockdowns (Dagda et al. 2009) als auch infolge eines akuten PINK1 KD (Lutz et al. 2009) in Parkinson Zellmodellen berichtet. Darüber hinaus wurde bereits veröffentlicht, dass PINK1 das mitochondriale Chaperon TRAP phosphoryliert (Pridgeon et al. 2007; Mai et al. 2010) und folglich an der oxidativen Stressantwort beteiligt sein könnte. Im Kontext der mitochondrialen Stressantwort wurde darüber hinaus eine Wechselwirkung zwischen PINK1 und der mitochondrialen Protease OMI (HTRA2) ermittelt (Plun-Favreau et al. 2007). Die vielleicht am besten erforschte Funktion von PINK1 ist seine Beteiligung an der Mitophagie durch die Rekrutierung der E3-Ubiquitin Ligase PARKIN an beschädigte, durch vermindertes Membranpotential gekennzeichnete Mitochondrien (Koh u. Chang 2010, Kim et al. 2008, Deng et al. 2008, Exner et al. 2007). Das PINK1 Protein ist allerdings nicht nur an dem Abbau der Mitochondrien beteiligt, sondern fördert auch die Autophagie (Michiorri et al. 2010). PINK1 scheint somit verschiedene Aspekte der Zellphysiologie zu beeinflussen, wobei allerdings seine Beteiligung an der

Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase unter anderem durch eine mögliche Regulation der mitochondrialen Dynamik und der Mitophagie seine prominenteste Rolle verbleibt.

1.2. Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind als Energiehersteller von größter Bedeutung für das Zellüberleben. Von der Aktivität ihrer ATP-produzierenden Atmungskette ist das Zustandekommen energieverbrauchender zellulärer Prozessen abhängig. Neben der ATP-Produktion sind sie auch an folgenden Bereichen der zellulären Physiologie beteiligt:

- Oxidation von Pyruvat,
- Citrat-Zyklus,
- Aufrechterhaltung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase,
- Amino- und Fettsäurenstoffwechsel,
- Metabolismus von Steroiden,
- Herstellung der Fe-S Cluster für diverse Enzyme,
- Häm-Biosynthese,
- Phospholipidproduktion,
- Apoptose.

Diese lebenswichtigen Funktionen der Mitochondrien müssen im Kontext ihrer außerordentlich dynamischen Struktur koordiniert werden. Mitochondriale Dynamik umfasst die dauernd auftretenden Vorgänge der Fission (Teilung) und Fusion, sowie der Migration der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli (Bereiter-Hahn u. Jendrach, 2010). Durch die Fission werden einzelne Mitochondrien von dem sich in ständigem Umbau befindenden tubulären Netzwerk abgetrennt und verhalten sich vorübergehend bis zur darauffolgenden Fusion als einzelne Organellen. Die Fusion und Teilung der Mitochondrien sind verhältnismäßig schnelle Vorgänge, die je nach Stimulus innerhalb von einer Minute stattfinden können (Youle u. Karbowski 2005; *Abb. 2a*).

Die Fusion der Mitochondrien geschieht in zwei Schritten. Zunächst findet die durch die Interaktion von MFN1 (*Mitofusin 1*) und MFN2 (*Mitofusin 2*) zustande kommende Fusion der mitochondrialen Außenmembran statt (Youle u. Karbowski 2005; *Abb. 2b*). Diese teils in die mitochondriale Außenmembran eingebetteten Proteine besitzen eine N-terminale GTPase und eine C-terminale "coiled-coil" Domäne, die dem Cytosol zugekehrt sind. Durch ihre C-terminalen Domänen können die Mitofusine Homo- oder Heterooligomere bilden, welche die Mitochondrien in eine ausreichende räumliche Nähe bringen, damit die Fusion stattfinden kann. Im zweiten

Schritt geschieht die Fusion der inneren mitochondrialen Membranen, an welcher Opa1 (*Optic Atrophy 1*) beteiligt ist. Dafür ist die GTPase Aktivität von Opa1, sowie seine Interaktion mit beiden zu fusionierenden Membranen notwendig. Letztere wird wahrscheinlich durch lösliche, im Intermembranraum lokalisierte Opa1 Proteine stabilisiert.

Die Fusion der Mitochondrien wird durch mehrere Faktoren reguliert (Benard u. Karbowski 2009). MIB wird derzeit als ein Inhibitor der mitochondrialen Fusion diskutiert. Dieses Protein interagiert mit den Mitofusinen, wobei es wahrscheinlich ihre GTPase Aktivität hemmt. Dadurch wird gewährleistet, dass keine GTP-Spaltung stattfindet bis die Mitochondrien in eine geeignete räumliche Nähe gebracht werden. Ferner wurde STOML2 (SLP2) als ein mit MFN2 interagierender Faktor identifiziert, der für die stressinduzierte mitochondriale Hyperfusion notwendig ist (Tondera et al. 2009). Mitochondriale Fusion wird darüber hinaus durch PLD6 (*Phospholipase D6*, MitoPLD) induziert, welche außerdem an der Regulation der mitochondrialen Fission, Migration, Ca^{2+} -Homöostase und der Energieproduktion beteiligt sein könnte (Hunag u. Frohman 2009).

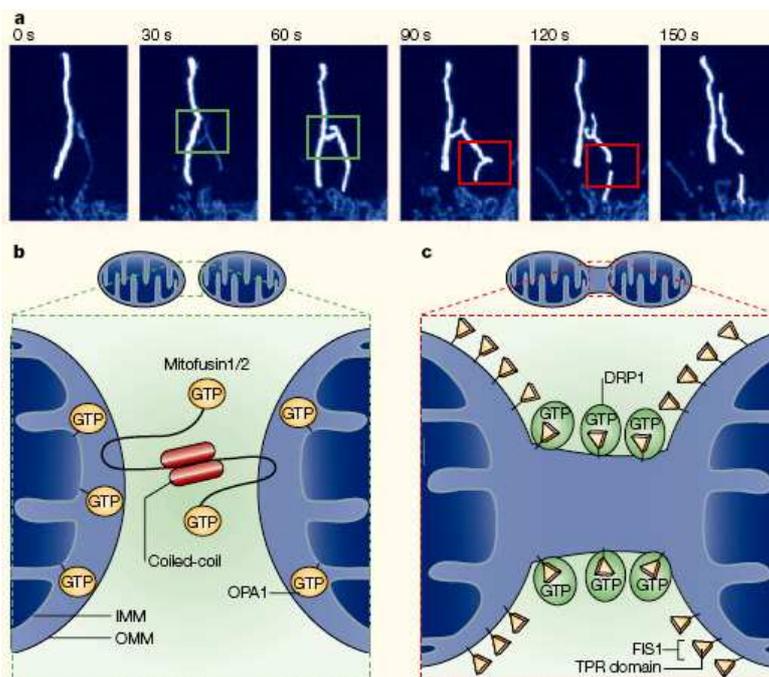


Abb.2: Mitochondriale Dynamik in den Tierzellen (Youle u. Karbowski 2005). Gezeigt sind: a) konfokale Fluoreszenzaufnahmen von einem Fusionsereignis (grüner Kasten) und einem Fissionsereignis (roter Kasten); b) molekulare Grundlagen der mitochondrialen Fusion: Mitofusin-Oligomere an den mitochondrialen Außenmembranen bringen diese näher aneinander heran und bewirken ihre Fusion, auf welche die durch die GTPase Opa1 zustande kommende Fusion der Innenmembranen folgt; c) molekularerer Mechanismus der mitochondrialen Teilung: das in die mitochondriale Außenmembran eingebettete Fis1-Protein rekrutiert die GTPase Drp1, woraufhin diese einen Ring um den mitochondrialen Tubulus herum bildet. Durch die Konstriktion dieses Ringes wird das Mitochondrium in zwei Tochterorganellen geteilt.

Die Fission der Mitochondrien kommt durch die Interaktion der Teilungsfaktoren Drp1 (*Dynamamin Related Protein 1*) und Fis1 (*Fission 1*) zustande. Fis 1 ist in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert und rekrutiert Drp1 aus dem Cytosol. Darauffolgend werden aus Drp1-Proteinen bestehende Ringstrukturen um die Mitochondrien herum gebildet, welche sich anschließend zusammenziehen. Die erwähnte Konstriktion des Drp1-Mantels wird durch die GTPase Aktivität dieses Proteins ermöglicht und bewirkt die Trennung eines tubulären Mitochondriums in zwei Tochterorganellen (Youle u. Karbowski 2005; *Abb. 2c*). Der genaue Mechanismus der dabei auftretenden Teilung der inneren mitochondrialen Membran ist noch nicht bekannt.

Der beschriebene Mechanismus ist heutzutage der am besten erforschte Weg der mitochondrialen Fission. Darüber hinaus gibt es aber weitere Faktoren, deren Beteiligung an der mitochondrialen Fission zwar ermittelt, aber noch nicht vollständig geklärt ist. So wurden beispielsweise MTP18, SH3GLB1 und GDAP1 als stromabwärts von Drp1 wirkende Teilungsfaktoren identifiziert (Ježek u. Hlavat 2009). SH3GLB1 scheint auch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt zu sein, die eine Verformung von Membranen benötigen, beispielsweise an der Autophagie, dem Vesikeltransport und der Apoptose (Takahashi et al. 2009). Darüber hinaus gibt es einen Drp1-unabhängigen Weg der mitochondrialen Fission, an dem MFF (*Mitochondrial Fission Factor*) beteiligt ist. Die mitochondriale Ubiquitin Ligase MARCH5 ubiquitiniert Mitofusine, Drp1 und Fis1 bei Säugern (Westermann 2010). Nach neuesten Erkenntnissen assoziiert das für PARK1 / PARK4 kausale α Synuclein mit den Mitochondrien, wobei es als Fissionsfaktor fungiert (Nakamura et al. 2011).

Die im Laufe der mitochondrialen Fission entstandenen Tochtermitochondrien können sich in ihrem Membranpotential unterscheiden, was ihr weiteres Schicksal bestimmen kann. Mitochondrien mit einem niedrigeren Membranpotential weisen eine geringere Tendenz zur Fusion auf und werden bevorzugt durch die Mitophagie abgebaut.

1.3. Molekulare Mechanismen der Mitophagie

Unter Mitophagie wird der Einschluss der Mitochondrien in membranumgebene Strukturen (Autophagosomen) verstanden, die anschließend mit den Lysosomen verschmelzen. In den Lysosomen werden die Mitochondrien durch die Tätigkeit verschiedener Enzyme abgebaut und ihre Komponenten an das Cytosol abgegeben, wo sie in verschiedenen zellulären Prozessen verwendet werden können.

Ein putativer Mechanismus der Mitophagie nach Jin et al. schließt eine Interaktion zwischen der mitochondrialen Kinase PINK1 und der E3 Ubiquitin Ligase Parkin ein (Abb.3). Er beruht unter anderem auf den Befunden, dass Parkin als ein stromabwärts von PINK1 agierender Faktor fungiert (Exner et al. 2007). Laut diesem Modell wird PINK1 im Cytosol synthetisiert und durch seine N-terminale Lokalisierungssequenz zu den Mitochondrien geleitet, wo es durch das TOM/TIM Proteinimportsystem zunächst in die innere mitochondriale Membran eingebaut wird. Daraufhin wird sein N-terminales Peptid durch die MMP (*Mitochondrial Processing Protease*) abgespalten. Die so entstandene 60kDa Form von PINK1 wird weiterhin durch die rhomboide Protease PARL zu einer 52kDa Form prozessiert, die anschließend durch eine MG132-sensitive Protease abgebaut wird. Mehrere Befunde sprechen für die PARL-vermittelte Prozessierung von PINK1 (Meissner et al. 2011; Deas et al. 2011). Bei beschädigten Mitochondrien ist der Import von PINK1 beeinträchtigt, so dass dieses Protein in der mitochondrialen Außenmembran verbleibt und die E3-Ubiquitin Ligase Parkin rekrutieren kann. Das latente Parkin wird durch diese Interaktion zusätzlich aktiviert (Kim et al. 2008; Matsuda et al. 2010).

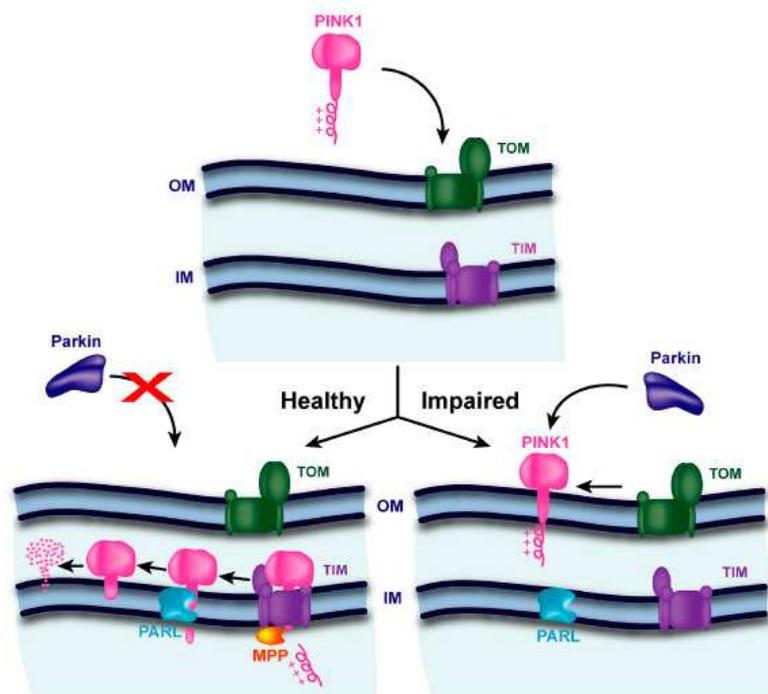


Abb.3: Molekularer Mechanismus der Mitophagie (Jin et al. 2010). Die Serin/Threonin Kinase PINK1 wird durch ihre N-terminale Sequenz an die Mitochondrien geleitet und im Falle von einem gesunden Mitochondrium durch die TOM / TIM Proteinimportsystem in die mitochondriale Innenmembran eingebracht, woraufhin ihr N-terminales Peptid durch die MMP (*Mitochondrial Processing Protease*) abgespalten und sie selbst durch die rhomboide Protease PARL und die MG132-sensitive Protease abgebaut wird. Bei beschädigten Mitochondrien verbleibt das PINK1 dagegen in der Außenmembran. Daher kann die E3 Ubiquitin Ligase Parkin an die Mitochondrien rekrutiert und die Mitophagie eingeleitet werden.

Ein alternatives Modell von Matsuda u. Tanaka (2010) besagt, dass die Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials die PINK1-spaltende Protease hemmt und dass demzufolge und nicht durch den fehlgeschlagenen Import das PINK1 in seiner unveränderten Form an den Mitochondrien stabilisiert wird. Dieses Modell ist mit dem von Jin et al. nicht vollständig vereinbar, da es keinen Einbau des PINK1 Proteins in die mitochondriale Innenmembran vorsieht.

Nach der Translokation von Parkin an die Mitochondrien bewirkt dieses Protein die Ubiquitinierung der mitochondrialen Außenmembranproteine, wodurch das Einschließen der Mitochondrien in Autophagosomen eingeleitet wird. Potentielle Kandidaten für die Ubiquitinierung durch Parkin sind dabei die Mitofusine (MFN1 u. MFN2), was nicht nur den Vorteil der Markierung beschädigter Mitochondrien für weiteren Abbau mit sich bringt, sondern diese auch zusätzlich vom mitochondrialen Netzwerk trennt, so dass sie leichter in Autophagosomen eingeschlossen werden können (Rakovic et al. 2011). Außerdem ist so die Fusion irreparabel beschädigter mit gesunden Mitochondrien verhindert. Dies korreliert mit den Befunden, dass PINK1 und Parkin die mitochondriale Fission fördern oder auch die mitochondriale Fusion hemmen (Deng et al. 2008). Schließlich erfolgt der Abbau der Mitochondrien nach den allgemeinen Prinzipien der Autophagie (1.4.).

Als interessante Frage verbleibt, wie das mitochondrial lokalisierte PINK1 das cytosolische Parkin rekrutiert. Dabei ist die Beteiligung weiterer Interaktoren denkbar. Darüber hinaus wäre es von Bedeutung zu wissen, wie die Mitophagie in den Zellen, die kein Parkin exprimieren erfolgt (z.B. HeLa Zellen; Denison et al. 2003) und ob abgesehen von dem mitochondrialen Abbau in Retikulozyten auch in anderen Zellen gesunde Mitochondrien im Rahmen von einem "steady state turnover" abgebaut werden können. Letzteres wird z.B. durch die Befunde aus Hepatozyten belegt, in denen bei hungerinduzierter Mitophagie kein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials vor der Markierung der Mitochondrien mit LC3 auftritt (Chu 2011).

1.4. Molekulare Grundlagen der Autophagie

Autophagie dient dem Abbau von Zellbestandteilen in Lysosomen. Bislang wurden 32 verschiedene Autophagie-assoziierte Gene (*Atgs*) in der Hefe identifiziert (Glick et al. 2010). Viele dieser Gene sind auch Spezies-übergreifend konserviert.

Die Autophagie wird in Makro- und Mikroautophagie, sowie in Chaperon-vermittelte Autophagie unterteilt (Glick et al. 2010). In der Makroautophagie werden die abzubauenen Zellkomponenten in Autophagosomen eingeschlossen und so den Lysosomen zugeführt. In der Mikroautophagie hingegen werden diese durch eine

Einstülpung der lysosomalen Membran direkt in die Lysosomen aufgenommen. Beide Mechanismen können selektiv und nicht selektiv erfolgen. In der Chaperon-vermittelten Autophagie binden die abzubauenden Proteine im Cytosol an Chaperone, welche von LAMP2 (*Lysosomal-associated Membrane Protein 2*) erkannt werden. Daraufhin werden die Substrate in die Lysosomen transloziert, wo sie entfaltet und abgebaut werden.

Die Autophagie beginnt mit der Bildung einer Isolierungsmembran (Phagophor), welche sich ausdehnt, abzubauende Substrate einschließt und dabei zu einem von zwei Membranen umgebenen Autophagosom wird. Bei der Hefe entwickelt sich das Phagophor aus einer einzigen Isolierungsstruktur namens PAS (*Preautophagosomal Structure*), die wahrscheinlich durch die Verschmelzung kleinerer Vesikel entsteht (Youle u. Narendra 2011). Dagegen ist die Entstehung des Phagophors in Säugerzellen multifokal, d.h. verschiedene Zellorganellen können die dafür benötigten Membrankomponenten beisteuern (ER, trans Golgi-Apparat, Endosomen). Die Entstehung des Phagophors wird durch den Komplex aus Beclin1 und der PI3-Kinase Vps34 an den daran beteiligten Zellorganellen reguliert (Glick et al. 2010; Abb.4). Dabei bildet Vps34 Phosphatidylinositol-Triphosphat (PI3P), welches als Signalmolekül für die Rekrutierung weiterer Atgs an das naszierende Phagophor fungiert. Auf diese Initiationsschritte folgend sind zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme an der Autophagie beteiligt (Cherra et al. 2010). Im Atg12 System wirkt Atg7 als eine E1 und Atg10 als eine E2 Ligase und sie konjugieren Atg12 an Atg5. Der so gebildete Komplex bindet durch Atg16L an das entstehende Autophagosom und bleibt während der Reifung des Autophagosoms daran gebunden. Durch die Tätigkeit des zweiten Ubiquitin-ähnlichen Systems wird das LC3 (*Microtubule-associated Protein Light Chain 3*) prozessiert. LC3 wird von Atg8 kodiert und weist in Säugerzellen zwei Homologe auf, GABARAP und GATE16. Das cytosolische LC3I wird durch Atg3, Atg4 und Atg7 prozessiert und an die Phospholipide der entstehenden autophagosomalen Membran konjugiert. Dies bewirkt wahrscheinlich die Elongation, Biegung und das Ineinanderschließen der autophagosomalen Membran. Das reife Autophagosom fusioniert schließlich mit einem Lysosom, woraufhin die abzubauenden Substrate durch saure Hydrolasen enzymatisch abgebaut werden. Die entstehenden Nebenprodukte dieses Abbaus inklusive des inzwischen internalisierten LC3 werden durch lysosomale Permeasen und andere Transporter an das Cytosol abgegeben.

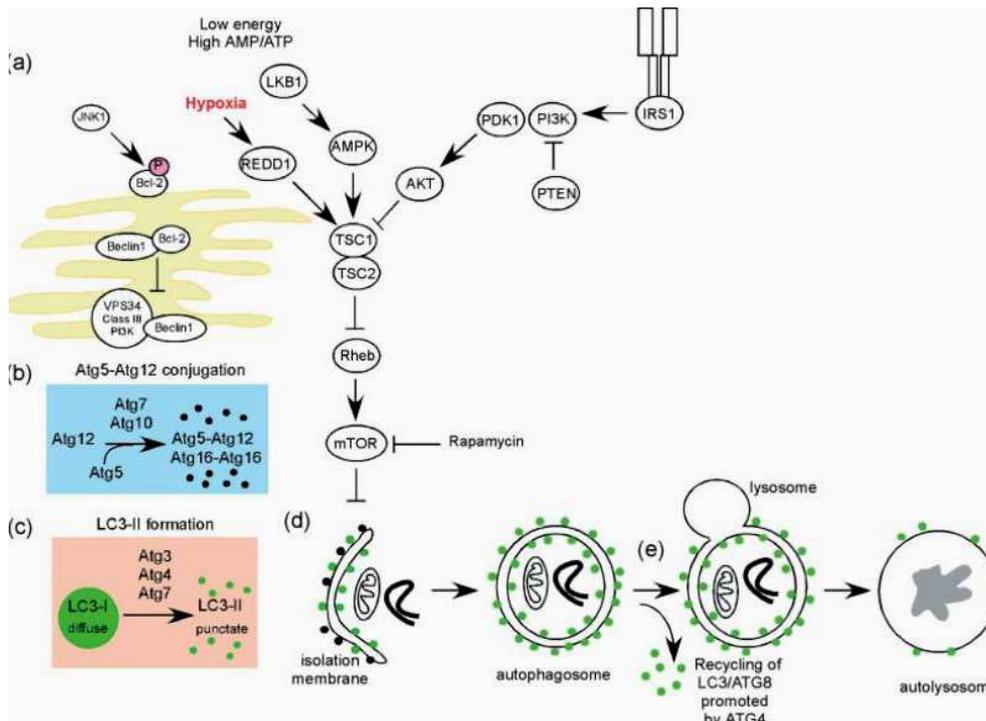


Abb.4: Molekularer Mechanismus der Autophagie (Glick et al. 2010). Dargestellt sind die vier Phasen der Bildung eines Autophagosoms (a-d) und der anschließende Abbau von Zellkomponenten im Lysosom. Die Bildung der Isolierungsmembran (Phagophor) wird durch den Beclin1/Vps34- Komplex reguliert (a). Darauf folgen die Konjugation von Atg5 an Atg12 und die Prozessierung von LC3, welche die Verlängerung des Phagophors ermöglichen. Dadurch werden abzubauenen Zellkomponenten allmählich eingeschlossen (b, c). Die Bindung des LC3 and die Isolierungsmembran führt zu ihrer Verlängerung und Biegung, woraufhin durch den Zusammenschluss ihrer freien Enden das reife Autophagosom entsteht. Dieses fusioniert mit einem Lysosom, dessen saure Hydrolasen den Abbau der Substrate bewirken (e). Die Nebenprodukte des Abbaus und das LC3 werden schließlich an das Cytosol abgegeben.

Die Regulation der Autophagie erfolgt hauptsächlich durch den mTOR-Signalweg. mTOR ist dabei ein negativer Regulator dieses Vorgangs. Unter bestimmten Umständen (Hypoxie, niedriger ATP-Gehalt der Zelle) wird die Aktivität von mTOR durch den AMP-Kinase Signalweg inhibiert und folglich die Autophagie induziert. Autophagie wird ferner durch die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf den Insulin-Rezeptor, sowie auf andere Rezeptoren, welche die Klasse I der PI3-Kinasen und Akt aktivieren, reguliert (Glick et al. 2010; Abb.4).

Nach neusten Erkenntnissen besteht eine Interaktion zwischen PINK1 und Beclin1, die sich positiv auf die Induktion der Autophagie auswirkt (Michiorri et al. 2010; Cui et al. 2011).

1.5. Mitochondriale Biogenese

Mitochondrien können nicht *de novo* entstehen. Die Regulation der mitochondrialen Masse und ihrer Zahl geschieht vielmehr durch den Einbau neuer Bestandteile in existierende Mitochondrien (Vergrößerung des mitochondrialen Netzwerks) und die Aufrechterhaltung eines bestimmten Gleichgewichts zwischen mitochondrialer Fusion und Teilung. Dies ist ein komplexer Vorgang, welcher die Synthese und gegebenenfalls Import von mitochondrialen Bausteinen, sowie die Replikation der mitochondrialen DNA einschließt. Da die meisten mitochondrialen Proteine kernkodiert sind, setzt das außerdem eine Koordination zwischen der Expression der nukläeren und der mitochondrialen Gene voraus (Arduino et al. 2011).

Der wichtigste Faktor für die Koordination der nukläeren und der mitochondrialen Genexpression ist PGC1 α (Hood et al. 2006; *Abb.5*). PGC1 α wird durch die AMP-Kinase (*AMP Activated Protein Kinase*) aktiviert, welche eine Verringerung des ATP-Gehaltes der Zelle wahrnimmt und daraufhin in den Nukleus transloziert. Im Nukleus angelangt, bewirkt die AMPK eine Aktivierung von PGC1 α , welcher anschließend seine eigene Expression, sowie die Expression von NRF1 und NRF2 positiv steuert. NRF1 (*Nuclear Respiratory Factor 1*) und NRF2 regulieren wiederum die Transkription diverser nukläeren Gene, darunter auch der Gene für mitochondriale Proteine. Eines von den NRF1-regulierten Gene ist TFAM (*Mitochondrial Transcription Factor A*), welches ähnlich zu den anderen NEMPs (*Nuclear Encoded Mitochondrial Proteins*) nach seiner Synthese im Cytosol in die Mitochondrien importiert wird. TFAM seinerseits reguliert die Expression von mitochondrialen Genen, deren Produkte sich mit bestimmten NEMPs zusammenlagern und funktionelle Einheiten der mitochondrialen Atmungskette bilden. Diese Ereignisse ermöglichen somit auch die Versorgung der Mitochondrien mit neuen Bausteinen, die in einer Ausdehnung des mitochondrialen Netzwerks resultieren kann ("mitochondriale Biogenese"). Der mitochondriale Phänotyp wird darüber hinaus durch die bereits beschriebenen Vorgänge ihrer Fusion und Teilung (1.2.) und der Mitophagie (1.3.) bestimmt.

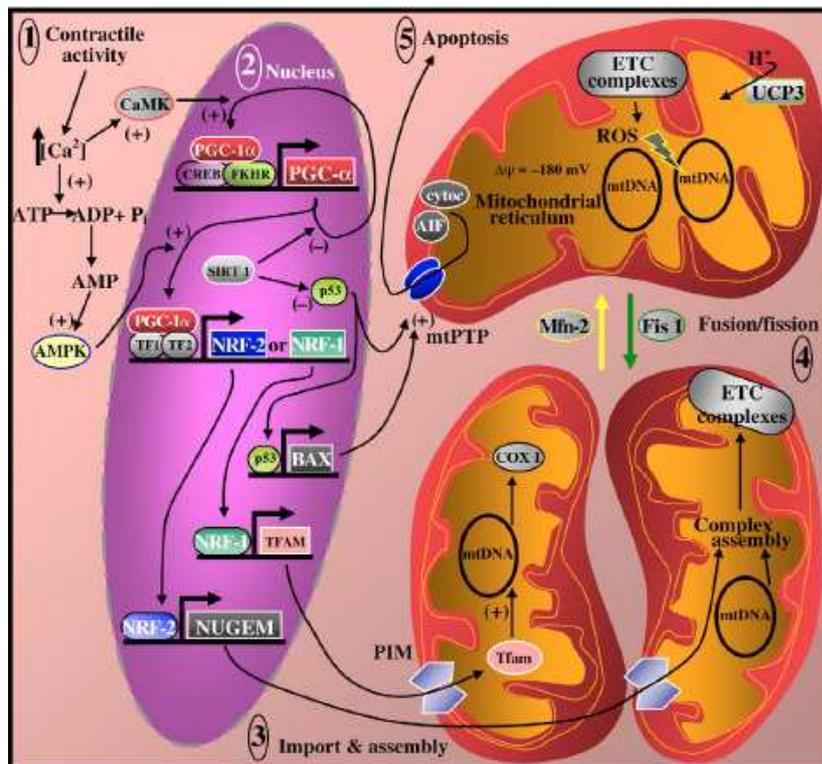


Abb.5: Regulation der mitochondrialen Biogenese in den Skelettmuskeln durch PGC1α. Infolge von einer Verringerung des ATP-Gehaltes in der Zelle wandert die AMPK in den Zellkern, wo sie PGC1α aktiviert. Anschließend steuert das aktivierte PGC1α seine eigene Expression, sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren NRF1 und NRF2. Diese wiederum induzieren die Expression der Gene für mitochondriale Proteine (NUGEMPs), darunter auch die Expression von TFAM. Die NEMPs (*Nuclear Encoded Mitochondrial Proteins*) werden in die Mitochondrien importiert, wo sie verschiedene Funktionen ausüben können. So reguliert TFAM die Expression mitochondrialer Gene, deren Produkte zusammen mit NEMPs funktionelle Einheiten der Atmungskette bilden.

1.6. Oxidativer Stress und sein Einfluss auf die mitochondriale DNA

ROS (*Reactive Oxygen Species*) sind kleine sauerstoffhaltige freie Radikale, welche durch ihre ungepaarten Valenzelektronen extrem reaktiv sind und Lipide, Proteine und DNA schädigen können (Patten et al. 2010). Aufgrund der in ihnen lokalisierten Atmungskette sind die Mitochondrien nicht nur die lebenswichtigen Energieproduzenten der Zelle, sondern auch die Hauptquelle von ROS, welche hauptsächlich am Komplex I und Komplex III entstehen. Zwei Prozent des in den Mitochondrien verwendeten Sauerstoffes resultieren in der Produktion von Superoxid (O_2^-). Komplex I produziert Superoxid ausschließlich in der Matrix, während Komplex III dies auch im Intermembranraum vollzieht. Als geladenes Molekül ist Superoxid nicht nur besonders giftig, sondern auch daran gehindert, Membranen frei durchqueren zu

können. Daher verfügen die durch ROS besonders gefährdeten Mitochondrien über etliche Schutzmechanismen, darunter Antioxidantien in Form von α Tocopherol (Vitamin E) und UQH₂, welche die Peroxidation der mitochondrialen Lipide hindern (Costa et al. 2011). Die SODs (*Superoxiddismutasen*) bewirken darüber hinaus die Entgiftung des Superoxids.

Die Kupfer- und Zinkhaltige SOD1 im mitochondrialen Intermembranraum und die Mangan-haltige SOD2 in der mitochondrialen Matrix setzen Superoxid zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) um, welches Membranen frei passieren kann. Daher fungiert H₂O₂ als das hauptsächliche ROS-Signalmolekül. Es wird im Cytosol durch die Glutathion-Peroxidase und in einigen Fällen durch die Katalase zu H₂O entgiftet. Die Transkription der hier genannten Enzyme wird durch NRF2 reguliert, welches wiederum durch das Parkinson-assoziierte DJ-1 aktiviert wird. Eine Verringerung der mitochondrialen ROS-Produktion führt darüber hinaus zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF1 α , welcher verschiedene in den Zellmetabolismus, ihre Proliferation und das Zellüberleben involvierte Gene reguliert (Patten et al. 2010).

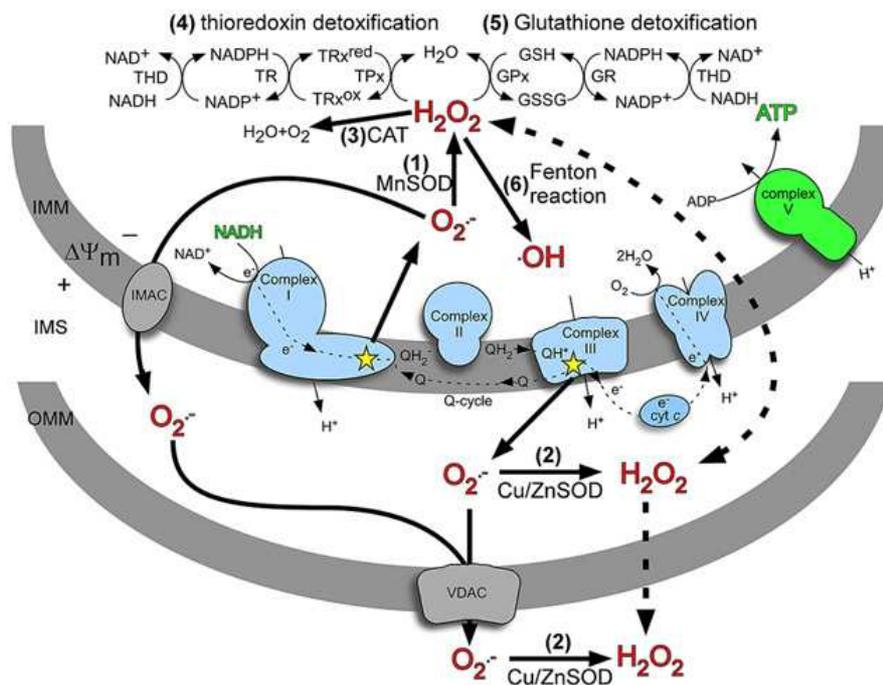


Abb.6: Die Entstehung und Entgiftung von ROS (Batty et al. 2009). Reaktive Sauerstoffspezies werden hauptsächlich in Form von Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) am Komplex I und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette gebildet. $O_2^{\cdot -}$ wird durch die Cu / Zn Superoxid-Dismutase I (SOD1) im mitochondrialen Intermembranraum, sowie durch die Mn SOD2 in der mitochondrialen Matrix zu H_2O_2 umgesetzt, welches anschließend im Cytosol durch die Glutathion-Peroxidase zu H_2O entgiftet wird.

Die erste und stärkste Implikation, dass ROS in die Entstehung der Parkinson-Erkrankung involviert sein könnten, kam von der Beobachtung, dass in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten Anzeichen für mitochondriale Dysfunktion und oxidative Schäden vorhanden waren, beispielsweise die Erhöhung des 8-Hydroxyguanin-Gehaltes (Alam et al. 1997). Ferner wurde oxidativer Stress anhand von *in vitro* Untersuchungen mit der PINK1 Form der Parkinson Erkrankung in Verbindung gebracht, indem unter anderem gezeigt wurde, dass ein Verlust der PINK1-Funktion eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress verursacht (Gautier et al. 2008, Dagda et al. 2009, Klinkenberg et al. 2010). Der putative Mechanismus dieser protektiven Funktion von PINK1 soll durch die Phosphorylierung des mitochondrialen Chaperons Trap1 stattfinden (Pridgeon et al. 2007). Weiterhin wurden durch oxidativen Stress bedingte Schäden in der mitochondrialen DNA beobachtet (Jendrach et al 2008; Aliev et al. 2011). Es ist also denkbar, dass eine durch den Verlust von PINK1 bedingte Einschränkung der oxidativen Stressantwort zu einer vermehrten Schädigung der mitochondrialen DNA führt, die letztendlich eine mitochondriale Dysfunktion verursacht, was dann weiterführende Implikationen für eine Beeinträchtigung der Zellphysiologie mit sich bringt.

Mitochondriale DNA ist 16kb lang und wurde 1981 von Anderson et al. sequenziert (Santos et al. 2002). Säugerzellen enthalten in der Regel einige hundert bis tausend Mitochondrien mit jeweils 2-10 Kopien der mtDNA Nukleotide. Die mtDNA kodiert für 13 Polypeptide, 22 tRNAs und 2 RNAs. Die erwähnten Polypeptide sind essentielle Komponenten der mitochondrialen Atmungskette, so dass Zellen ohne mtDNA für ihren Energiegewinn ausschließlich auf die Glykolyse angewiesen sind. Die mtDNA ist mit Proteinen assoziiert und an der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert (Costa et al. 2011). Somit ist sie einerseits durch die Assoziation mit Proteinen geschützt, andererseits jedoch durch die räumliche Nähe zu der ROS-generierenden Atmungskette auch gefährdet. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass die mtDNA mehr 8-Hydroxyguanin akkumuliert als die DNA im Zellkern, was ein zusätzliches Argument für ihre Involvierung in Neurodegeneration und Alterung darstellt. Die genauen Ursachen für die Akkumulierung der mtDNA-Schäden und der Mechanismus, wie sie letztendlich zum Zelltod führen, bleiben weitgehend ungeklärt.

1.7. Modellorganismen und Zellmodelle von *Morbus Parkinson*

Die PARK6 Form der Parkinson Erkrankung wird derzeit anhand von verschiedenen Modellorganismen (*M. musculus*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *C. elegans*) und Zellmodellen (*SH-SY5Y*, *Fibroblasten aus PARK6 Patienten etc.*) untersucht.

Etlliche Befunde zeugen von einer durch den Verlust von PINK1 zustande kommenden mitochondrialen Dysfunktion. PINK1 KD *D. melanogaster* Modelle zeigen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion mit resultierender Degeneration der Flugmuskeln und einem mäßigen Verlust von dopaminergen Neuronen (Clark et al. 2006). Bei *C. elegans* mit Mutationen im Homolog von PINK1 wurden eine Verkürzung der mitochondrialen Cristae und Defekte in der axonalen Entwicklung gefunden (Sämann et al. 2009). Die PINK1 KD *D. rerio* Modelle haben ebenfalls eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Erscheinung und Funktion gezeigt, mit einer Reduktion sowohl der Mitochondrien als auch der mitochondrialen Cristae (Xi et al. 2011). Bei PINK1 KO Mausmodellen wurde eine mitochondriale Dysfunktion ohne begleitende Neurodegeneration beobachtet (Gispert et al. 2009). Kortikale Neurone aus PINK1 KO Mäusen weisen jedoch keine Veränderung der mitochondrialen Länge oder eventuell eine leichte Elongation der Mitochondrien auf (Jendrach et al. 2009). Weiterhin wurde veröffentlicht, dass eine reduzierte Expression der mitochondrialen Fissionsfaktoren Drp1 und Fis1 in HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) mit einer erhöhten mRNA Expression von PINK1 korreliert (Mai et al. 2010). Es wurde auch festgestellt, dass ein stabiler knockdown von PINK1 in SH-SY5Y Zellen zu einer Fragmentierung der Mitochondrien führt (Dagda et al. 2009). Andererseits wurde auch über eine Fragmentierung der Mitochondrien infolge von einem akuten PINK1 KD in SH-SY5Y Zellen berichtet (Lutz et al. 2009).

Darüber hinaus beeinflusst PINK1 auch andere Aspekte der Zellphysiologie. In den Fibroblasten aus PARK6 Patienten wurde eine erhöhte Expression von α Synuclein ermittelt (Hoepken et al. 2008), sowie eine höhere Empfindlichkeit gegenüber proteasomalen Stress (Klinkenberg et al. 2010). In SH-SY5Y und MN9D Zellen wurde eine Induktion der Autophagie durch PINK1 beobachtet (Dagda 2009, Cui et al. 2011). Eine Beeinträchtigung der NF κ B-Aktivität trat in *PINK1*^{-/-} MEFs auf (*Mouse Embryonic Fibroblasts*; Akundi et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Befunde aus verschiedenen Modellorganismen und Zellmodellen von PARK6 *Morbus Parkinson* auf einen Einfluss des PINK1 auf unterschiedliche Aspekte der Zellphysiologie deuten, wobei sich aber

vor allem das Bestehen einer mitochondrialen Dysfunktion in Zusammenhang mit dem Verlust der PINK1 Aktivität als ein konsistentes Ergebnis erwiesen hat.

1.8. Motivation und Fragestellung

Wie unter 1.1. beschrieben, stellt die PARK6 Form von *M. Parkinson* eine autosomal rezessiv vererbte, verhältnismäßig früh auftretende neurodegenerative Erkrankung dar, die ebenso wie andere Formen von Parkinsonismus durch den Verlust von dopaminergen Neuronen gekennzeichnet ist. Die resultierenden Symptome (Bradykinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität) werden durch Dopamin-Substitutionstherapie und DBS behandelt. Diese Therapiemaßnahmen sind nicht frei von Nebenwirkungen, welche die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen können. Ein Beispiel dafür ist die arzneimittelbedingte Dyskinesie, die bei der PARK6 Form der Parkinson-Erkrankung häufig auftritt. Der PARK6 Locus kodiert für PINK1, eine putative mitochondriale Serin / Threonin Kinase. Die Erforschung der Rolle von PINK1 könnte dazu beitragen, andere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln oder eine Weise zu finden, den Ausbruch der Krankheit zu verzögern oder im besten Falle zu verhindern.

Die SH-SY5Y Neuroblastomazellen sind als ein relevantes Zellmodell der Parkinson-Erkrankung breit akzeptiert (Xie, Hu u. Li 2010). Da die SH-SY5Y außerdem eine neuronale Zelllinie darstellen, sind sie für die Forschung an dieser neurodegenerativen Erkrankung besonders gut geeignet.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden mit einem adenoviralen Konstrukt generierte PINK1 knockdown SH-SY5Y Zellen (M. Klinkenberg) als ein potientes Zellmodell für die PARK6 Form von *M. Parkinson* analysiert. Die PINK1 KD SH-SY5Y Zellen wurden mit Hilfe eines adenoviralen Konstruktes generiert (Dissertation von M. Klinkenberg) und daraufhin die Klon8 Zellen als diejenigen mit einem starken knockdown von PINK1 selektioniert (B. Muster). Als Kontrolle für die Untersuchung von PINK1-abhängigen Veränderungen wurden NT SH-SY5Y Zellen herangezogen, welche mit nontarget-shRNA transfiziert wurden. Das besondere Interesse an diesem Zellmodell kam von der Beobachtung, dass die PINK1 KD SH-SY5Y Zellen bei einer Reduktion des Serum-Gehaltes im Kulturmedium wesentlich langsamer wachsen als die korrespondierenden NT Zellen (M. Jendrach und B. Muster; Abb.7).

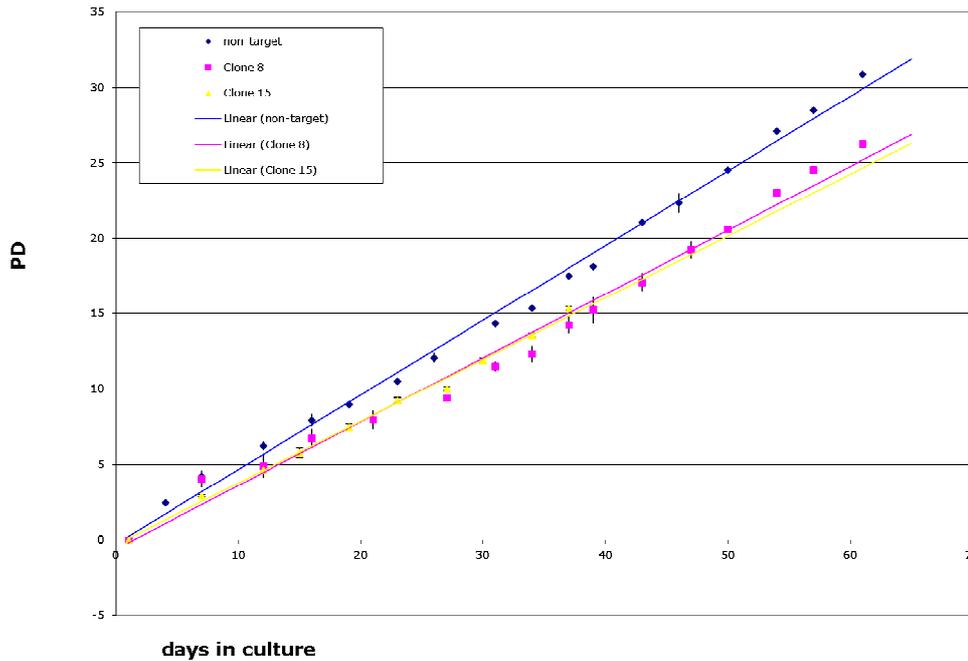


Abb.7: Die Proliferation der SH-SY5Y NT (non target) und PINK1 KD Zellen bei Serumdeprivation (B. Muster). Dargestellt ist die über einen Zeitraum von 2 Monaten analysierte Proliferation der mittels eines adenoviralen Konstruktes generierten, stabil transfizierten SH-SY5Y Zellen mit einem knockdown der mitochondrialen Kinase PINK1. NT sind die mit non target shRNA transfizierten Kontroll-Zellen. Blau: NT; rot: Klon8; gelb: Klon15.

Aus der Beobachtung zur Verringerung der Proliferation bei PINK1 KD Klon8 Zellen ergab sich die Frage, welche anderen PINK1-abhängigen Veränderungen in diesen Zellen unter Serumdeprivation festgestellt werden können. Dieser Frage wurde zunächst auf der molekularen Ebene durch die Analyse der mRNA- und Proteinexpression der NT und PINK1 KD Klon8 Zellen nachgegangen, wobei signifikante Veränderungen in der Genexpression der Klon Zellen ermittelt wurden. Um eventuelle Auswirkungen des veränderten mRNA-Profiles dieser Zellen auf andere Aspekte der Zellphysiologie zu untersuchen, wurden verschiedene potentiell betroffene Parameter analysiert (mtDNA-Integrität, ATP-Gehalt, Zellüberleben bei induziertem oxidativen Stress, mitochondriale Morphologie und Respiration). Schließlich wurde überprüft, ob und inwiefern die abweichende Genexpression der stabil transfizierten SH-SY5Y PINK1 KD Klon8 Zellen auf andere Zellmodelle (transient transfizierte SH-SY5Y und HeLa Zellen; kortikale Neurone aus PINK1 KO, sowie aus PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierenden Mäusen) übertragbar ist.

2. Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden molekularbiologische, genetische und biochemische Methoden angewandt, bei denen verschiedene Utensilien Gebrauch gefunden haben, worauf in diesem Kapitel in größerem Detail eingegangen wird. Zunächst wird in *Abschnitt 2.1* eine Übersicht über die verwendeten Materialien (Geräte, Chemikalien und sonstiges Material) geboten und darauf folgt im *Abschnitt 2.2.* eine Darstellung der angewandten Methoden.

2.1. Verwendete Materialien

In diesem Abschnitt wird in tabellarischer Form eine Übersicht über die allgemein eingesetzten, sowie über die in der Zellkultur verwendeten Geräte, Utensilien und Chemikalien geboten (s. *Abschn. 2.1.1.*). Darauf folgt eine gesonderte Übersicht über die Reagenzien und Kits, die in genetischen und biochemischen Arbeiten eingesetzt wurden und abschließend eine Darstellung der verwendeten Software.

2.1.1. Laborgeräte und Utensilien

2.1.1.1. Allgemeine Laborgeräte und Utensilien

Tab.2: Allgemein verwendete Utensilien und Geräte

Produkt	Bezeichnung und / oder Katalog-Nummer	Firma
Accu-jet Pro Pipetten-Steuergerät	01F72322	Brand GmbH
Agarose-Gelelektrophoresekammer	B1A	EasyCast Electrophoresis System
ATP Determination Kit	A22066	Invitrogen
Axiovert Fluoreszenzmikroskop mit Axiocam Color Kamera	200M	Zeiss
BioPhotometer	6131 03300	Eppendorf
Blotting-Kammer	-	BioRad
CLSM (Konfokales Mikroskop)	LSM 510	Zeiss
Curix 60 Entwicklermaschine	2013501	Agfa
E.A.S.Y Geldokumentationsgerät mit Kamera	2027478; Kamera: B-1228-3U5N	Herolab
Graduierte Pipettenspitzen	10µl: S1111-3700	Starlab GmbH
	200µl: S1111-0706	
	1000µl: S1111-2721	
Graduierte sterile Filterspitzen	10µl: S1120-3810	Starlab GmbH
	20µl: S1120-1810	
	200µl: S1120-8810	
	1000µl: S1122-1830	
IKAMAG Magnetrührer Typ RCT	722 312	Janke u. Kunkel GmbH
Immunblot PVDF Membran	162-0177	Bio-Rad Laboratories
Medizinische Röntgenfilme Super RX	47410 08379	FujiFilm
Plastibrand UV-Küvetten	759200	Brand GmbH
Q-Gard1 Milli-Q Millipore-Gerät	QGARDOOR1	Millipore
Reaktionsgefäße	0,5mL: 0030121.023	Eppendorf AG
	1,5mL: 72.690.550	Sarstedt AG u. Co.
	2mL: 72.655	
SDS Gelelektrophorese-Kammer	010-130	Biometra
Step One Plus Real Time PCR System	437 659 2R	Applied Biosystems
Superfrost Plus Objektträger 25 x 75 x 1mm	J1800AMNZ	Gerhard Menzel GmbH
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf AG
Tuttnauer Autoklav	2540EL	Systec GmbH

2.1.1.2. Zellkulturmaterialien

Tab.3: Zellkulturgeräte und Utensilien

Produkt	Bezeichnung und / oder Katalognummer	Firma
Amaxa Nucleofactor Elektroporationsgerät	AAD-1001	Lonza AG
CellStar ® Zellkulturflaschen (PS)	25cm ² (50mL): 690175	Greiner Bio-One GmbH
	75cm ² (250mL): 658175	
CellStar ® Zellkulturplatte (6 Well)	657160	Greiner Bio-One GmbH
CellStar ® Zentrifugenröhrchen, steril, frei von DNAsen, RNAsen, humaner DNA und Pyrogenen	15mL: 227271	Greiner Bio-One GmbH
	50mL: 227280	
CO ₂ Inkubator	240i	Heracell
Cryo Freezing Container Einfrierbox	5100-0001	Nalgene
Durchlichtmikroskop	DMIL	Leica
Extracellular Flux Analyzer	XF24	Seahorse Bioscience
LaminAir Werkbank	HB2448	Heraeus Instruments
Millex GP Filter 0,22µm (Millipore Express PES Membran)	SLGPO33RS	Millipore
MSC-Advantage Werkbank	-	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer 20 x 26mm	728.1	Carl Roth GmbH
Original Perfusor Spritze 50mL	2015-05 2010-05	Braun
Pasteurpipetten	145mm: 747715	Brand GmbH
	225mm: 747720	
XF24 Flux Pac	100850-001	Seahorse Bioscience
XF24 Zellkulturplatten	100777-004	Seahorse Bioscience
Zellschaber 25cm	83.1830	Sarstedt

2.1.2. Zellen

In den Versuchen wurden folgende Zelltypen verwendet:

- a) SH-SY5Y Neuroblastomazellen (The European Collection of Cell Cultures, Sigma-Aldrich, Nr. 94030304; Xie, Hu u. Lie 2010)
- b) HeLa (*Henrietta Lacks Zervikale Krebszellen*; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH, DSM-Nr. ACC57),
- c) Kortikale Neurone aus PINK1 KD Mäusen (Gispert et. al 2009),
- d) Kortikale Neurone aus PINK1 KD und alpha Synuclein überexprimierenden Mäusen (S. Gispert).

2.1.3. Eingesetzte Reagenzien

2.1.3.1. Allgemeine Chemikalien

Tab.4: Allgemeine Chemikalien

Produkt	Bezeichnung und / oder Katalognummer	Firma
Befestigungsmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium)	15mL: 2010-12	Dako
B-Mercaptoethanol	A1108,0100	Applichem GmbH
Destilliertes Wasser, DNase / RNase frei	10977	Invitrogen (Gibco)
DMSO	100mL: 41639	Sigma-Aldrich
Höchst 3342	B2261-25MG	Sigma-Aldrich
Isopropanol	33539	Sigma-Aldrich
KCl	1.05001	Merck
Methanol	32213	Sigma-Aldrich
Mitotracker Red CMX Ros	M7512	Invitrogen
NaCl	31434-1KG-R	Sigma-Aldrich
PFA extra rein DAC	1040051000	Merck
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30% Rotipuran, p.a., stabilisiert)	8070.1	Roth

2.1.3.2. Zellkulturmedien, Zusätze und Kits

Tab.5: Zellkulturmedien, Zusätze und Kits

Produkt	Bezeichnung und / oder Katalognummer	Firma
Basic Nucleofactor Kit Primary Neurons (Elektroporationskit für SH-SY5Y Zellen)	VPI-1003	Lonza
BioReagent Gelatinelösung aus Rinderhaut (2% in H ₂ O)	G1393-100ML; 110 M6074	Sigma-Aldrich
B27 Supplement (50x)	17504-044	Invitrogen (Gibco)
CCCP	C2759-100 MG	Sigma-Aldrich
D-(+)-Galaktose	G5388-100G	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca und Mg	H15-002	PAA Laboratories GmbH
Effectene Transfektionsreagent	301425	Qiagen
FCCP	C2920-10mg	Sigma
FCS Gold	A15-151	PAA Laboratories GmbH
HBSS (1x), mit CaCl ₂ und MgCl ₂	500mL: 24020-091	Invitrogen (Gibco)
HEPES Puffer (1M)	S11-001	PAA Laboratories GmbH
MEM (1x) mit L-Glutamin	31095	Invitrogen (Gibco)
L-Glutamin 200mM (100x)	100mL: 25030-024	Invitrogen (Gibco)
MEM NEAA (100x)	11140	Invitrogen (Gibco)
MycoTrace	Q051-020	PAA Laboratories GmbH
Neurobasal Medium, ohne L-Glutamin	21103	Invitrogen (Gibco)
Oligomycin	O4876-5mg	Sigma
Puromycin Dihydrochlorid	P9620	Sigma-Aldrich
Rotenon	R8875	Sigma
RPMI 1640 (1x), mit L-Glutamin	21875	Invitrogen (Gibco)
RPMI 1640 (1x), mit L-Glutamin, ohne D-Glucose	11879	Invitrogen (Gibco)
Trypsin-EDTA 0,05% (1x)	100mL: 25300-054	Invitrogen (Gibco)

2.1.3.3. Reagenzien und Kits für genetische Arbeiten

Tab.6: Reagenzien und Kits für genetische Arbeiten

Produkt	Bezeichnung und / oder Katalognummer	Firma
Agarose	A9539-500G	Sigma-Aldrich
AmpliTaq DNA Polymerase (250U; 5U/μL)	58002040-01	Roche (Applied Biosystems)
DNA Marker	100bp: 10488-058	Invitrogen
	1kb Plus: 12308-011	
DNase I Amplification Grade (100U; 1U/μL)	18068-015	Invitrogen
Destilliertes Wasser, DNase / RNase frei	10977	Invitrogen (Gibco)
dNTP-Mischung (10mM)	18427-088	Invitrogen
Ethanol	32205-1L	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid (10mg/mL)	22181	Carl Roth GmbH
Expand Long Template PCR System (150U)	11681834001	Roche
Fast Start Universal Probe Master (ROX)	12602000	
FlexiGene DNA Kit (50)	51204	Qiagen
High Capacity RNA-to-cDNA Mastermix (200 rxns)	4390778	Applied Biosystems
Loading Dye Solution (6x)	RO611	Fermentas
MgCl ₂ 25mM	58002032-01	Roche (Applied Biosystems)
PCR Puffer (10x), mit 15mM MgCl ₂	58002067-01	Roche (Applied Biosystems)
Primer	Hs_14620_f: 47-3138-6/13	Eurofins MWG Operon
	Hs_5999_f: 47-3138-5/13	
	Hs_14841_r: 47-3138-7/13	
RNeasy Mini Kit (250)	74106	Qiagen

Tab.7: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Assays

Gen	Verwendete TaqMan-Assays	
	Human	Maus
α SYNUCLEIN	Hs00240906_m1	Mm00447333_m1
ATG5	Hs00355494_m1	-
ATG7	Hs00197348_m1	-
ATP13	Hs00223032_m1	-
BECLIN	Hs00186838_m1	-
DRP1	Hs00247147_m1	Mm01342903_m1
FIS1	Hs00211420_m1	Mm00481580_m1
FOXO3A	Hs00921424_m1	-
GDAP1	Hs02742628_m1	Mm00494579_m1
GLO1	Hs00198702_m1, Hs01080576_m1	Mm00844954_m1
GHITM	Hs00205205_m1	Mm0050440_m1
HIF1 α	Hs00936368_m1	-
I κ B (NFKBIA)	Hs00153283_m1	-
LAMP1	Hs00931464_m1	-
LAMP2	Hs00903587_m1	-
MAP1LC3A	Hs01076567_g1	Mm00458724_m1
MARCH5	Hs00215155_m1	-
MFF	Hs00697397_m1	Mm00512718_m1
MFN1	Hs00566851_m1	Mm00612599_m1
MFN2	Hs00208382_m1	Mm00500120_m1
MIB	Hs00379185_m1	Mm00523008_m1
MTP18	Hs00212905_m1	Mm00466042_m1, Mm01193951_m1
NRF1	Hs00192316_m1	-
NRF2	Hs00232352_m1	-
OMI	Hs00234883_m1	-
OPA1	Hs01047019_m1	Mm00453879_m1 (Opa1L1)
PARKIN	Hs01038318_m1	-
PGC1 α	Hs01016719_m1, Hs01016724_m1	Mm01208832_m1
PGC1 β	Hs00991676_m1	Mm01258518_m1
PHB2		Mm00476104_m1
PINK1	Hs00260868_m1	Mm00550827_m1
PLD6	-	Mm03039926_m1
P62	Hs00177654_m1	-
SGK1	Hs00178612_m1	-
SH3GLB1	Hs00211220_m1	Mm00490286_m1
SOD2	Hs00167309_m1	-
STOML2	Hs00203730_m1	-
TBP	Hs99999910_m1	Mm00446973_m1
TFAM	Hs00273372_s1	-
TRAP1	Hs00972323_m1	-

2.1.3.4. Reagenzien für biochemische Arbeiten

Tab.8: Reagenzien für biochemische Arbeiten

Produkt	Zusammensetzung oder Katalognummer	Firma
Acrylamid / Bis 29 /:1 Vorgemischtes Pulver	161-0124	Bio-Rad Laboratories
APS	1012011000	Merck
Bromphenolblau	B6131	Sigma-Aldrich
Entwickler	G153A / G153B	AGFA-Gevaert Ltd.
Fixierer	G354	AGFA-Gevaert Ltd.
Glycerol	G8773	Sigma-Aldrich
PBS (10x)	80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na ₂ HPO ₄ , 2,4g KH ₂ PO ₄ , 800mL H ₂ O	-
PBST (1x)	1X PBS mit 0,1% Tween (20%)	-
PonceauS (0,1% in 5% Essigsäure)	P7170-1L	Sigma
Precision Plus Protein Standard Dual Color	161-0374	Bio-Rad Laboratories
SDS-Lysepuffer (2x)	250mM Tris/HCl pH6.9, 20% Glycerol, 4% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0.005% Bromphenolblau, 5% H ₂ O	-
SDS-Pellets ≥ 99%	CN30.2	Carl Roth GmbH
Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate	34087	Thermo Fisher Scientific
TBE-Puffer	89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA-Na ₂	-
Transferpuffer (10x)	25mM Tris, 190 mM Glycin	-
Transferpuffer (1x)	10% von 10x Transferpuffer, 20% Methanol, 70% H ₂ O (Millipore)	-
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich

Tab.9: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Herkunft, Eigenschaften	Konz.	Einsatz (in PBST)	Katalog-Nummer	Firma
α - Drp1	Maus	250 μ g / mL	1:500	611112	BD Transduction Laboratories
α - Fis1	Kaninchen, polyklonal	0,06 mg / ml	1:500	HPA 017 430_100UL	Sigma
α - Mfn1	Kaninchen, polyklonal	1mg / mL	1:1000	ab104274	Abcam
α - Mfn2	Maus monoklonal	1mg / mL	1:1000	ab56889	Abcam
α - MTP18	Kaninchen, Peptid-Antikörper	-	1:500- 1:1000	hergestellt für AK Auburger	Eurogentec
α - Parkin (α - PARK8)	Maus, monoklonal	-	1:500	4211S	Cell Signaling Technology
α - PGC1 α	Maus, monoklonal	0,5mg / mL		ab77210	Abcam
α - β Aktin	Maus, monoklonal	-	1:10 000	A5441-2ML	Sigma-Aldrich

Für die Detektion der Proteinbanden wurden folgende sekundäre Antikörper verwendet:

- a) ECL anti-Maus IgG HRP gekoppelter Antikörper (Kat.-Nr. NA931V; GE Healthcare Europe GmbH),
- b) ECL anti-Kaninchen IgG HRP gekoppelter Antikörper (Kat.-Nr. NA934V; GE Healthcare Europe GmbH).

2.1.4. Verwendete Software

Für die Bearbeitung und Auswertung der erworbenen Daten wurden folgende Computerprogramme verwendet:

- *Axiovision 40 (V4.8.0.0; Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH)* für die Herstellung der Fluoreszenzaufnahmen,
- *Herolab EasyWin 32* zur Abbildung von Agarosegelen und die Quantifizierung der Intensität von DNA-Banden,
- *Microsoft Office Excel 2003* für die statistische Analyse mittels Anova und z. T. für die Erstellung von Graphen,
- *ImageJ 1.42i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA)* zur Bearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen und Quantifizierung von Proteinbanden,
- *Imaris 6.0.0 (BITPLANE Scientific Solutions)* zur Bearbeitung der mittels konfokaler laser-scanning Mikroskopie hergestellten Fluoreszenzaufnahmen,
- *GraphPad Prism (Version 4.03)* für die statistische Analyse der qPCR-Daten und die Erstellung der dazugehörigen Graphen.

2.2. Methoden

In diesem Abschnitt werden die angewandten Methoden dargestellt, beginnend mit der Arbeit in der Zellkultur. Darauf folgt eine Darstellung der genetischen, biochemischen und molekularbiologischen Methoden und im Anschluss werden die Methoden zur Analyse bestimmter Eigenschaften auf der Zellebene erfasst (Respirometrie und Mikroskopie). Abschließend wird auf die statistische Analyse der Daten eingegangen.

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung der SH-SY5Y Zellen, HeLa Zellen und der kortikalen Neuronen

Wie unter 2.1.2. beschrieben, wurden im Laufe der vorliegenden Diplomarbeit vier verschiedene Zelltypen verwendet, nämlich die SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen, HeLa Zellen (eine Zelllinie gewonnen aus der Biopsie eines zervikalen Karzinoms) und kortikale Neurone aus PINK1 KD Mäusen, sowie aus PINK1 KD und A53T alpha

Synuclein überexprimierenden Doppelmutanten. Alle Zellen wurden in entsprechenden Medien kultiviert (s. unten) und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Bei der Kultivierung der SH-SY5Y und der HeLa Zellen wurde beachtet, dass das Kulturmedium nicht länger als vier Wochen in Gebrauch war. Außerdem wurde das Serum (FCS, "Fetal Calf Serum") aliquotiert und bei -20°C gelagert. Ebenfalls beachtet wurde, dass ein FCS-Aliquot nicht länger als vier Wochen in Gebrauch war. Die Zellen wurden jeden Monat mit dem MycoTrace Kit von PAA Laboratories nach Angaben des Herstellers auf Mykoplasmen getestet.

Die SH-SY5Y und die HeLa Zellen wurden je nach Splittrate und Konfluenz jeden dritten Tag entweder gefüttert oder nach dem unten aufgeführten Protokoll gesplittet. Dabei wurde beachtet, dass die Zellen beim Splitten mindestens zu 90% konfluent sind und dass die Arbeit so gestaltet wird, dass die Zellpopulation keine maximale Dichte erreicht, um eine Induktion der Apoptose zu vermeiden. Die maximale Splittrate war bei den SH-SY5Y Zellen 1:3. Infolge des etwas schnelleren Wachstums der HeLa Zellen, lag die Splittrate in dem Fall zwischen 1:3 und 1:8.

Die Zellen wurden folgendermaßen gesplittet (ATCC):
Das jeweilige Wachstumsmedium und die Trypsin/EDTA-Lösung wurden bei 37°C vorgewärmt. Nach Entfernung des vorliegenden Kulturmediums wurde PBS vorsichtig in die Kulturflasche gegeben (3mL in T25-, bzw. 5mL in die T75 Flasche). Die Flasche wurde kurz geschwenkt, dann das PBS abgesaugt und anschließend Trypsin/EDTA hinzugesetzt (1mL für eine T25-, bzw. 3mL für eine T75-Flasche). Die Kulturflasche wurde für 1-2min in den Brutschrank gestellt, wonach unter dem Mikroskop überprüft wurde, ob sich die Zellen abgelöst hatten. Daraufhin wurde je nach Splittrate die entsprechende Menge an Medium dazugegeben, die Zellen gut resuspendiert und auf neue Flaschen verteilt. Alternativ wurden die Zellen auf 6 Well-Platten gegeben ("ausgesät") mit vorausgehender Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer.

Die von M. Klinkenberg generierten PINK1 KD Klon8 Zellen (s. *Einleitung*) wurden bei 10% FCS, sowie bei Serumdeprivation (5% FCS) und immer parallel zu den entsprechenden NT (non target) Kontroll-Zellen kultiviert. Das Kulturmedium war folgender Zusammensetzung (ATCC 2011):

- RPMI mit 2g/L Glucose als Grundmedium,
- 10% FCS für die Zellen ohne Serumdeprivation, bzw. 5% FCS zur Simulation von einem trophischen Stress,
- 1% Glutamin,
- 1µg/mL Puromycin (als Selektionsmittel).

Im Laufe der Arbeit wurden auch parentale SH-SY5Y Zellen für die Generierung eines transienten PINK1 knockdowns gebraucht. Diese wurden ebenfalls wie oben

beschrieben mit und ohne Serumdeprivation kultiviert und zweimal in der Woche gesplittet. Da diese Zellen unverändert waren (d.h. keine Resistenz trugen), wurde dem ansonsten wie oben angesetzten Medium kein Puromycin hinzugefügt.

Um die physiologischen Bedingungen im Gehirn besser in vitro repräsentieren zu können, wurde ein Teil der bei Serumentzug kultivierten NT und PINK1 KD KL8 Zellen auf ein Medium mit 50%iger Reduktion der Glucose umgestellt. Das erwähnte Medium wurde hergestellt, indem das RPMI-Grundmedium mit 2g/L Glucose 1:1 mit Glucose-freiem RPMI gemischt wurde und weitere Zusätze wie oben aufgeführt hinzugefügt wurden. Die Kultivierung der parentalen SH-SY5Y Zellen erfolgte sonst wie oben beschrieben.

Das Kulturmedium für die Hela Zellen hatte folgende Zusammensetzung (Busch et al. 2006):

- MEM als Grundmedium,
- 10% FCS,
- 10mM HEPES,
- 1% NEAA (*Nicht Essentielle Aminosäuren*).

Die kortikalen Neurone wurden in frisch angesetztem Kulturmedium 2 kultiviert (S. Gispert):

- 96mL Neurobasal-Medium,
- 1mL 200mM L-Glutamin,
- 1mL Pen/Strep,
- 2mL B27 (da lichtempfindlich, wurde es immer frisch aufgetaut und zum Schluss hinzugefügt).

2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Vorbereitung für die Lagerung im flüssigen Stickstoff wurden die Zellen zunächst wie sonst mit PBS gewaschen, trypsiniert und dann in 6mL Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 200g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Zellpellet wurde in Freeze-Medium aufgenommen, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Menge an eingesetztem Freeze-Medium richtete sich nach der Zellzahl (1mL für eine dichte T25-Flasche, bzw. 3mL für eine T75-Flasche). Je 1mL der resuspendierten Zellen wurde auf Cryoröhrchen gegeben, die anschließend über Nacht bei -80°C gelagert wurden. Am folgenden Tag wurden die Cryoröhrchen zügig in den Stickstoff-Tank übertragen, um ein Auftauen der Zellen möglichst zu vermeiden.

Zum Auftauen der Zellen wurde zunächst eine entsprechend große (i.d.R. eine T25) Flasche mindestens für 30min oder über Nacht im Brutschrank mit FCS beschichtet (1mL FCS auf eine T25-Flasche). Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, in das 37°C-Wasserbad gestellt und das entsprechende Kulturmedium vorgewärmt. Die aufgetauten Zellen wurden mit 5mL Medium versetzt und für 5min bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellpellets in 3mL Medium aufgenommen. Das FCS wurde aus der beschichteten T-Flasche entfernt, woraufhin die Zellen in die Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gestellt wurden, bis sie dicht gewachsen sind. Bei den Zellen, die sonst mit Antibiotika im Medium wachsen, wurden diese bis zum ersten Splitten weggelassen.

2.2.1.3. Elektroporation der SH-SY5Y Zellen

Zur Generierung eines transienten PINK1 knockdowns wurden die SH-SY5Y Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Die Transfektion wurde mit dem "Basic Nucleofactor Kit for Primary Neurons" und dem Amaxa Nucleofactor Elektroporationsgerät von Lonza durchgeführt. Für jede Transfektion wurde eine entsprechende Zahl an T25-Flaschen mit 3mL Kulturmedium im Brutschrank vorinkubiert. Pro Ansatz wurden 90µL Cell Line Nucleofactor Solution V mit 20µL Supplement 1 und 10µL siRNA versetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und je nach Dichte in einem entsprechenden Volumen von Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt und für jeden Ansatz eine Million Zellen in je ein Falcon überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 3min bei 200rcf (1100rpm) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellpellets in dem jeweiligen Ansatz resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation wurde das "SH-SY5Y High Efficiency G-004" Programm verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in der Küvette mit etwas Medium aus der vorinkubierten T-Flasche vorsichtig gemischt, in die entsprechende Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag wurde je nach Dichte der Zellen das Medium in der Flasche ganz oder zur Hälfte gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht.

2.2.1.4. Transfektion der HeLa Zellen mit Effectene

Zur Herstellung eines transienten Fis1 knockdowns wurden HeLa Zellen mittels Effectene Transfektionsreagent von Qiagen transfiziert. Hierfür wurden die

Zellen am Vortag auf Schälchen ausgesät, so dass sie bei der Transfektion etwa 40-60% konfluent waren. 125pmol RNA (d.h. 6,25µL einer 20µM Stocklösung) wurden mit 93,75µL EC Puffer gemischt. Anschließend wurden 3,2µL Enhancer hinzugefügt, erneut gemischt und der Ansatz für 4min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2µL Effectene wurde der Ansatz weitere 8min bei RT gelassen und dann mit 800µL Medium aus dem entsprechenden Schälchen versetzt. Die Mischung wurde langsam auf die Zellen gegeben und 72h später der knockdown analysiert.

2.2.1.5. Behandlung von SH-SY5Y Zellen und PINK1 KD kortikalen Neuronen mit HBSS

Zu Zwecken der Aminosäuredeprivation wurden die SH-SY5Y Zellen und die PINK1 KD Neurone mit HBSS (Invitrogen) behandelt. Von den NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y wurde dafür am Vortag je eine Million Zellen auf Schälchen ausgesät. Die Neurone wurden dagegen bereits in Schälchen kultiviert und bei unterschiedlicher Kultivierungszeit untersucht. Bei der Behandlung wurde zunächst das Kulturmedium von den Zellen abgezogen und bei 37°C vorgewärmtes HBSS hinzugefügt (2mL pro Schälchen). Im Falle dass die mitochondriale Morphologie untersucht werden sollte, wurden die Zellen zuvor mit MTR gefärbt. Nach der geplanten Einwirkzeit wurde das HBSS entfernt und die Zellen entweder für die mikroskopische Analyse mit PFA fixiert und ggf. mit Höchst gefärbt oder für die qPCR- und Western Blot-Analyse lysiert (s. *Abschnitt 2.2.1.6.*).

2.2.1.6. Herstellung der Zelllysate

Die Herstellung der Zelllysate wurde folgendermaßen durchgeführt:

a) SH-SY5Y und HeLa Zellen:

Die Zellen wurden wie gewohnt mit PBS gewaschen, trypsiniert und in einer passenden Menge an Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde mit der Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Menge an Zellsuspension auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellsuspension wurde für 2min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

b) kortikale Neurone:

Das Kulturmedium wurde entfernt und 1,5mL PBS auf jedes Schälchen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt

und für 2min bei 5000rpm und 4°C herunterzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

2.2.1.7. Umstellung der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen auf ein Galaktose-haltiges Medium

Für die Untersuchung der Auswirkung einer gesteigerten mitochondrialen Atmung auf die Zellform und die mitochondriale Morphologie, wurde je eine halbe Million der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen auf Schälchen ausgesät und am folgenden Tag das vorliegende Kulturmedium gegen ein Wachstumsmedium mit 1g/L Galaktose ausgetauscht. Das erwähnte Medium wurde angesetzt, indem eine passende Menge an Galaktose in Glucose-freiem RPMI gelöst wurde. Die Lösung wurde steril filtriert und dann die üblichen Zusätze hinzugefügt (FCS, Glutamin und Puromycin, s. *Abschn. 2.2.1.1.*). 24h nach Umstellung auf das Galaktose-haltige Medium wurden die Zellen mit MTR gefärbt, gefolgt von Fixierung mit PFA und Eindeckeln mit Dako Fluorescent Mounting Medium (s. *auch Abschn. 2.2.6.*).

2.2.1.8. Behandlung der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen mit H₂O₂

Für die Behandlung mit H₂O₂ wurde je eine Million der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen auf 6Well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde das H₂O₂ direkt vor dem Einsatz in warmem Medium und drei verschiedenen Konzentrationen angesetzt (10µM, 30µM, 60µM). Das Kulturmedium wurde von den 6Well-Platten entfernt und die verschiedenen H₂O₂-Ansätze auf die entsprechenden Wells gegeben. Dem Kontroll-Well wurde warmes Medium zugesetzt. Die Platten wurden in den Brutschrank gestellt und nach einer Einwirkzeit von 10min die H₂O₂-Ansätze und das Medium von dem Kontroll-Well gegen warmes Kulturmedium ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen erneut in den Inkubator gestellt und 24h nach Behandlung analysiert. Dabei wurde jedes Well mit 2mL PBS gewaschen und die Zellen mit 500µL 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zugabe von 1,5mL Kulturmedium wurden die Zellen kräftig resuspendiert und mit der Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt.

2.2.2. Genetische Arbeiten

2.2.2.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde eine 1:50 Verdünnung mit dem RNase freien Wasser aus dem erwähnten Kit hergestellt und fotometrisch das Verhältnis der Absorption bei 260nm zu 280nm (als Maß für die Reinheit der RNA, soll nicht unter 1,65 liegen), sowie die Konzentration der RNA bestimmt. Die RNA wurde schließlich bei -80°C gelagert.

2.2.2.2. DNase-Verdau und cDNA Synthese

Um eventuell vorliegende DNA aus den RNA-Lösungen zu entfernen, wurde vor jeder cDNA-Synthese ein DNase-Verdau der RNA-Lösungen durchgeführt. Dazu wurde der DNase I Amplification Grade Kit von Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Wenn möglich, wurde dabei 1µg RNA eingesetzt. War dies infolge einer niedrigen RNA-Konzentration nicht möglich, wurden 8µL der RNA-Lösung eingesetzt und später die cDNA so verdünnt, dass die Ct-Werte bei der qPCR in einem technisch günstigen Bereich lagen (s. *Abschnitt 2.2.2.3.*).

Im Anschluss auf den DNA-se Verdau wurde die cDNA-Synthese mit dem High Capacity RNA-to-cDNA Mastermix von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Beim Einsatz von 1µg RNA für dieses Verfahren wurde die zum Schluss erhaltene 20µL-cDNA Lösung mit 180µL destilliertem, DNase / RNase freiem H₂O von Invitrogen verdünnt und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3. Quantitative PCR

Die Analyse der Genexpression in den hier untersuchten Zellmodellen wurde mit dem Step One Plus Real Time PCR System von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jedes analysierte Gen wurde ein gesonderter Mastermix vorbereitet, bestehend aus 1µL TaqMan-Assay für das jeweilige Gen, 10µL Fast Start Universal Probe Master Mix (ROX) und 4µL destilliertem, RNase und DNase freiem H₂O. Für jede Reaktion wurden 5µL cDNA mit dem angesetzten Mastermix vereinigt. Für jedes Gen und jede cDNA wurden mindestens zwei Reaktionsansätze pipettiert. Wenn möglich, wurde die Genexpression in Triplikaten gemessen und wenn notwendig in Quadruplikaten. Die Analyse der erhaltenen Ct-Werte wurde mit der

$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt und dabei den Richtlinien des Herstellers gefolgt. Die Genexpression wurde in willkürlichen Einheiten (a.u. = "arbitrary units") ausgedrückt. Alle Veränderungen in der Genexpression, deren Abweichung von den Kontrollwerten geringer als 10% war, wurden als Produkte einer technischen Schwankung betrachtet und die Expression der betreffenden Gene folglich als unverändert bezeichnet.

2.2.2.4. DNA-Isolation

DNA-Isolation aus den SH-SY5Y Zellen wurde mit dem FlexiGene DNA Kit (50) von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Schluss wurde die DNA in 100 μL FG3-Puffer resuspendiert und eine 1:40-Verdünnung mit destilliertem DNAse und RNAse freiem H_2O für die Konzentrationsbestimmung am Eppendorf BioPhotometer hergestellt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die DNA mit FG3-Puffer auf eine Endkonzentration von 50ng/ μL gebracht und bei -80°C eingefroren.

2.2.2.5. Amplifikation der mitochondrialen DNA

Die aus den NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen isolierte DNA wurde für die Amplifikation des 8,9kb und des 200bp Fragments der mitochondrialen DNA ("mtDNA") verwendet (Santos et al., 2002).

Dabei wurden folgende Primer benutzt:

- Hs_5999_f 5` -TCT AAG CCT CCT TAT TCG AGC CGA- 3`
- Hs_14841_r 5` - TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG- 3`
- Hs_14620_f 5` - CCC CAC AAA CCC CAT TAC TAA ACC CA- 3`

Die Amplifikation des 8,9kb Fragments der mtDNA wurde mit dem Expand Long Template PCR System von Roche durchgeführt. Der PCR-Ansatz war folgender Zusammensetzung:

- Primer Hs_5999_f 1 μL
- Primer Hs_14841_r 1 μL
- dNTPs (10mM) 1,75 μL
- Puffer 1 5 μL
- Steriles H_2O 39,75 μL
- Polymerase 0,5 μL
- mtDNA 1 μL

Für die Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

2min bei 72°C → 2min bei 94°C → 20 Zyklen: 30s bei 94°C, 30s bei 58°C, 10min bei 68°C → 10min bei 68°C → ∞ 15°C

Die Amplifikation des 200bp Fragments der mtDNA wurde mit dem folgenden Ansatz und PCR-Programm durchgeführt:

▪ Primer Hs_14620_f	1µL
▪ Primer Hs_14841_r	1µL
▪ dNTPs (10mM)	1,5µL
▪ Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	5µL
▪ MgCl ₂ (25mM)	1µL
▪ Steriles H ₂ O	39,2µL
▪ AmpliTaq-Polymerase	0,3µL
▪ mtDNA	1µL

→ 2min bei 72°C → 2min bei 94°C → 26 Zyklen: 30s bei 94°C, 30s bei 60°C, 30s bei 72°C) → 10min bei 72°C → ∞ 15°C

Anschließend wurden die PCR-Ansätze mit einer passenden Menge an 6fach konzentriertem Ladepuffer versetzt, auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Identifizierung der richtigen DNA-Banden wurde der 1kb Plus Marker von Invitrogen herangezogen. Die Intensität der DNA-Banden wurde mit Herolab Easy Win 32 quantifiziert (Jendrach et al. 2005) und für die Auswertung die Messwerte des 8,9kb Fragments auf die des 200bp Fragments von der jeweiligen Probe normiert.

2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1%ige Gele hergestellt, indem eine passende Menge an Agarose in 0,5xTBE-Puffer gelöst und kurz aufgeköcht wurde. Nach ausreichender Abkühlung wurde Ethidium-Bromid in die Lösung pipettiert (1µL auf 100mL Lösung), das Gel in eine entsprechend große Gelelektrophorese-Kammer gegossen und ein passender Kamm eingeführt. Die Reaktionsansätze wurden mit einer entsprechenden Menge an 6fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und das feste Gel je nach Größe mit 10-20µL der Proben beladen. Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wurden kleinere Gele an eine Spannung von 90V und mittelgroße an 110V

angeschlossen. Abschließend wurde mittels Herolab Easy Win 32 ein Gelfoto gemacht und gegebenenfalls die Intensität der DNA-Banden quantifiziert.

2.2.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Hierfür wurden die Proteine zunächst auf SDS-Gelen entsprechender Prozentigkeit aufgetrennt (Tab. 10; Rehm u. Letzel 2010, Kap. 1.3). Die Gele wurden an eine SDS Gelelektrophorese-Kammer von Biometra befestigt und mit 10µL Precision Plus Protein Standard Dual Color Marker von Bio-Rad Laboratories und je 10-20µL Probe beladen. Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellepflats vor dem Auftragen mit 2fach konzentriertem SDS-Lysepuffer versetzt, 5min bei 95°C gekocht und kurz herunterzentrifugiert. Zum Fokussieren der Proteine an der Trenngelfront wurden die Gele zunächst für 15min an eine Spannung von 100V angeschlossen. Anschließend wurde die Spannung für eine Laufdauer von etwa 90min auf 120-130V erhöht.

Tab.10: Zusammensetzung der SDS-Gele

Reagenz	Prozentigkeit des Gels (Molekulargewicht der Proteine)				Sammelgel
	8% (80-150kDa)	10% (40-80kDa)	12% (20-40kDa)	15% (<20kDa)	
AA/BA	4 mL	5 mL	6 mL	7.5 mL	650 µL
Tris/HCl pH 8.9	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL	-
Tris/HCl pH 6.9	-	-	-	-	1.25 mL
H ₂ O (Millipore)	7.05 mL	6.05 mL	5.05 mL	3.75 mL	3.05 mL
SDS (10%)	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	50 µL
APS (10%)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	5 µL

Für den Western Blot wurde Immunblot PVDF-Membran von Bio-Rad Laboratories verwendet, die vor dem Transfer zurechtgeschnitten und für 15min in Methanol aktiviert wurde. Der Western Blot wurde nach der Semi-Dry Methode durchgeführt (Gispert et

al. 2003; Holtzhauer, 2006; Richter, 2003). Die Whatman-Papiere wurden ebenfalls zurechtgeschnitten und zusammen mit den Filterschwämmen 15min in frisch angesetztem 1x Transferpuffer equilibriert. Der Blot wurde aufgebaut, indem auf die schwarze Seite der vorliegenden Sandwich-Klammer zunächst ein Filterschwamm und ein Whatman-Papier gelegt wurden, gefolgt von dem SDS-Trenngel. Auf das Trenngel wurde die PVDF-Membran gelegt und vorsichtig luftblasenfrei gestrichen. Auf die Membran wurden ein weiteres Whatman-Papier und ein Filterschwamm gestellt und die Sandwichklammer zugemacht. Beim Aufbau wurde beachtet, dass die einzelnen Bestandteile, insbesondere das SDS-Gel und die PVDF-Membran, zwischendurch nicht trocken wurden. Der aufgebaute Blot wurde anschließend in eine BioRad-Blottingkammer gestellt, die mit 1x Transferpuffer aufgefüllt und für 90min an eine Spannung von 50V angeschlossen wurde.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit der PonceauS-Lösung von Sigma gefärbt. Dies hat neben der Visualisierung der Proteinbanden den Vorteil, dass durch die in der Lösung vorhandene Trichloressigsäure die Proteine an der Membran zusätzlich fixiert werden (Rehm und Letzel 2010, Kap. 1.6.1). Danach wurde die Membran gegebenenfalls für die gleichzeitige Detektion mehrerer Proteine an entsprechenden Stellen durchgeschnitten. Darauf folgte die Entfärbung der Membran in PBST und das Blockieren in einer PBST-Lösung mit 5% Milchpulver (1h bei Raumtemperatur).

Nach dem Blockieren wurde die Membran 5min in PBST gewaschen und dann in eine PBST-Lösung mit dem primären Antikörper übertragen. Die Inkubation erfolgte hauptsächlich bei 4°C über Nacht. Alternativ wurde je nach Versuchsansatz und Konzentration des primären Antikörpers (1:500-1:1000) 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran dreimal für 5min mit PBST gewaschen und in eine PBST-Lösung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (1:10 000-1:20 000) übertragen. Daraufhin wurde die Membran erneut dreimal für 5min mit PBST gewaschen, in eine Fotokammer überführt und weitere 5min in einer 1:1 Pico-ECL Lösung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Folie über der Membran vorsichtig luftblasenfrei gestrichen, ein Film darauf gelegt und nach gewünschter Exposition mit einer AGFA-Maschine entwickelt.

2.2.4. Bestimmung des ATP-Gehaltes

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde von Marthe Chimi in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Brandt am Gustav-Embden Zentrum der Biologischen Chemie (Uni-Klinik Frankfurt am Main) durchgeführt. Dazu wurden wie im *Abschnitt 2.2.1.6.* dargestellt Zelllysate von NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei Serumentzug kultiviert wurden, hergestellt. Für die Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde das ATP Determination Kit (A22066) von Invitrogen verwendet. Anschließend wurde die Energieladung nach Atkinson berechnet:

$$EC = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

2.2.5. Respirometrie

Die Respirometrie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Osiewacz am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt durchgeführt. Die begleitende Zellkulturarbeit fand in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Stelzer am Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft der Universität Frankfurt statt.

Für die Messung der mitochondrialen Atmung wurde der XF24 Extracellular Flux Analyzer von Seahorse Bioscience nach Angaben des Herstellers verwendet (XF24-Handbuch 2009, Kap. 5-11). Hierfür wurden mit und ohne Serumentzug kultivierte NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und je nach Dichte in einer entsprechenden Menge an Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde mit der Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt und die Zellen nach einem von Seahorse Bioscience empfohlenen Zweischnitt-Verfahren ausgesät. Dazu wurde zunächst die gewünschte Menge an Zellen in einem Endvolumen von 100µL auf eine XF24Well-Platte überführt, wobei Referenzwells für die Bestimmung der Temperatur freigelassen wurden. Eine Stunde später wurden 150µL Kulturmedium vorsichtig hinzugefügt, um ein Ablösen der Zellen möglichst zu vermeiden. Diese Zweischnitt-Technik soll eine gleichmäßige Zellschicht erzeugen, wodurch die Genauigkeit der Messung gesteigert wird. Die Zellplatte wurde anschließend über Nacht in einem Brutschrank mit 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am folgenden Tag wurden zunächst die Dichte und die Verteilung der Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Danach wurden die Zellen mit RPMI gewaschen, indem 150µL Medium aus jedem Well entnommen wurden und dann je 1mL RPMI vorsichtig hinzugefügt und sofort entfernt wurde. Anschließend wurden 400µL RPMI auf jedes Well gegeben. Die Referenzwells wurden mit je 500µL RPMI beladen und die Zellplatte für mindestens eine Stunde erneut in den Brutschrank gestellt. Wenn zusätzlich zur Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate eine Messung der Ansäuerung im Medium durchgeführt werden sollte, wurde die Zellplatte in einem CO₂-freien Brutschrank inkubiert.

Für die Untersuchung der mitochondrialen Atmung wurden Oligomycin und Rotenon als Inhibitoren von Komplex V, bzw. Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, sowie FCCP oder CCCP als Entkoppler eingesetzt. Die Stammlösungen von den genannten Chemikalien wurden nach den Anweisungen im XF24-Handbuch (2009; Kap.6) hergestellt. Am Tag der Messung wurden die Inhibitoren in warmem RPMI auf folgende Konzentrationen gebracht: Oligomycin 1µM, FCCP (CCCP) 3µM und Rotenon 2µM. Die Ports einer equilibrierten Cartridge-Platte wurden mit je 75µL der so hergestellten Lösungen in der unten aufgeführten Reihenfolge beladen:

- Port A: RPMI
- Port B: Oligomycin
- Port C: FCCCP (CCCP)
- Port D: Rotenon

Zur Kalibrierung wurde die Cartridge-Platte mit der zugehörigen Kalibrierungsplatte in den XF24-Analyser gestellt und das entsprechende Programm gestartet. Nach vollendeter Kalibrierung wurde die Kalibrierungsplatte gegen die Zellplatte ausgetauscht und die Messung gestartet. Folgendes Messprotokoll wurde eingestellt:

- 2min Mischen
- 2min Pause
- 3min Messzeit bei einer Dichte von 40 000 Zellen / Well und 2 min Messzeit für 60 000 Zellen / Well

Bei der Auswertung der erworbenen Daten wurde den Angaben des Herstellers gefolgt (Seahorse XF24-Handbuch, Kap. 12 u. 13).

2.2.6. Mikroskopie

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde das mitochondriale Erscheinungsbild der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen sowohl bei gewohnten in vitro Bedingungen als auch nach chronischer Serumdeprivation und / oder

Reduktion des Glucosegehaltes und beim Ersetzen der Glucose im Kulturmedium mit Galaktose mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zusätzlich wurde die Morphologie der Mitochondrien und Nuklei der erwähnten Zellen nach Aminosäurenentzug analysiert. Für die Herstellung der Fluoreszenzpräparate wurden die Zellen zunächst in einer passenden Dichte ausgesät (bei der Umstellung auf Galaktose wurde eine halbe Million und ansonsten jeweils eine Million NT und PINK1 KD KL8 Zellen eingesetzt). Für die HBSS-Zeitreihe wurden die Deckgläschen zuvor 30min mit 0,2% Gelatine (gelöst in Kulturmedium) im Brutschrank beschichtet. Für die Färbung mit Mitotracker Red (Mai et al. 2010) wurde der erwähnte Farbstoff in warmem Kulturmedium auf eine Konzentration von 25nM gebracht, das vorliegende Medium von den Zellen abgenommen und der MTR-Ansatz hinzugefügt. Daraufhin wurden die Zellen für 30-60min in den Brutschrank gestellt, die MTR-Lösung entfernt und gegebenenfalls weitere Behandlungen vorgenommen (z.B. Behandlung mit HBSS). Ansonsten wurden die Zellen fixiert, indem auf jedes Well 2mL PFA gegeben wurden. Die Zellplatte wurde für 20min dunkel gestellt, das PFA entfernt und die fixierten Zellen dreimal für 5min mit je 2mL PBS gewaschen. Im Anschluss wurde ggf. eine Höchst-Färbung durchgeführt, indem eine 0,5mM Höchst-Stammlösung 1:200 in PBS verdünnt und je 1mL der hergestellten Verdünnung auf die Wells gegeben wurde. Die Zellen wurden für 10min dunkel gestellt und erneut dreimal für 5min mit je 2mL PBS gewaschen, gefolgt von Eindeckeln mit dem Dako Fluorescent Mounting Medium. Zum Festwerden wurden die Fluoreszenzpräparate zunächst 24h bei Raumtemperatur gelassen und anschließend bei 4°C gelagert. Für die Herstellung der Fluoreszenzaufnahmen wurden zwei Mikroskope verwendet: das Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop und das konfokale Laser-Scanning Mikroskop LSM510 von Zeiss. Die am CLSM hergestellten Fluoreszenzaufnahmen wurden zunächst mit Imaris und dann mit ImageJ 1.42I bearbeitet. Für die Bearbeitung der restlichen Fluoreszenzaufnahmen wurde ausschließlich ImageJ 1.42I verwendet.

2.2.7. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der qPCR-Daten wurde mit GraphPad Prism 4.03 und Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Für die statistische Analyse der restlichen Daten (u. a. der mtDNA- und Respirometrie-Daten) wurde Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Die Berechnung der p-Werte wurde mit der Einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.

Die Signifikanz der beobachteten Unterschiede zwischen den Messwerten wurde folgendermaßen gekennzeichnet:

- $p < 0,05$ *
- $p < 0,01$ **
- $p < 0,001$ ***

Die Fehlerbalken wurden als Standard Error of Mean (SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe eines adenoviralen Konstruktes wurden SH-SY5Y Neuroblastomazellen generiert, die einen knockdown der mitochondrialen Serin/Threonin-Kinase PINK1 aufweisen (Dissertation von Michael Klinkenberg). Die generierten Zellen wurden von Britta Muster selektioniert und zwei Klone mit der stärksten mRNA-Herunterregulation bei der weiteren Arbeit verwendet (Klon8 und Klon15). Allerdings hat sich der anfangs starke PINK1 KD bei KL15 bald als instabil erwiesen, so dass für weitere Versuche KL8 als PINK1 KD Neuroblastoma-Zellmodell herangezogen wurde. Die SH-SY5Y Zellen wurden zunächst mit dem für diese Zellen angegebenen Serumgehalt von 10% kultiviert (ATCC Product Description, 2011). Darauf folgend wurde jedoch erkannt, dass die PINK1 KD Zellen mit 5% Serum im Kulturmedium wesentlich langsamer wachsen als die entsprechend kultivierten NT Zellen (M. Jendrach, unveröffentlichte Daten). Daraus ergab sich die Frage, welche weiteren PINK1-abhängigen Veränderungen in den knockdown Zellen unter trophischem Stress zur Ausprägung kommen und inwiefern diese auf andere Parkinson Zellmodelle (PINK1 KD HeLa Zellen, kortikale PINK1 KO Neurone, sowie PINK1 KO und A53T alpha Synuclein überexprimierende kortikale Neurone) übertragbar sind.

3.1. Genexpression in Zellmodellen von *Morbus Parkinson*

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden zunächst die PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen auf eventuelle Veränderungen in der Genexpression untersucht (s. 3.1.1.). Als weitere Zellmodelle wurden SH-SY5Y Zellen und HeLa Zellen mit einem transienten PINK1 KD herangezogen (3.1.2. u. 3.1.3.). Darüber hinaus wurden kortikale Neurone sowohl aus PINK1 KO Mäusen als auch aus PINK1 KO und A53T alpha Synuclein überexprimierenden Mäusen auf Veränderungen auf der mRNA-Ebene überprüft (Abschn. 3.1.4.).

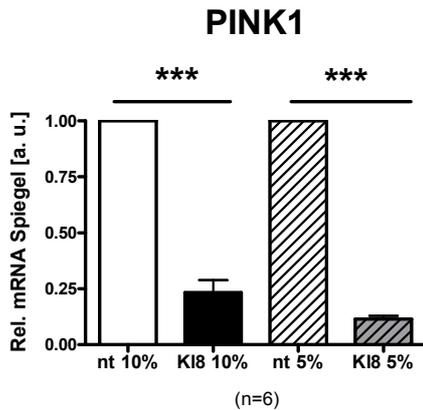
3.1.1. Stabiler knockdown von PINK1 führt bei Serumdeprivation zu einer Herunterregulation Parkinson-relevanter Gene in SH-SY5Y Zellen

Im Zeitraum von Oktober bis Dezember 2010 wurden die parallel bei 5% FCS und 10% FCS kultivierten PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen mittels TaqMan qPCR-System (2.2.2.3.) auf Veränderungen in der Genexpression bestimmter Parkinson-relevanter Gene im Vergleich zu den entsprechend kultivierten NT Zellen untersucht.

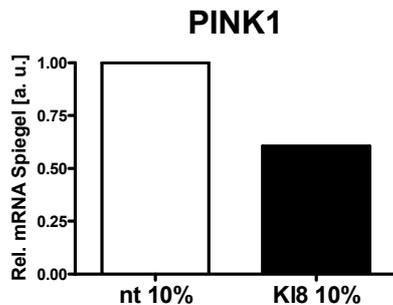
Der PINK1 KD blieb in den unter Serumdeprivation kultivierten Zellen auch über den genannten Zeitraum hinaus stabil, während die bei 10% FCS kultivierten Zellen 3 Monate nach Beginn dieser Arbeit das PINK1 hochreguliert hatten (*Abb.8*).

Ferner wurden umfassende Veränderungen in der Expression Parkinson-relevanter Gene in den PINK1 KD Zellen unter Serumentzug festgestellt, die bei 10% FCS nicht auftraten. Die beobachteten Effekte auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene waren unterschiedlich stark. Signifikante Ergebnisse sind in den Abbildungen 9-14 dargestellt und Tabelle 11 bietet einen Überblick über die Genexpression in den PINK1 KD Zellen.

a) Relative mRNA-Expression von PINK1 von Oktober bis Dezember 2010



b) Relative mRNA-Expression von PINK1:
Januar 2010



c) Relative mRNA-Expression von PINK1:
Januar - Juni 2010

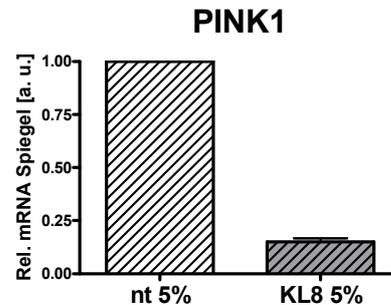


Abb.8: PINK1 mRNA Expression in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 10% FCS im Kulturmedium, bzw. unter trophischem Stress (5% FCS im Kulturmedium).

a) 10% FCS: $0,23 \pm 0,06$ a.u. ($p < 0,001$); 5% FCS: $0,12 \pm 0,01$ a.u. ($p < 0,001$)

b) Die Expression von PINK1 lag bei den unter 10% FCS kultivierten Zellen im Januar 2011 bei 60,57%.

c) Die Expression von PINK1 blieb bei 5% FCS im Medium über weitere sechs Monate stabil ($0,15 \pm 0,02$ a.u.; $p < 0,001$)

Der trophische Stress der Serumdeprivation führte zu einer signifikanten Herunterregulation von PARKIN und TRAP1, deren Genprodukte an der mitochondrialen Homöostase beteiligt sind und als Substrate des PINK1 Proteins diskutiert werden (Kim et al. 2008, Pridgeon et al. 2007; *Abb.9*). TRAP1 ist ein mitochondriales Chaperon aus der Familie der HSP90-Proteine, welches bei der oxidativen Stressantwort mitwirkt (Montesano et al. 2007). PARKIN ist eine E3-Ubiquitin Ligase, die an der Mitophagie und darüber hinaus an der mitochondrialen Dynamik beteiligt ist (Koh u. Chung, 2010). Eine weitere E3-Ubiquitin-Ligase, MARCH5 (Karbowski et al., 2007) und das an der Bildung der Cristae beteiligte GHITM (Ježek u. Hlavata, 2009) sind ebenfalls in die Regulation der mitochondrialen Dynamik

involviert und waren in den PINK1 KD Zellen unter Serumentzug signifikant herunterreguliert.

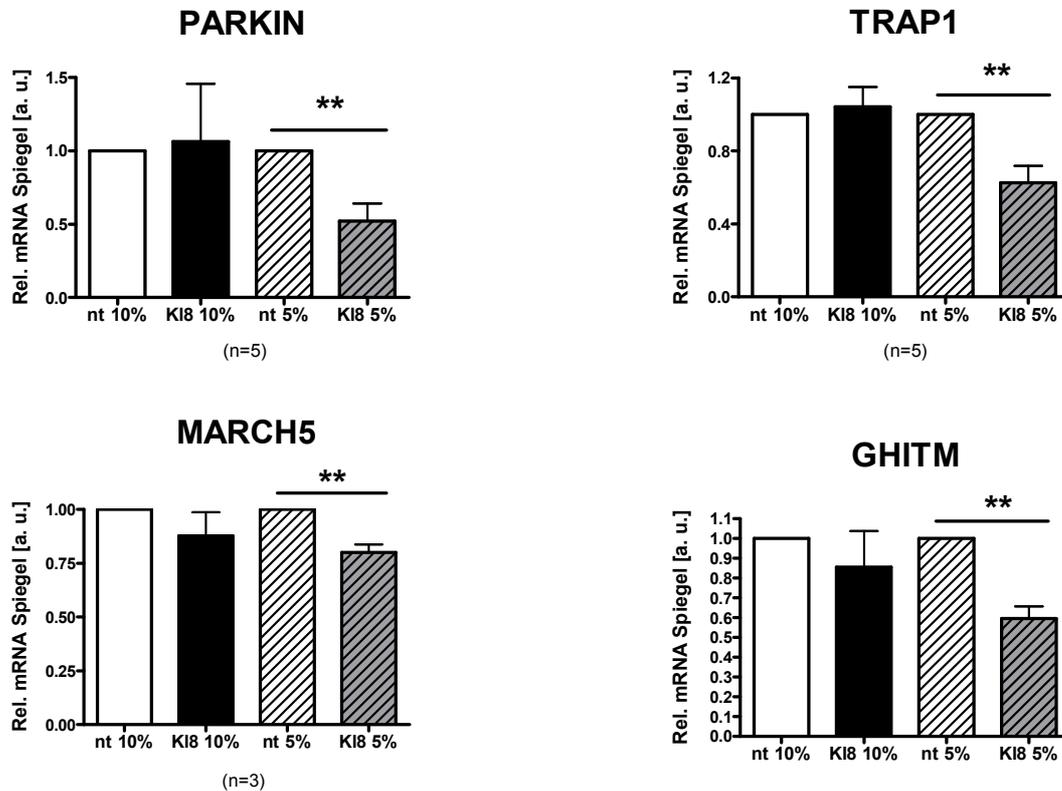


Abb.9: Relative mRNA-Expression diverser an der mitochondrialen Homöostase beteiligten Gene in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS, bezogen auf die korrespondierenden NT (non target) Zellen. PARKIN: $0,52 \pm 0,12$ a.u.; TRAP1: $0,62 \pm 0,094$ a.u. In beiden Fällen ist $p=0,004$. MARCH5: $0,8 \pm 0,04$ a.u. ($p=0,006$); GHITM: $0,68 \pm 0,06$ a.u. ($p=0,003$)

Die mitochondrialen Fissionsfaktoren DRP1, FIS1, MTP18, MFF, SH3GLB1 und GDAP1 waren in den bei 5% FCS kultivierten PINK1 KD Zellen auf der mRNA-Ebene signifikant herunterreguliert (Ježek u. Hlavata, 2009, Bernard und Karbowski, 2009; s. Abb.10).

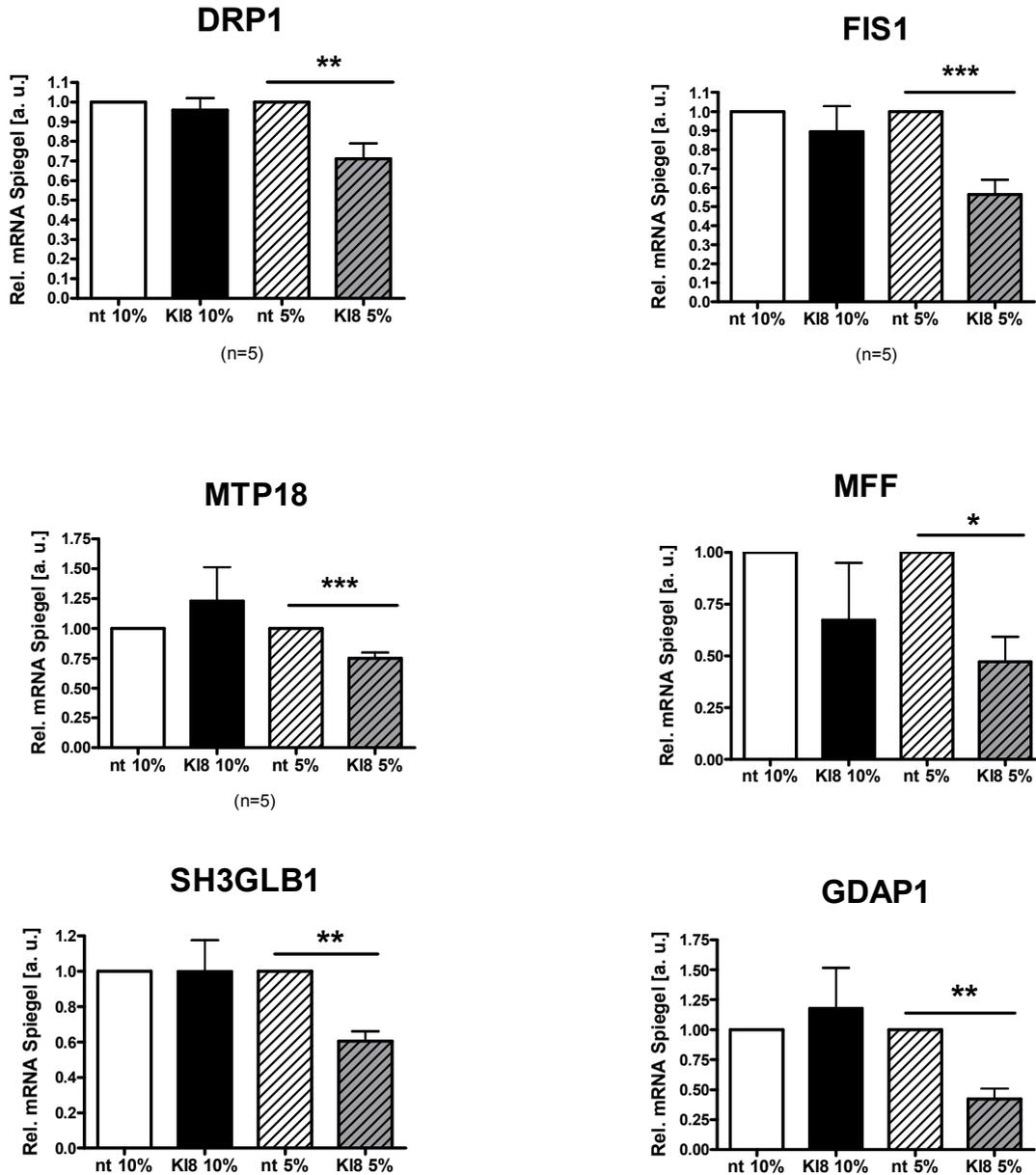


Abb.10: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Fissionsfaktoren in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS, bezogen auf die korrespondierenden NT (non target) Zellen. DRP1: $0,71 \pm 0,08$ a.u. ($p=0,006$); FIS1: $0,56 \pm 0,08$ a.u. ($p=0,0006$); MTP18: $0,75 \pm 0,05$ a.u. ($p=0,0008$); MFF: $0,47 \pm 0,12$ a.u. ($p=0,01$); SH3GLB1: $0,6 \pm 0,06$ a.u. ($p=0,002$); GDAP1: $0,42 \pm 0,09$ a.u. ($p=0,003$)

Eine signifikante Herunterregulation der mitochondrialen Fusionsfaktoren MFN1 und MFN2, deren Genprodukte für den Zusammenschluss von mitochondrialen Außenmembranen zuständig sind (Benard und Karbowski, 2009), wurde ebenfalls in den unter Serumentzug kultivierten Zellen beobachtet (Abb.11). Interessanterweise war das bei dem an der Fusion der mitochondrialen Innenmembranen beteiligten OPA1 nicht der Fall (s. Tab.11).

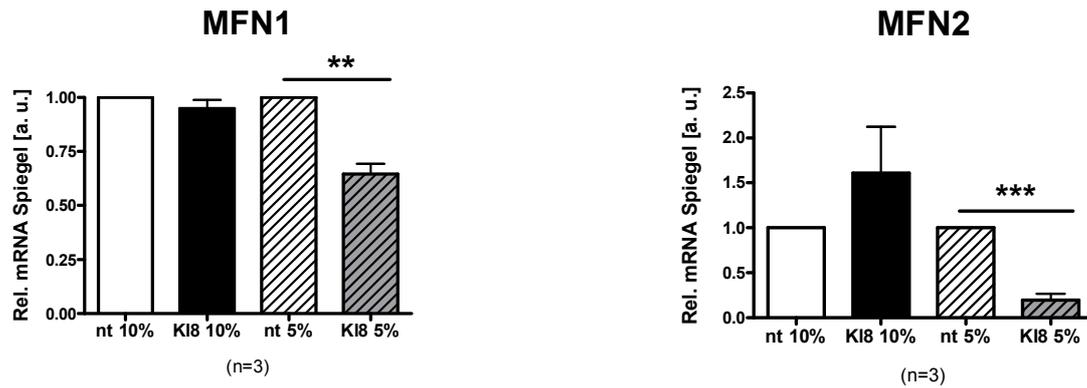
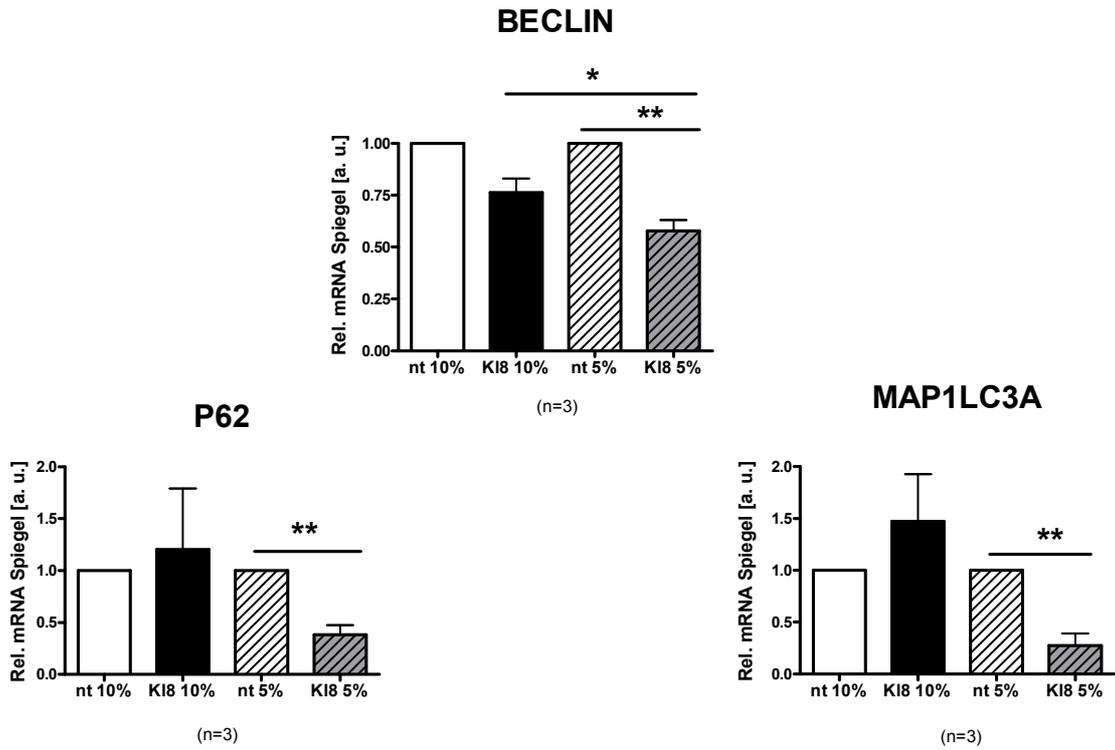


Abb.11: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Fusionsfaktoren in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS, bezogen auf die korrespondierenden NT (non target) Zellen. Mfn1: $0,65 \pm 0,05$ a.u. ($p=0,002$); Mfn2: $0,2 \pm 0,07$ a.u. ($p=0,0003$)

Die Expression der Gene, die für bestimmte Autophagie-assoziierte Proteine kodieren, war in den bei 5% FCS kultivierten Zellen im Bezug auf die entsprechenden NT Zellen vermindert (BECLIN, P62, MAP1LC3A, ATG7, LAMP2; s. *Abb.12*). Darüber hinaus wurde eine signifikante Herunterregulation von BECLIN in den KL8 Zellen bei Serumentzug im Vergleich zu den KL8 Zellen ohne Serumdeprivation beobachtet. Zwei der oben erwähnten Gene, BECLIN und P62, sind an der Initiation der Autophagie beteiligt (Glick et al. 2010). MAP1LC3A markiert abzubauenende Substrate und ist darüber hinaus ebenso wie ATG7 für die Verlängerung des Phagophors zuständig (Cherra et al. 2010). LAMP2 ist in die Chaperon-vermittelte Autophagie involviert, wobei es an lysosomalen Membranen lokalisiert ist und als Rezeptor für abzubauenende an Chaperone gebundene Proteine dient (Glick et al. 2010).

a)



b)

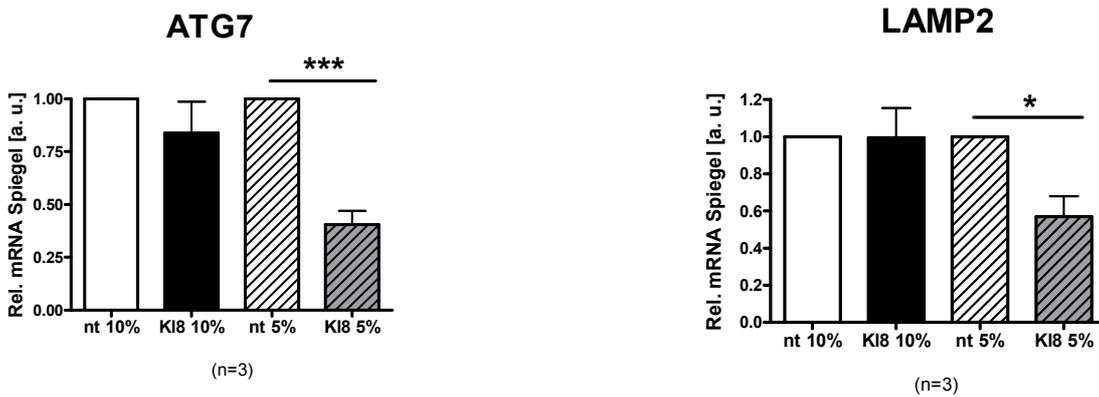


Abb.12: Relative mRNA-Expression der Autophagie-assoziierten Gene in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS, bezogen auf die korrespondierenden NT (non target) Zellen.

a) BECLIN: $0,58 \pm 0,05$ a.u. ($p=0,001$); P62: $0,38 \pm 0,09$ a.u. ($p=0,003$);
 MAP1LC3A: $0,27 \pm 0,12$ a.u. ($p=0,003$)
 b) ATG7: $0,4 \pm 0,07$ a.u. ($p=0,0008$); LAMP2: $0,57 \pm 0,11$ a.u. ($p=0,017$)

Die Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors PGC1 α (Puigserver 2005) war in den PINK1 KD Zellen sowohl mit als auch ohne Serumdeprivation vermindert (Abb.13). Im Gegensatz dazu war NRF2, ein weiterer mitochondrialer Transkriptionsfaktor (Hood et al. 2006), ausschließlich in den KL8 Zellen unter Serumentzug herunterreguliert (Abb.13). Die Expression von zwei weiteren Parkinson-relevanten Genen, α SYNUCLEIN und GLO1, war ebenfalls in den KL8 Zellen bei 5% FCS vermindert (Abb.14). Punktmutationen in α SYNUCLEIN sind die Ursache für die PARK1 Form der Parkinson Erkrankung. Das Protein ist ein Bestandteil der Lewy-Körperchen, wirkt außerdem bei dem Transport von Vesikeln mit und wurde neulich mit der Regulation der mitochondrialen Funktion in Verbindung gebracht (Schapira u. Gegg, 2011). GLO1 ist am Metabolismus toxischer Nebenprodukte der Glykolyse beteiligt und wurde als relevanter Faktor sowohl in Morbus Alzheimer als auch in Morbus Parkinson diskutiert (Auburger u. Kurz, 2011).

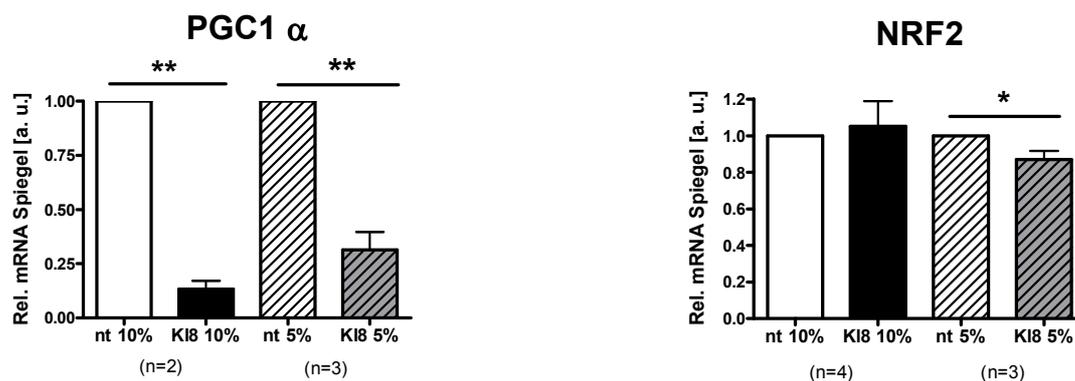


Abb.13: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Transkriptionsfaktoren PGC1 α und NRF2 in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS, bezogen auf die korrespondierenden NT (non target) Zellen. PGC1 α in den 5% FCS-Zellen: $0,31 \pm 0,08$ a.u. ($p=0,001$); in den 10% FCS Zellen: $0,13 \pm 0,04$ a.u. ($p=0,002$). NRF2: $0,87 \pm 0,05$ a.u. ($p=0,047$).

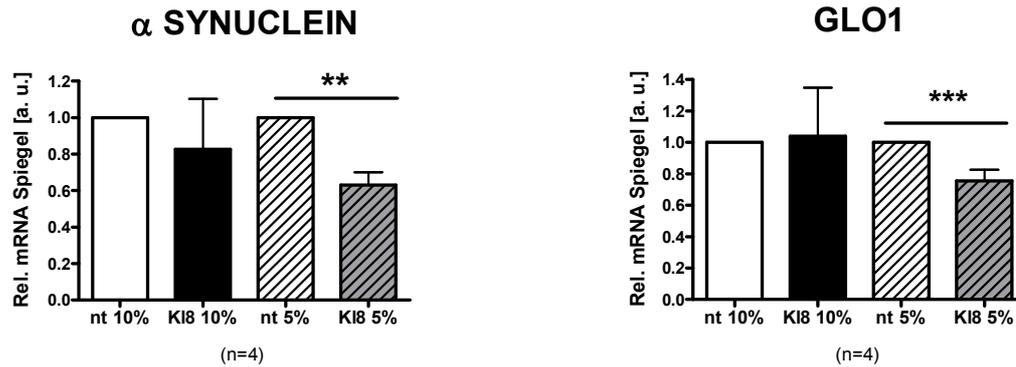


Abb.14: Relative mRNA-Expression von α SYNUCLEIN und GLO1 in den PINK1 KD Klon8 Zellen bei 10% und 5% FCS, bezogen auf die korrespondierenden NT (non target) Zellen. α SYNUCLEIN: $0,63 \pm 0,07$ a.u. ($p=0,002$); GLO1: $0,76 \pm 0,04$ a.u. ($p=0,0005$)

Tabelle 11 bietet einen Überblick über die Expression Parkinson-relevanter Gene in den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumdeprivation. Aufgeführt sind bereits erwähnte Gene mit signifikant veränderter Expression, sowie weitere Gene, deren Expression bei Serumentzug unverändert war (OMI, ATG5, LAMP1, ATP13A, SOD2, HIF1 α , I κ B, FOXO3a, SGK1) und Gene, die eine Tendenz zur Hochregulation (STOML2, NRF1, TFAM) oder Herunterregulation (PGC1 β) aufwiesen.

Tab.11: Relative Genexpression der PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen von Okt. bis Dez. 2010 bei 10% FCS und bei 5% FCS im Kulturmedium, bezogen auf die entsprechenden NT (non target) Zellen.

N.g. = "nicht gemessen"

Gengruppe	Gen	Beschreibung	Relative mRNA Expression (Okt-Dez. 2010)		
			10% FCS	5% FCS	n
Gene für diverse Mitochondrien-assoziierte Proteine	PINK1	PTEN Induced Putative Kinase 1	↓***	↓***	6
	PARKIN	E3-Ubiquitin Ligase	-	↓**	5
	TRAP1	TNFR-Associated Protein 1, mitochondriales Chaperon	-	↓**	5
	OMI	HTRA2 (Serin-Protease)	-	-	5
	MARCH5	Ubiquitin-Ligase	-	↓**	3
	GHITM	Growth Hormone Inducible Transmembrane Protein, ein "Cristae Organisation Factor"	-	↓**	3
	STOML2	Stomatin-Like 2	-	↑	1
Mitochondriale Teilungsfaktoren	DRP1	Dynamin Related Protein 1	-	↓**	5
	FIS1	Fission 1	-	↓***	5
	MTP18	Mitochondrial Protein 18	-	↓***	5
	MFF	Mitochondrial Fission Factor	-	↓*	3
	SH3GLB1	SH3-Domain GRB2-Like Endophilin B1	-	↓**	3
	GDAP1	Ganglioside-Induced Differentiation Associated Protein1	-	↓**	3
Mitochondriale Fusionsfaktoren	MFN1	Mitofusin 1, Fusionsfaktor für die mit. Außenmembran	-	↓**	3
	MFN2	Mitofusin 2, Fusionsfaktor für die mit. Außenmembran	-	↓***	3
	OPA1	Optic Atrophy 1, Fusionfaktor für die mitochondriale Innenmembran	-	-	3
Autophagie-assoziierte Gene	BECLIN	ATG6, beteiligt an der Bildung des Phagophors	-	↓**	3
	P62	SQSTM1, verbindet LC3 mit polyubiquitinierten Substraten	-	↓**	3
	ATG5	Bindet Atg12 und ist an der Verlängerung des Phagophors beteiligt	-	-	3
	ATG7	Aktiviert Atg12 durch einen E1-Ubiquitin Ligase ähnlichen Mechanismus	-	↓***	3
	MAP1LC3A	ATG8, bewahrt die Integrität des wachsenden Phagophors und markiert abzubauen Substrate	-	↓**	3
	LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1	-	-	4
	LAMP2	Lysosomal-Associated Membrane Protein 2	-	↓*	3
Transkriptionsfaktoren für mitochondriale Gene	PGC1α	PPARGC1A, bindet CREB und NRFs	↓**	↓**	2, 3
	PGC1β	Transkriptionsfaktor, beteiligt an der mit. Biogenese	↑	↓	1
	NRF2	NFE2L2, besitzt eine Leucin-Reißverschluss-Domäne	-	↓*	4, 3
	NRF1	Nuclear Respiratory Factor 1	n.g.	↑	2
	TFAM	Transcription Factor A; beteiligt an der Transkription und Replikation der mitochondrialen DNA	n.g.	↑	2
Sonstige Parkinson-relevante Gene	α SYNUCLEIN	SNCA, beteiligt am Vesikeltransport	-	↓**	4
	GLO1	Glyoxalase I, bewirkt zusammen mit Glo2 die Umsetzung von Methylglyoxal zu Lactat	-	↓***	4
	ATP13A	P-Typ ATPase	↑*	-	3
	SOD2	Superoxid-Dismutase 2,	-	-	3
	HIF1α	Hypoxia Inducible Factor 1 alpha	↑**	-	3
	IκB	NFKBIA, Inhibitor von NFκB	-	-	3
	FOXO3a	Forkhead Box O3, ein an der Apoptose beteiligter Transkriptionsfaktor	-	-	3
	SGK1	Serum / Glucocorticoid Regulated Kinase 1, eine Serin / Threonin Kinase, die diverse Ionenkanäle aktiviert und bei der Zellstressantwort mitwirkt	-	-	3

Die Expression der in der *Tabelle 1* aufgeführten signifikant herunterregulierten Gene wurde in den unter 5% FCS kultivierten Zellen über die nächsten sechs Monate verfolgt, mit Ausnahme von PGC1 α und MARCH5. Hierbei hat sich die verminderte Expression folgender Gene als besonders stabil erwiesen: des mitochondrialen "Cristae-organisation" Faktors GHITM, des mitochondrialen Fusionsfaktors MFN1, des Autophagie-assoziierten Gens LAMP2 und des am Vesikeltransport und möglicherweise an der mitochondrialen Dynamik beteiligten α SYNUCLEIN. Im Gegensatz dazu wurde die MTP18-mRNA in der Zwischenzeit deutlich hochreguliert. Bei der Expression der restlichen hier untersuchten Gene wurden Schwankungen beobachtet (*Tab.12*).

Tab.12: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen von Jan. bis Juni 2011 bei 5% FCS im Kulturmedium, bezogen auf die entsprechenden NT (non target) Zellen. N.g. = "nicht gemessen"

Gengruppe	Gen	Relative mRNA Expression in den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen				
		Januar	Februar	April	Mai	Juni
Gene für diverse Mitochondrien-assoziierte Proteine	PINK1	↓	↓	↓	↓	↓
	PARKIN	↑	↓	↓	-	↓
	TRAP1	-	↓	↓	↑	↓
	GHITM	↓	↓	↓	↓	↓
Mitochondriale Teilungsfaktoren	DRP1	↓	↓	-	-	↓
	FIS1	↓	↓	↓	-	↓
	MTP18	↑	↑	-	↑	↑
	MFF	-	↓	↓	-	↓
	SH3GLB1	-	↓	-	-	↓
	GDAP1	↓	↓	-	↑	↑
Mitochondriale Fusionsfaktoren	MFN1	↓	↓	↓	↓	↓
	MFN2	↓	↓	-	↑	n.g.
Autophagie-assoziierte Gene	BECLIN	↓	↓	-	↓	↓
	P62	↓	↓	-	↑	↓
	ATG7	↓	↓	↓	-	↓
	MAP1LC3A	↓	↓	↓	-	↓
	LAMP2	↓	↓	↓	↓	↓
Transkriptionsfaktoren für mitochondriale Gene	NRF2	↓	↓	↓	↑	↓
Sonstige Parkinson-relevante Gene	α SYNUCLEIN	↓	↓	↓	↓	↓
	GLO1	↓	↓	-	↓	↓

Um die physiologischen Bedingungen im Gehirn besser in der Zellkultur zu simulieren, wurde Anfang Juni 2011 ein Teil der unter Serumentzug kultivierten Zellen auf ein Medium mit 1g/L Glucose umgestellt, was einer 50%igen Reduktion der Glucose im Wachstumsmedium entspricht. Nach einem Anpassungszeitraum von

einem Monat wurde die Genexpression der betreffenden Zellen mittels qPCR analysiert. Durch die Reduktion des Glucose-Gehaltes im Medium wurde eine Hochregulation von PINK1 auf 57,85% ausgelöst. Ebenso wurde ein Anstieg in der Expression von folgenden bisher herunterregulierten Genen beobachtet: PARKIN, TRAP1, DRP1, FIS1, GHITM und MAP1LC3A (Tab.12 und 13). Ähnlich dazu wurden auch MTP18, GDAP1 und MFN2 hochreguliert. Im Gegensatz zu den erwähnten Befunden blieb die Expression von SH3GLB1, MFN1 und LAMP2 auch nach Reduktion der Glucose im Medium verringert. In diesem Kontext war es interessant, die mRNA-Expression von FOXO3A und dessen Regulators SGK1 (Lang et al. 2009) zu analysieren, da sie an der Regulation der Glykolyse beteiligt sind (Khatri et al. 2010). Der Serumentzug hat bisher die Expression dieser beiden Gene in den PINK1 KD Zellen nicht beeinflusst (Tab.11). Nach Reduktion der Glucose im Kulturmedium wurde allerdings eine Hochregulation sowohl von FOXO3a als auch von SGK1 beobachtet (Tab.13).

Tab.13: Relative mRNA-Expression der PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 5% FCS und 1g/L Glucose im Kulturmedium, bezogen auf die entsprechenden NT (non target) Zellen (n=1). a.u. = "arbitrary units" (willkürliche Einheiten)

Relative mRNA Expression in den PINK1 KD SHSY5Y Zellen bei 5% FCS und 1g/L Glucose		
Gen	Relative Expression	[a.u.]
PINK1	↓	0,5784844
PARKIN	↑	1,238418
TRAP1	↑	1,213981
DRP1	↑	1,200862
FIS1	-	0,9419473
MTP18	↑	1,151301
SH3GLB1	↓	0,8595164
GHITM	↑	1,133444
GDAP1	↑	1,445757
MFN1	↓	0,8580785
MFN2	↑	1,63243
MAP1LC3A	↑	2,235539
LAMP2	↓	0,7829622
FOXO3A	↑	2,063379
SGK1	↑	1,81707

3.1.2. Transienter knockdown von PINK1 kann die mRNA-Befunde aus den SH-SY5Y Zellen mit stabilem PINK1 KD nicht reproduzieren

Zur Überprüfung, ob die in den SH-SY5Y Zellen mit stabilem PINK1 KD beobachteten Abweichungen in der Genexpression auch nach transienter Herunterregulation von PINK1 auftreten, wurden durch Elektroporation mit PINK1 siRNA SH-SY5Y Zellen mit transientem PINK1 KD generiert und 72h nach Transfektion analysiert (*Tab.14*). Dabei wurde die Expression derjenigen Gene untersucht, welche die stärksten Veränderungen in den Zellen mit stabilem PINK1 KD gezeigt hatten (PARKIN, TRAP1, DRP1, FIS1, MTP18, MFN2, BECLIN, P62, ATG7, LAMP2, α SYNUCLEIN, GLO1). Als Kontrolle wurden mit "scrambled" RNA (scrRNA) transfizierte SH-SY5Y Zellen herangezogen, da diese keine Zielsequenz im menschlichen Genom hat.

Bei den unter 10% FCS kultivierten Zellen konnte kein signifikanter knockdown des PINK1-Gens erreicht werden. Es war eine Tendenz zur Herunterregulation von PINK1 zu sehen, die bei den restlichen hier analysierten Genen mit Ausnahme von alpha Synuclein nicht vorkam (*Abb.15*).

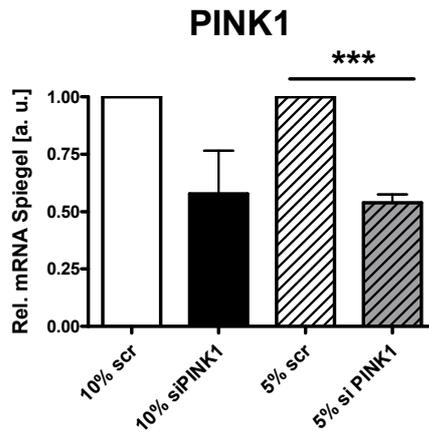
Bei den unter 5% FCS kultivierten Zellen lag der PINK1-knockdown bei $46,1\% \pm 3,6\%$ (*Abb.15*). Dieser knockdown war ausreichend, so dass die oben aufgeführten Gene untersucht wurden. Nur LAMP2 zeigte eine sehr geringe, allerdings mathematisch signifikante Herunterregulation (*Tab.14* und *Abb.15*). Im Gegensatz zu den Befunden in den Zellen mit stabilem PINK1 KD waren DRP1 und MTP18 hochreguliert und die Expression der restlichen analysierten Gene war nicht verändert.

Tab.14: Relative Genexpression in SH-SY5Y Zellen mit transientem PINK1 knockdown 72h nach der Transfektion, bezogen auf Kontroll-Zellen, die mit scrRNA transfiziert wurden (n=3).

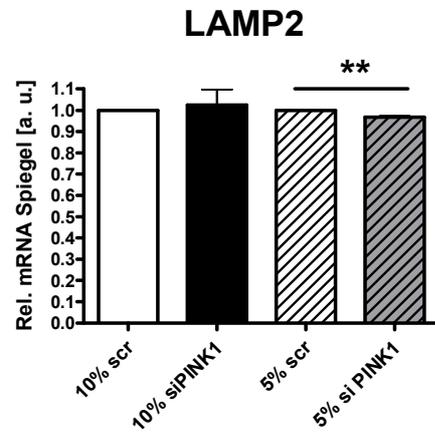
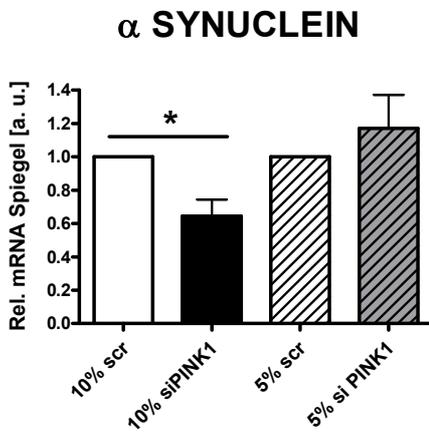
Gen	Transient transfizierte SH-SY5Y Zellen, kultiviert bei 5% FCS
PINK1	↓ ***
PARKIN	-
TRAP1	-
DRP1	↑ **
FIS1	-
MTP18	↑ ***
MFN2	-
BECLIN	-
P62	-
ATG7	-
LAMP2	↓ **
α SYNUCLEIN	-
GLO1	-

Somit konnte gezeigt werden, dass die bei den SH-SY5Y Zellen mit einem stabilen PINK1 KD unter Serumdeprivation beobachteten Veränderungen in der Genexpression der in der *Tabelle 4* aufgeführten Parkinson-relevanten Gene durch einen transienten PINK1 KD nicht reproduziert werden konnten.

a)



b)



c)

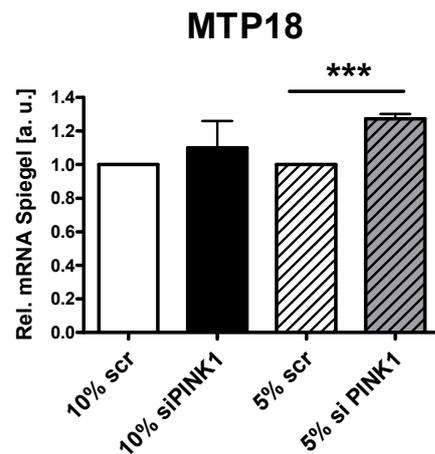
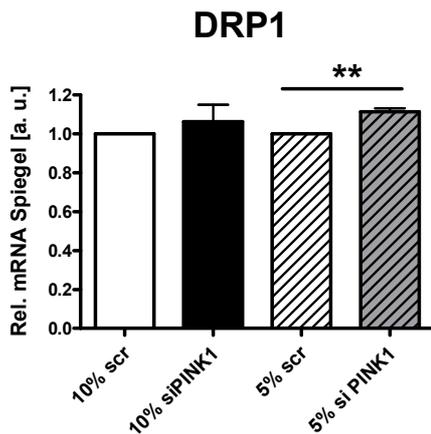


Abb.15: Relative mRNA-Expression in SH-SY5Y Zellen mit transientem PINK1 KD 72h nach der Transfektion (n=3):

a) PINK1: $0,54 \pm 0,04$ a.u. ($p=0,0002$);

b) α SYNUCLEIN: $0,64 \pm 0,1$ a.u. ($p=0,02$); LAMP2: $0,97 \pm 0,004$ a.u. ($p=0,002$);

c) DRP1: $1,1 \pm 0,02$ a.u. ($p=0,003$); MTP18: $1,27 \pm 0,03$ a.u. ($p=0,0007$)

3.1.3. HeLa Zellen mit einem transienten knockdown von PINK1 weisen eine Hochregulation von SH3GLB1 und MFN1 auf

Wie zu Beginn von Abschnitt 3 angesprochen, war eine interessante Frage, inwiefern die PINK1-abhängigen Effekte auf die mRNA-Expression anderer Gene, die bei den Neuroblastomazellen unter Serumentzug auftraten, auf weitere Zellmodelle übertragbar sind. Dieses Thema wird besonders spannend, wenn es im Kontext bereits beschriebener Effekte der PARK6 Form von Morbus Parkinson auf außerhalb des dopaminergen Systems lokalisierte Zellen betrachtet wird. Physiologische PINK1 bedingte Veränderungen wurden bisher bei PARK6 Fibroblasten beschrieben (Hoepken et al. 2008, Klinkenberg et al. 2010). Dieser Frage wurde zunächst in HeLa Zellen mit transientem PINK1 knockdown nachgegangen. Weiterhin wurden auch PINK1 KO, sowie PINK1 KO und A53T α Synuclein- überexprimierende Neurone untersucht.

Die PINK1 KD HeLa wurden mittels Transfektion mit Effectene generiert (M. Jendrach). Als Kontrolle wurden mit scrRNA transfizierte HeLa Zellen herangezogen. Die transformierten HeLa Zellen wurden 48h nach Transfektion mittels qPCR analysiert. Dabei wurden die mitochondrialen Fissionsfaktoren DRP1, FIS1, MTP18, MFF SH3GLB1 und GDAP1, sowie das an der Bildung der Cristae beteiligte GHITM und die mitochondrialen Fusionsfaktoren MFN1, MFN2 und OPA1 untersucht. Ferner wurde die Expression des Autophagie-assoziierten MAP1LC3A und des mitochondrialen Transkriptionsfaktors PGC1 α analysiert. Dadurch wäre es möglich, Hinweise auf eventuelle Veränderungen in mehreren die Mitochondrien betreffenden zellulären Vorgängen zu erlangen (mitochondriale Biogenese und Dynamik, Mitophagie). Trotz eines signifikanten knockdowns des PINK1-Gens auf 24,9% \pm 7,02% wurde im Gegensatz zu dem stabilen Neuroblastoma-Zellmodell keine Herunterregulierung der restlichen hier untersuchten Gene beobachtet (*Tab.15, Abb.16*), was mit den Ergebnissen zu den SH-SY5Y Zellen mit transientem PINK1 KD korreliert.

Tab.15: Relative Genexpression der PINK1KD HeLa Zellen 48h nach Transfektion, bezogen auf Kontrollzellen, die mit scrRNA transfiziert wurden (n=3).

Gen	PINK1 KD HeLa (48h nach Transfektion)
PINK1	↓ ***
DRP1	-
FIS1	-
MTP18	-
MFF	-
SH3GLB1	↑ **
GDAP1	-
GHITM	-
MFN1	↑ **
MFN2	-
OPA1	-
MAP1LC3A	-
PGC1α	-

Der mitochondriale Fusionsfaktor MFN1 war auf $120\% \pm 4\%$ hochreguliert und bei dem mitochondrialen Teilungsfaktor SH3GLB1 wurde ebenfalls eine Hochregulation auf $123,7\% \pm 3,4\%$ beobachtet (Abb.16).

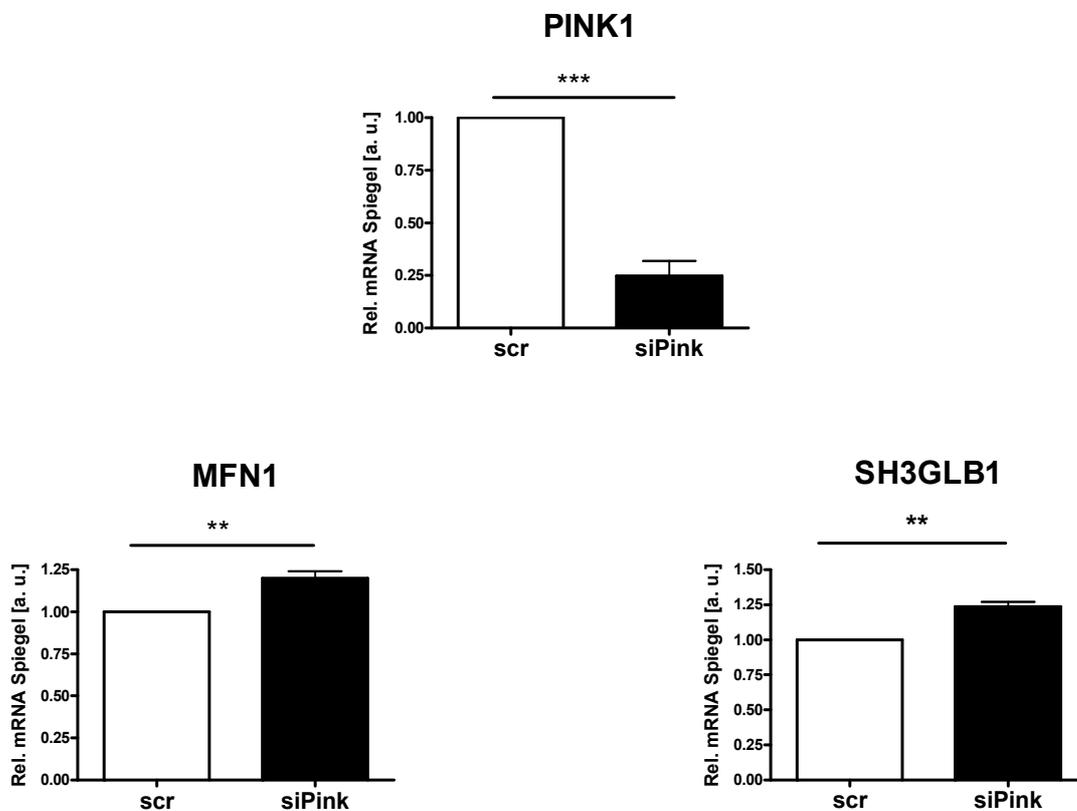


Abb.16: Relative mRNA-Expression in den PINK1 KD HeLa Zellen 48h nach Transfektion (n=3). PINK1: $0,249 \pm 0,07$ a.u. ($p=0,0004$); MFN1: $1,2 \pm 0,04$ a.u. ($p=0,007$); SH3GLB1: $1,237 \pm 0,034$ a.u. ($p=0,002$)

Bezüglich der Expression Parkinson-relevanter Gene konnten somit keine Ähnlichkeiten zwischen den bei Serumdeprivation kultivierten SH-SY5Y Zellen mit einem stabilen PINK1 KD und den HeLa Zellen mit einem transienten PINK1 KD festgestellt werden.

3.1.4. Kortikale Neurone

3.1.4.1. Kortikale Neurone aus PINK1 knockout Mäusen zeigen eine Abweichung in der Expression diverser Parkinson-relevanter Gene

Aus Wildtyp (WT) und PINK1 KO- Mäusen (Gispert et al. 2009) wurden kortikale Neurone isoliert (M. Jendrach). Die Neurone wurden nach 14, 20 und 28 Tagen in vitro (DIV) auf Veränderungen in der Genexpression überprüft. Es wurden folgende bei den SH-SY5Y Zellen bereits analysierte Gene untersucht:

- mitochondriale Teilungsfaktoren (Drp1, Fis1, Mtp18, Mff, Sh3glb1 u. Gdap1),
- mitochondriale Fusionsfaktoren (Mfn1, Mfn2 u. Opa1),
- mitochondriale Transkriptionsfaktoren Pgc1 α und PGC1 β ,
- das an der Bildung der Cristae beteiligte Ghitm,
- das Autophagie-assoziierte Gen Map1lc3a,
- das für den Transport von Vesikeln zuständige α -Synuclein
- Glo1, welches bei der Detoxifikation schädlicher Nebenprodukte der Glykolyse mitwirkt.

Darüber hinaus wurden drei weitere Parkinson-relevante Gene analysiert:

- Phb2 (*Prohibitin2*; bildet zusammen mit Phb1 einen an der mit. Innenmembran lokalisierten Komplex, dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt ist; Artal-Sanz u. Tavernarakis, 2010),
- Pld6 (*Phospholipase D6, MitoPLD*; spielt möglicherweise eine Rolle bei der mitochondrialen Fusion; Huang u. Frohman 2009),
- Mib (*Mitofusin Binding Protein*; wird als Inhibitor der mit. Fusion diskutiert; Benard u. Karbowski, 2009).

Es wurde festgestellt, dass ähnlich zu dem SH-SY5Y-Zellmodell mit stabilem PINK1 KD einige der analysierten Gene herunterreguliert waren, insbesondere bei den 14 DIV Neuronen (Tab.16). Allerdings waren andere Gene unverändert oder gar hochreguliert. Somit konnte das mRNA-Profil der oben erwähnten SH-SY5Y Zellen in den PINK1 KO Neuronen nicht reproduziert werden.

Tab.16: Relative mRNA-Expression der PINK1 KO kortikalen Neurone nach unterschiedlich langer Kultivierungszeit (14, 20 u. 28DIV), bezogen auf korrespondierende WT-Neurone (n=1)

Gen	PINK1 KO Neurone (14DIV)	PINK1 KO Neurone (20DIV)	PINK1 KO Neurone (28DIV)
Pink1	↓	↓	↓
Drp1	↑	↑	-
Fis1	-	↑	-
Mtp18	↓	↑	↓
Mff	-	-	-
Sh3glb1	↑	↑	-
Ghitm	↓	↑	-
Gdap1	↓	↑	↑
Mfn1	-	↑	↑
Mfn2	-	↑	↑
Opa1	↓	↑	-
Map1lc3a	-	↑	↑
Pgc1α	-	↑	↑
Pgc1β	↓	-	↑
α Synuclein	↑	↑	↓
Glo1	↑	↓	-
Phb2	↓	↑	↓
Mib	↓	-	↑
Pld6	-	↓	↑

Da in den oben dargestellten Versuchen bestimmte Übereinstimmungen mit dem SH-SY5Y PINK1 KD Zellmodell beobachtet wurden, war der nächste Schritt herauszufinden, ob diese durch zusätzlichen trophischen Stress verstärkt oder vielleicht weitere Effekte produziert werden können. Dafür wurde die RNA aus 20 Tage kultivierten und dann mit HBSS gestressten PINK1 KO Neuronen (M. Klinkenberg) mittels qPCR analysiert. Die Neurone waren 20 Tage in Kultur. Hierdurch wurde festgestellt, dass die PINK1 KO Neurone nach 4h und 8h Aminosäurenentzug eher eine Hochregulation der untersuchten Gene aufweisen im Vergleich zu entsprechend behandelten Wildtyp-Neuronen. Im Gegensatz dazu konnten in den PINK1 KO Neuronen nach 12h Aminosäurenentzug einige Gemeinsamkeiten mit dem PINK1 KD SH-SY5Y Zellmodell beobachtet werden (*Tab. 17*).

Tab.17: Relative mRNA-Expression der PINK1 KO kortikalen Neurone (20 DIV) nach unterschiedlich langer Behandlung mit HBSS (4h, 8h und 12h HBSS), bezogen auf entsprechend behandelte WT-Neurone

Gen	PINK1 KO Neurone (20DIV)		
	4h HBSS	8h HBSS	12h HBSS
Drp1	↑	-	↓
Fis1	↑	↑	↓
Mtp18	-	↑	↑
Mff	↑	-	↓
Sh3glb1	-	↓	↓
Ghitm	-	↑	↓
Gdap1	↑	↑	-
Mfn1	-	↑	-
Mfn2	↑	↑	↓
Opa1	↑	↑	↓
Phb2	-	↑	-
Mib	↑	↑	-
Pld6	-	-	↓

Da *M. Parkinson* einen altersbedingten Ausbruch aufweist, war es interessant nachzuvollziehen, inwiefern die Kultivierungszeit das mRNA-Profil der PINK1 KO Neurone beeinflussen würde und ob dieses dann mehr Gemeinsamkeiten mit dem mRNA-Profil der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen würde. Daher wurde der beschriebene HBSS-Versuch mit länger kultivierten Neuronen wiederholt (22DIV und 32DIV). Diesmal wurde der Aminosäurenentzug auf 16h verlängert und eine zusätzliche Kontrolle ohne HBSS-Behandlung herangezogen (Tab.18).

Tab.18: Relative mRNA-Expression der PINK1 KO kortikalen Neurone (22DIV und 32DIV) mit und ohne 16h Aminosäuredeprivation, bezogen auf entsprechend behandelte WT-Neurone (n=1). DIV = Tage in Kultur ("Days *in vitro*"); Ctrl = Kontroll- PINK1 KO Neurone ohne HBSS-Behandlung; HBSS = PINK1 KO Neurone nach 16h Aminosäurenentzug

Gen	Relative mRNA Expression in den PINK1 KO Neuronen mit u. ohne 16h Aminosäuredeprivation			
	22DIV		32DIV	
	Ctrl	HBSS	Ctrl	HBSS
Drp1	↓	↓	↓	↓
Fis1	↓	↑	-	↓
Mtp18	↑	↑	-	↓
Mff	↓	↓	-	↓
Sh3glb1	↓	-	-	↓
Ghitm	↑	↑	↑	↑
Gdap1	↑	↑	-	↓
Mfn1	↓	↓	-	↓
Mfn2	↓	↑	-	↑
Opa1	↑	↑	↑	↓
Phb2	↑	-	↑	↓
Mib	↓	↓	-	↑
Pld6	↓	↓	↑	-
Drp1	↓	↑	-	-
Fis1	↑	↑	↑	↑

Im mRNA-Profil der 22DIV und 32DIV PINK1 KO Neuronen waren auch ohne Aminosäurenentzug deutliche Unterschiede zu sehen. Bei den 22DIV Neuronen waren viele Gene auch ohne HBSS-Behandlung herunterreguliert (*Tab.18, Spalte 22DIV Ctrl*), während sie bei den 32DIV eher unverändert waren (*Tab.18, Spalte 32DIV Ctrl*). Folglich war die Genexpression in den 22DIV Neuronen nach HBSS-Behandlung ähnlich zu der bei den 22 DIV Neuronen unter Kontrollbedingungen, während bei den 32DIV Neuronen viele Gene erst nach Behandlung mit HBSS herunterreguliert wurden (Fis1, Mtp18, Mff, Sh3glb1, Gdap1, Mfn1, Opa1, Phb2).

Zusammengefasst wurden bezüglich der Expression Parkinson-relevanter Gene gewisse Ähnlichkeiten zwischen den PINK1 KO kortikalen Neuronen (20 DIV mit 12h HBSS und 32DIV mit 16h HBSS) und den SH-SY5Y Zellen mit stabilem PINK1 KD festgestellt. Das mRNA-Profil der PINK1 KO Neurone stimmte allerdings nicht vollkommen mit dem der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen überein.

3.1.4.2. PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierende kortikale Neurone zeigen eine Herunterregulation von Map1lc3a, sowie der mitochondrialen Fissionsfaktoren Fis1, Sh3glb1 und Mib

Aus den Hirnen von PINK1 KO und A53T alpha Synuclein überexprimierenden 2 Tage alten Mäusen (S. Gispert) wurden kortikale Neurone isoliert (M. Jendrach) und nach 17 und 28 Tagen in Kultur mittels qPCR analysiert. Dabei wurden die bei den PINK1 KO Neuronen (3.1.4.2.) bereits analysierten Gene untersucht und beträchtliche Unterschiede in der Genexpression ermittelt. Bei den 17DIV Neuronen waren die meisten der untersuchten Gene hochreguliert (n=1; s. Tab.19). Ausnahmen dazu waren Pgc1 β , Glo1 und Pld6, deren mRNA-Spiegel vermindert waren und Phb2, dessen Expression unverändert war. Andererseits waren viele Gene bei den 28DIV Neuronen herunterreguliert (Fis1, Sh3glb1, Map1lc3a, Mib; n=2, s. Abb.17 u. 18) oder zeigten eine gewisse Tendenz dazu (Mtp18, Ghitm, Mfn1, Mfn2, Opa1, α Synuclein). Die Expression der restlichen hier analysierten Gene war in den 28DIV Neuronen nicht verändert (Drp1, Mff, Gdap1, Pgc1 α , Pgc1 β , Phb2) mit Ausnahme von Glo1, welches hochreguliert war.

Tab.19: Relative mRNA-Expression der 17 und 28 Tage kultivierten PINK1 KO und A53T alpha Synuclein überexprimierenden kortikalen Neurone, bezogen auf entsprechende Wildtyp-Neurone. DIV = Tage in Kultur; n.g. = nicht gemessen. n=1 für die 17DIV, bzw. n=2 für die 28DIV Neurone.

Gen	PINK1 KO und A53T alpha Synuclein überexprimierende Neurone	
	17DIV	28DIV
Pink1	↓	↓ ***
Drp1	↑	-
Fis1	↑	↓ *
Mtp18	↑	↓
Mff	↑	-
Sh3glb1	↑	↓ **
Ghitm	↑	↓
Gdap1	↑	-
Mfn1	↑	↓
Mfn2	↑	↓
Opa1	↑	↓
Map1lc3a	↑	↓ *
Pgc1 α	↑	-
Pgc1 β	↓	-
α Synuclein	↑	↓
Glo1	↓	↑ *
Phb2	-	-
Mib	↑	↓ **
Pld6	↓	n.g.

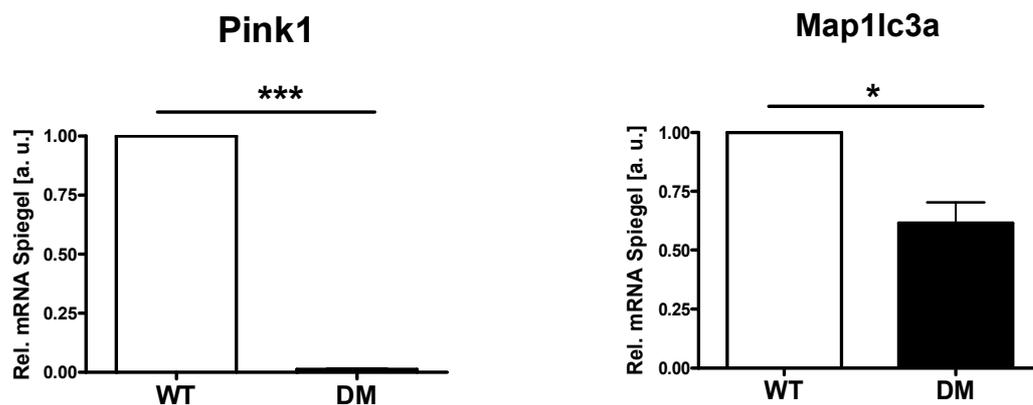


Abb.17: Relative mRNA-Expression von Pink1 und Map1lc3a in den PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierenden kortikalen Neuronen nach 28 Tagen in Kultur, bezogen auf korrespondierende Wildtyp-Neurone (n=2). PINK1: $0,013 \pm 0,003$ a.u. ($p < 0,001$); Map1lc3a: $0,615 \pm 0,088$ a.u. ($p = 0,048$)

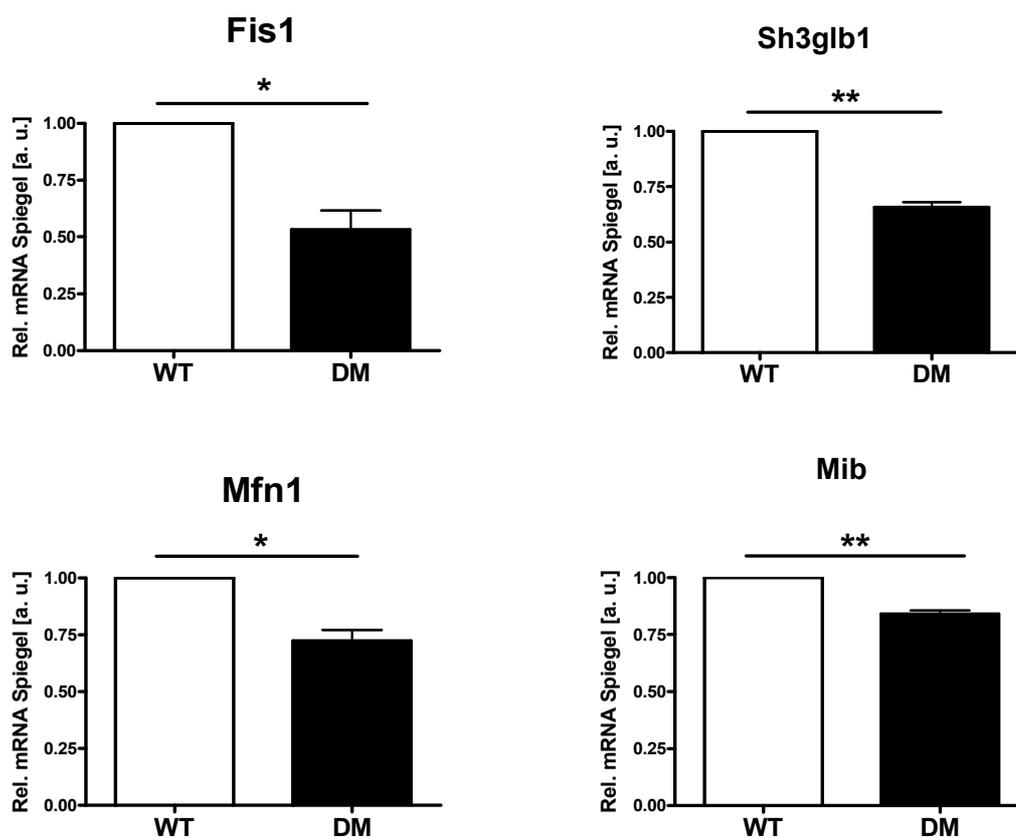


Abb.18: Relative mRNA-Expression von mitochondrialen Fusions- und Teilungsfaktoren in den PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierenden kortikalen Neuronen nach 28 Tagen in Kultur, bezogen auf korrespondierende Wildtyp-Neurone (n=2). Fis1: $0,531 \pm 0,08$ a.u. ($p = 0,03$); Sh3glb1: $0,66 \pm 0,02$ a.u. ($p = 0,004$); Mfn1: $0,724 \pm 0,05$ a.u. ($p = 0,03$); Mib: $0,84 \pm 0,02$ a.u. ($p = 0,009$)

Zusammenfassend wurde zunächst eine Herunterregulation vieler Parkinson-relevanter Gene in den unter Serumentzug kultivierten SH-SY5Y Zellen mit einem stabilen knockdown von PINK1 beobachtet (3.1.1.). Die Gene konnten dabei in vier Kategorien eingeteilt werden: Gene, deren Produkte diverse Rollen bei der mitochondrialen Homöostase spielen ("mitochondriale Gene"), mitochondriale Teilungs-, Fusions- und Transkriptionsfaktoren, Autophagie-assoziierte Gene und sonstige Parkinson relevante Gene. Die Befunde liefern einen Hinweis darauf, dass der knockdown von PINK1 potentiell Auswirkungen auf viele verschiedene zelluläre Prozesse haben könnte. Die Herunterregulation von vier der untersuchten Gene (GHITM, MFN1, LAMP2, α SYNUCLEIN) blieb in den für die Anfertigung dieser Diplomarbeit vorgesehenen acht Monaten besonders stabil, was eine potentielle Bedeutung dieser Gene als Biomarker für Morbus Parkinson vorstellbar macht. Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeit wurde der Glucose-Gehalt im Kulturmedium der SH-SY5Y Zellen um 50% reduziert, was zur Hochregulation der meisten an der Stelle untersuchten Gene geführt hat. Die in den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen auf der mRNA-Ebene ermittelten Effekte konnten weder in HeLa noch in SH-SY5Y Zellen mit einem transienten PINK1 KD beobachtet werden (3.1.2. u. 3.1.3.). Kortikale Neurone aus PINK1 KO Mäusen zeigten nach Behandlung mit HBSS gewisse Ähnlichkeiten in der Genexpression zu dem PINK1 KD SH-SY5Y Zellmodell (3.1.4.1.). Ferner wurden mehrere Gemeinsamkeiten zwischen dem mRNA-Profil der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen und der Genexpression in den kortikalen Neuronen aus PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierenden Mäusen festgestellt. Das mRNA-Profil der unter Serumdeprivation kultivierten PINK1 KD SH-SY5Y Zellen wurde in keinem der weiteren Zellmodelle vollständig reproduziert.

3.2. PINK1 KD führt bei Serumentzug zu einer Herunterregulation des mitochondrialen Teilungsfaktors Fis1 in SH- SY5Y Zellen

Als Nächstes wurde untersucht, ob die bei den unter Serumentzug kultivierten PINK1 KD SH-SY5Y Zellen beobachtete Reduktion der unter 3.1. beschriebenen mRNAs auch auf Proteinebene nachzuweisen war. Dafür wurde zunächst die Proteinexpression der mitochondrialen Teilungsfaktoren FIS1, DRP1 und MTP18 und des mit. Transkriptionsfaktors PGC1 α analysiert. Anschließend wurde auch der Proteinspiegel der mitochondrialen Fusionsfaktoren MFN1 und MFN2 und der an der

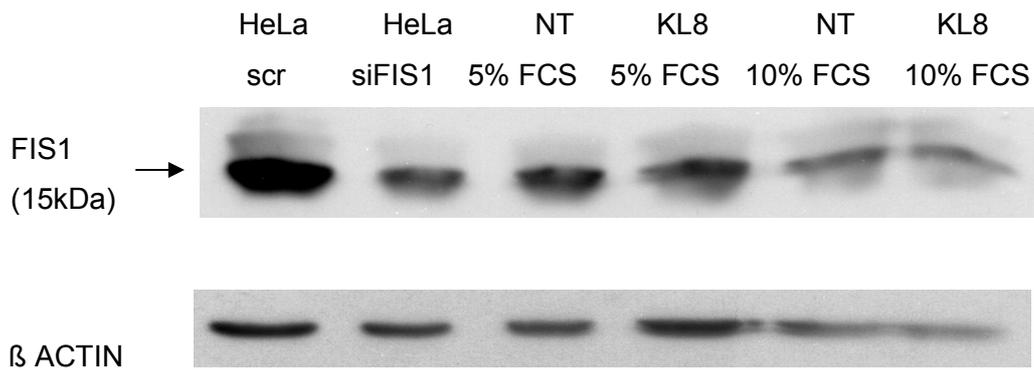
Mitophagie beteiligten E3-Ubiquitin Ligase PARKIN bestimmt. Um sicherzugehen, dass eventuelle Veränderungen in der Proteinexpression bei den PINK1 KD Zellen nur unter trophischem Stress auftreten, wurden anfangs die bei 10% FCS kultivierten Zellen als Kontrolle mitgeführt. Dies konnte jedoch nicht bei allen Versuchen gemacht werden, da das PINK1 in diesen Zellen bald hochreguliert wurde (s. *Abb. 8, Abschn. 3.1.*). Bei der Quantifizierung der Proteinexpression wurden die mit ImageJ 1.42I erhaltenen Messwerte zunächst auf dazugehöriges β -Aktin normiert und dann die Proteinexpression in den PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen mit der in den entsprechend kultivierten NT Zellen verglichen.

Bezüglich der Proteinexpression der mitochondrialen Teilungsfaktoren wurde eine signifikante Herunterregulation des FIS1-Proteins in den unter 5% FCS kultivierten PINK1 KD KL8 Zellen beobachtet (*Abb.19*), in denen die relative Expression des FIS1-Proteins bei 52% \pm 12,21% lag. Im Gegensatz hierzu war die FIS1-Expression in den KL8 Zellen unter 10% FCS unverändert im Bezug auf die entsprechenden NT Zellen. Da der FIS1-Antikörper zwei nahe aneinander liegende Banden detektiert hatte, wurde zusätzlich zu der Orientierung anhand der Bandengröße noch ein FIS1 knockdown in HeLa Zellen durchgeführt, um sicherzugehen, dass für die Auswertung die richtige Bande herangezogen wurde. Der knockdown lag in diesem Fall bei 37,32%, war jedoch ausreichend, um die richtige FIS1-Bande zu identifizieren.

Zwei weitere mit. Fissionsfaktoren, Drp1 und MTP18, wiesen keine signifikante Veränderung in den PINK1 KD Zellen auf, weder unter 10% noch unter 5% FCS (s. *Abb.20*).

Bezüglich des Transkriptionsfaktors PGC1 α wurde keine signifikante Veränderung in den bei 5% FCS kultivierten PINK1 KD Zellen beobachtet (*Abb.21*). Bei den unter 10% FCS kultivierten Zellen wurde eine Reduktion des erwähnten Proteins auf 37,24% festgestellt (n=1).

a)



b)

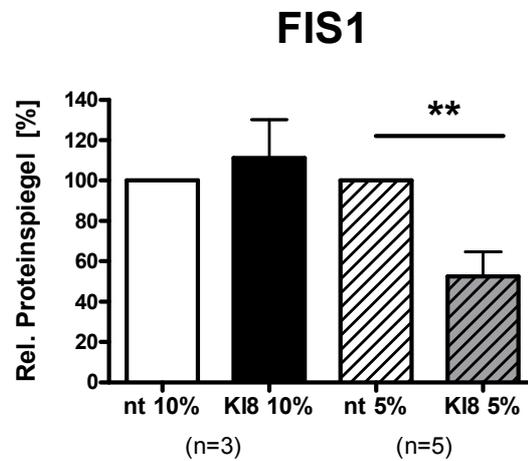


Abb.19: Relative Proteinexpression des mitochondrialen Teilungsfaktors FIS1 in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumentzug.

a) Western Blot für das FIS1 Protein mit β Aktin als Ladekontrolle.

b) Quantifizierung der FIS1-Expression in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen unter 5% FCS, sowie unter 10% FCS, bezogen auf die entsprechenden NT (*non target*) Zellen. Die Expression des Fis1-Proteins lag unter 5% FCS bei $52 \pm 12,21\%$. $n=3$ für NT und KL8 10%, bzw. 5 für NT und KL8 5% ($p=0,0046$), davon ein Experiment durchgeführt mit M. Hetzel.

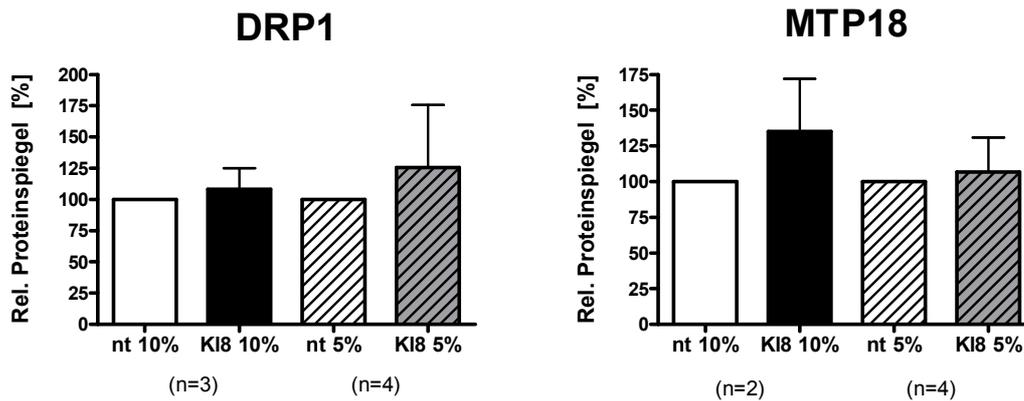


Abb.20: Relative Proteinexpression der mitochondrialen Fissionsfaktoren DRP1 und MTP18 in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumentzug, bezogen auf die entsprechenden NT (*non target*) Zellen. Zwei Experimente zu MTP18 von M. Hetzel.

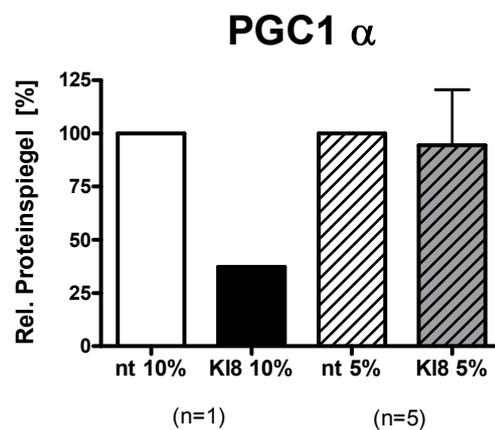


Abb.21: Relative Proteinexpression des Transkriptionsfaktors PGC1 α in den PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumentzug, bezogen auf die korrespondierenden NT (*non target*) Zellen.

Ferner wurde keine Veränderung in der Proteinexpression der mitochondrialen Fusionsfaktoren MFN1 und MFN2 (s. Abb.22), sowie der 52kDa- Isoform der E3 Ubiquitin Ligase PARKIN (s. Abb.23) beobachtet. Bei der 48kDa-Isoform von PARKIN konnte man eine leichte Tendenz zu einer Reduktion des Proteingehaltes erkennen, die jedoch mathematisch nicht signifikant war.

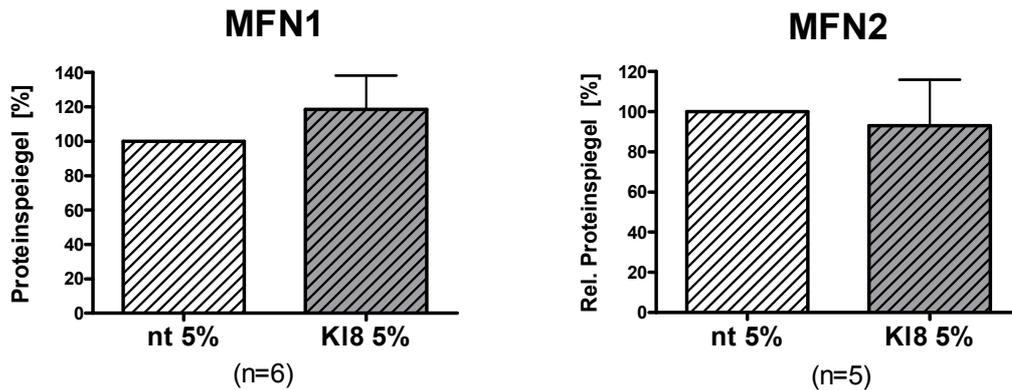


Abb.22: Relative Proteinexpression der Mitofusine in den bei 5% FCS kultivierten PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen, bezogen auf die korrespondierenden NT (*non target*) Zellen.

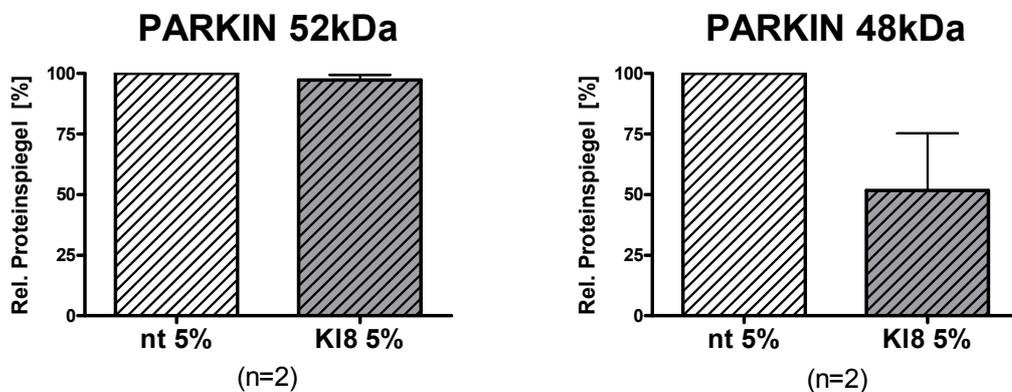


Abb.23: Relative Proteinexpression der E3 Ubiquitin Ligase PARKIN in den bei 5% FCS kultivierten PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen, bezogen auf die korrespondierenden NT (*non target*) Zellen.

Zusammenfassend wurde eine signifikante Herunterregulation des Fis1-Proteins in den bei Serumdeprivation kultivierten PINK1 KD SH-SY5Y Zellen beobachtet. Die Proteinexpression von zwei weiteren mitochondrialen Teilungsfaktoren (DRP1 und MTP18), sowie des mit. Transkriptionsfaktors PGC1 α und der E3 Ubiquitin Ligase PARKIN war in den betreffenden SH-SY5Y Zellen nicht verändert.

3.3. Der knockdown von PINK1 verursacht keine Beeinträchtigung der mtDNA-Integrität in den SH-SY5Y Zellen

Angesichts der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen betreffenden mRNA-Befunde (3.1.), aus denen eine Herunterregulation vieler an der mitochondrialen Homöostase beteiligten Gene ersichtlich war, wurde die Integrität der mitochondrialen DNA in diesen Zellen zu einer weiteren interessanten Fragestellung. Eines der erwähnten herunterregulierten Gene war auch das für ein mitochondriales Chaperon kodierende TRAP1, für den bereits über eine Schutzfunktion vor oxidativem Stress und daraus resultierendem Zelltod berichtet wurde (Montesano et al. 2007). Oxidativer Stress wird im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen, Morbus Alzheimer und Alterung mit mtDNA-Deletionen in Verbindung gebracht (Aliev et al. 2011). Es stellte sich also die Frage, ob insbesondere die Herunterregulation von TRAP1 in dem PINK1 KD SH-SY5Y Zellmodell möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der mtDNA-Integrität geführt hat.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die DNA aus den unter 5% und 10% FCS kultivierten Zellen isoliert und anschließend mittels PCR das 8,9kb und das 200bp Fragment der mitochondrialen DNA amplifiziert. Dies ist ein Test für die Integrität der mtDNA, da bei eventuellen Schäden das lange Fragment nicht richtig amplifiziert werden kann, was nach der Normierung auf das kleine Fragment sichtbar wird (Santos et al. 2002, Jendrach et al. 2005 u. 2008). Die PCR-Proben wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt (*Abb.24*) und mit Herolab EasyWin 32 quantifiziert.

Bei den mit 10% FCS kultivierten PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen war die relative Menge des amplifizierten großen Fragments der mtDNA 13,24% geringer als bei den entsprechenden NT Zellen ($n=1$, s. *Abb.25*), was gut im Bereich der technischen Schwankung für diese Methode liegt und somit keine Beeinträchtigung der mtDNA-Integrität vermuten lässt.

Der Versuch wurde dreimal für die bei 5% FCS kultivierten Zellen durchgeführt, wobei keine Schädigung der mtDNA in den PINK1 KD Klon8 Zellen zu sehen war (*Abb.25*).

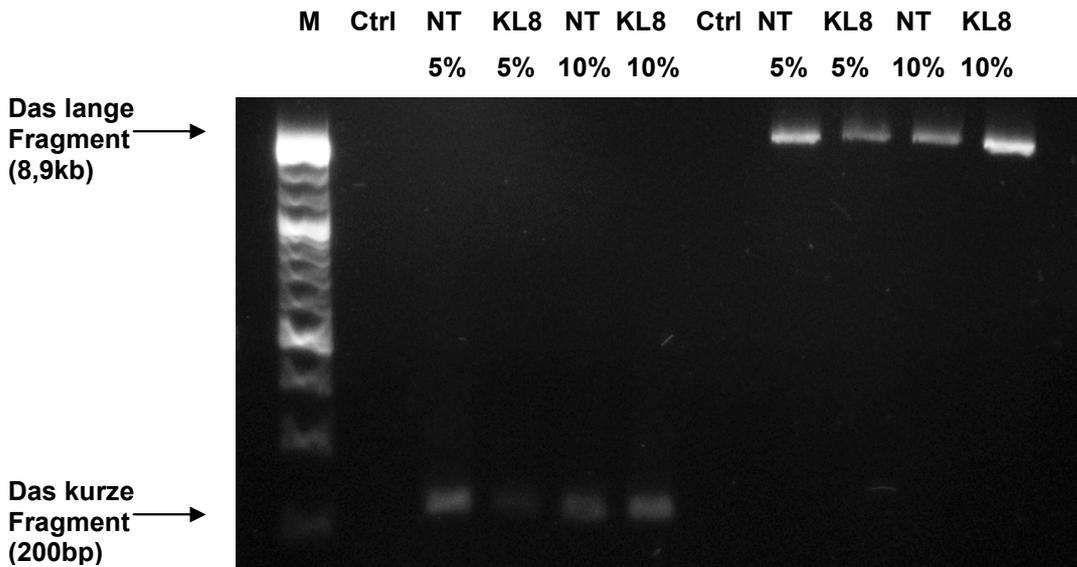


Abb.24: Das 200bp und das 8,9kb Fragment der mitochondrialen DNA aus den bei 5% FCS und 10% FCS kultivierten NT (non target) und PINK1 KD Klon8 Zellen. M = 1kb plus Marker, Ctrl = Negativkontrolle

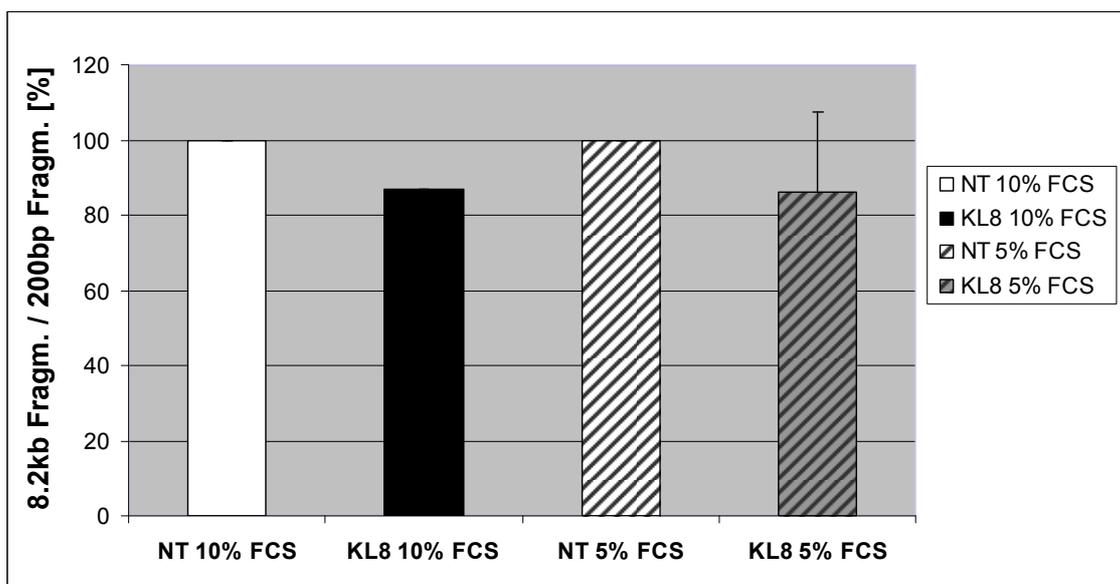


Abb.25: Die Integrität der mtDNA in den bei 5% FCS und 10% FCS kultivierten PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden NT Zellen. Bei KL8 10% beträgt das Verhältnis des 8,9kb Fragments zu dem 200bp Fragment 86,76% (n=1), und bei KL8 5% liegt es bei 86,27% ± 21,34% (n=3).

Durch die Amplifikation des 8,9kb und des 200bp Fragments der mtDNA wurde somit unabhängig von dem Kultivierungsmodus (5% oder 10% FCS als Zusatz im Wachstumsmedium) keine Beeinträchtigung der mtDNA-Integrität festgestellt.

3.4. PINK1 KD SH-SY5Y Zellen weisen bei Serumentzug keine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂ auf

Es wurde bereits publiziert, dass PINK1 die Zelle vor oxidativem Stress schützt, indem es TRAP1 phosphoryliert (Pridgeon et al. 2007, Mai et al. 2010). Da das hier verwendete SH-SY5Y Zellmodell nicht nur einen knockdown von PINK1, sondern auch eine Herunterregulation von TRAP1 gezeigt hat, war der nächste Schritt herauszufinden, ob diese beiden Eigenschaften einen funktionellen Einfluss auf das Zellüberleben nach einem durch H₂O₂ induzierten oxidativen Stress zeigen würden.

Um diese Frage zu beantworten, wurden mit 5% FCS kultivierte NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen für 10min mit steigenden Konzentrationen von H₂O₂ (10µM; 30µM; 60µM) behandelt. 24h nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert und die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt.

Nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ wurde eine Dosis-abhängige Reduktion der nach 24h adhärennten Zellen beobachtet, wobei kein Unterschied zwischen den NT und den PINK1 KD Zellen zu sehen war (Abb.26).

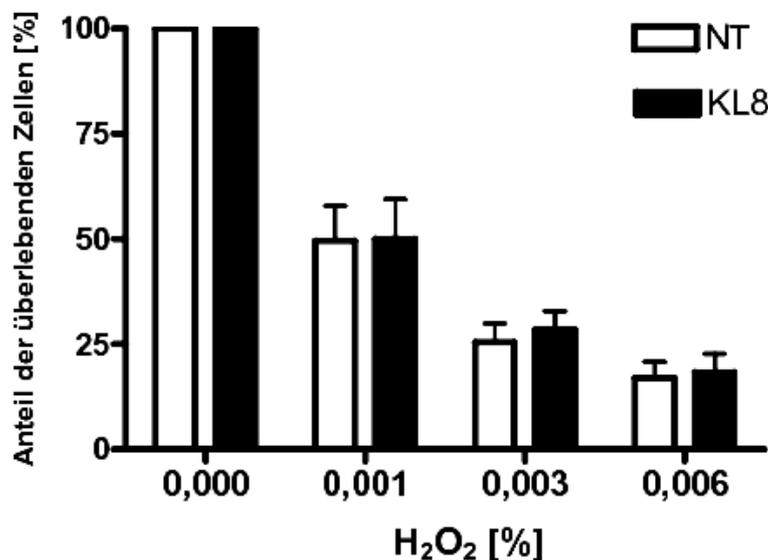


Abb.26: Anteil der überlebenden NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen 24h nach Behandlung mit H₂O₂. Die Zellen wurden mit 5% FCS im Medium kultiviert und mit steigenden Konzentrationen von H₂O₂ behandelt (0,001% = 10µM; 0,003% = 30µM; 0,006% = 60µM). NT = *non target*; KL8 = Klon8 (PINK1 KD Zellen). n=8 (2 Experimente von M. Jendrach und 3 Exp. von M. Hetzel).

Somit wiesen die PINK1 KD Zellen im Vergleich zu den NT Kontroll-Zellen keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem durch H₂O₂ induzierten oxidativen Stress auf.

3.5. PINK1 KD führt zu einer Verminderung der Energieladung in SH-SY5Y Zellen unter Serumdeprivation

Es wurde bereits über eine mögliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette durch PINK1 berichtet (Liu et al. 2011, Morais et al. 2009). Dysfunktionale mitochondriale Atmung könnte sich in einem verminderten ATP-Gehalt äußern. Aus diesem Grunde wurde der ATP-Gehalt der bei Serumdeprivation kultivierten NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen ermittelt.

Die Bestimmung der Menge an Adenosylnukleotiden in den NT und PINK1 KD Klon8 Zellen wurde von Marthe Chimi aus der Arbeitsgruppe von Prof. Brandt an der Uni-Klinik Frankfurt durchgeführt. Die Menge an AMP war in den Klon8 Zellen höher als in den NT Zellen, während der ADP- und ATP-Gehalt niedriger waren (*Tab.20*). Die Energieladung wurde nach Atkinson (Spielmann et al. 1981, Sklar u. McKee 1984) berechnet und war niedriger in den PINK1 KD Zellen als in den NT Zellen.

Tab.20: Energiegehalt der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 5% FCS im Kulturmedium (EC = Energieladung nach Atkinson; n=1, vierfache Messung)

Menge an Adenosylnukleotiden [pmol]	NT	KL8
AMP	0.81	1.32
ADP	6.15	4.23
ATP	13.77	7.91
EC	0.81	0.74

Die Messung der Adenosyl-Nukleotide wies somit auf eine Verminderung des Energie-Gehaltes in den bei Serumentzug kultivierten PINK1KD KL8 Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden NT Zellen hin.

3.6. Respirometrie

Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung wurde bereits im Zusammenhang mit der PINK1 Form von Morbus Parkinson beschrieben (Papa et al. 2009, Gegg et al. 2009, Amo et al. 2011). Daher war eine respirometrische Analyse des hier untersuchten PINK1 KD SH-SY5Y Zellmodells von besonderem Interesse.

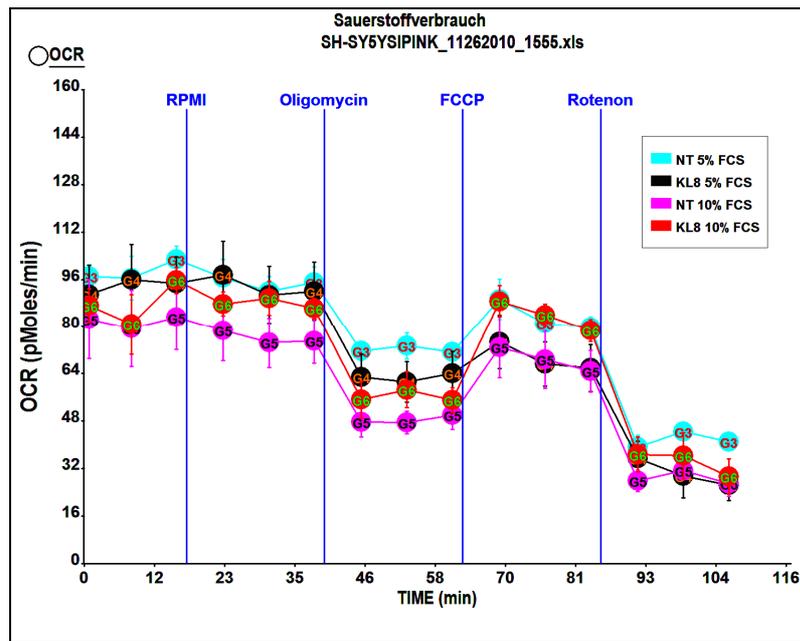
3.6.1. PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung

Die NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen wurden in Medien mit 5% und 10% FCS kultiviert und zur Optimierung des Messprotokolls zunächst in zwei verschiedenen Zellzahlen für die Atmungsmessung ausgesät (40 000 und 60 000 Zellen).

Der gemessene Sauerstoffverbrauch lag bei den dünner ausgesäten Zellen im Bereich von ca. 70 – 100 pmol /min und bei den dichteren Zellen zwischen 120 und 170 pmol /min. Da die letzt genannten Messwerte in einem von der technischen Seite günstigeren Bereich liegen, wurden alle weiteren Respirometrie-Versuche mit der Zellzahl von 60 000 pro Well durchgeführt. Bezüglich der basalen Atmung wurden in diesen ersten Versuchen keine Unterschiede zwischen den NT und Klon8 Zellen beobachtet. Zur Charakterisierung der mitochondrialen Atmung wurden drei verschiedene Substanzen eingesetzt, die entweder als Inhibitoren bestimmter Atmungskomplexe fungieren (Oligomycin als Inhibitor von Komplex V, bzw. Rotenon als Komplex I-Hemmstoff) oder als Entkoppler die maximale Respiration ermöglichen (FCCP u. CCCP). Die Wirkung der Inhibitoren war bei den NT und KL8 Zellen ähnlich stark. Nach Zugabe von Oligomycin war eine Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, „Oxygen Consumption Rate“) um ca. 50% zu sehen. Der anschließende Einsatz des Entkopplers FCCP (od. CCCP, *Abb.20 u. 27*) fuhr zu einer Erholung der Atmungsaktivität etwa zum basalen Niveau und der abschließende Zusatz von Rotenon bewirkte bei beiden Zelltypen eine Reduktion der Sauerstoffverbrauchsrate um ca. 70%.

Die Kultivierung in Medien mit unterschiedlichem FCS-Gehalt (5%, bzw. 10% FCS) hatte in diesen beiden Versuchen keine Auswirkung, weder auf den in Absoluteinheiten ausgedrückten Sauerstoffverbrauch (OCR in pmol / min, *s. Abb.27a u. 28a*) noch auf den relativen Sauerstoffverbrauch (OCR %, berechnet im Verhältnis zur ersten durchgeführten Messung; *Abb.27b u. 28b*).

a)



b)

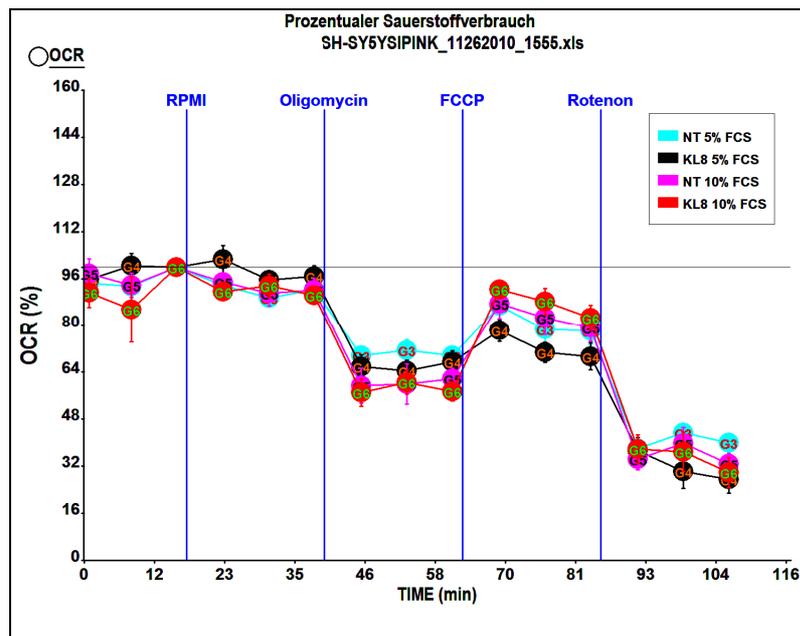
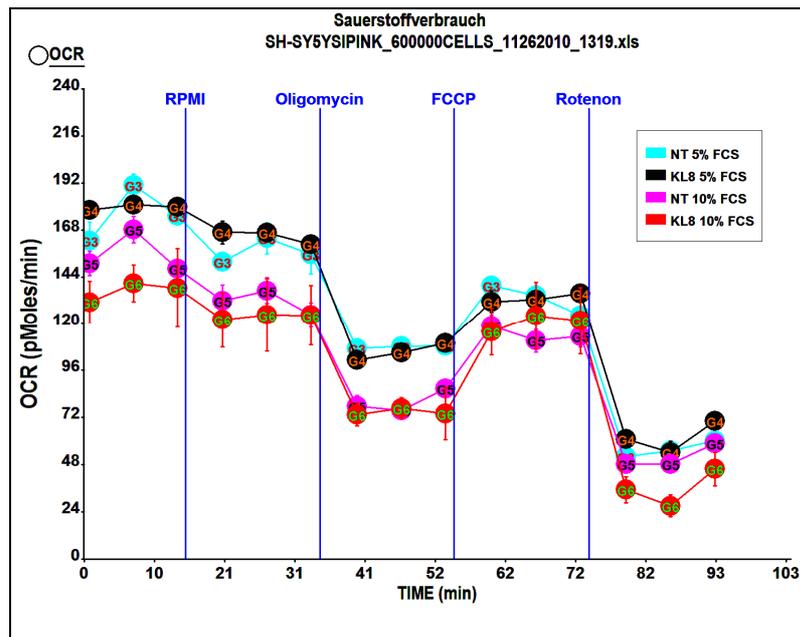


Abb.27: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch (a, in pmol/min, bzw. b, bezogen auf die erste Messung) der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei dem regulären FCS-Gehalt von 10% oder unter Serumentzug (5% FCS) kultiviert wurden. Für die Messung wurden 40 000 Zellen ausgesät. n=5 mit Ausnahme von NT 5% FCS (n=4).

a)



b)

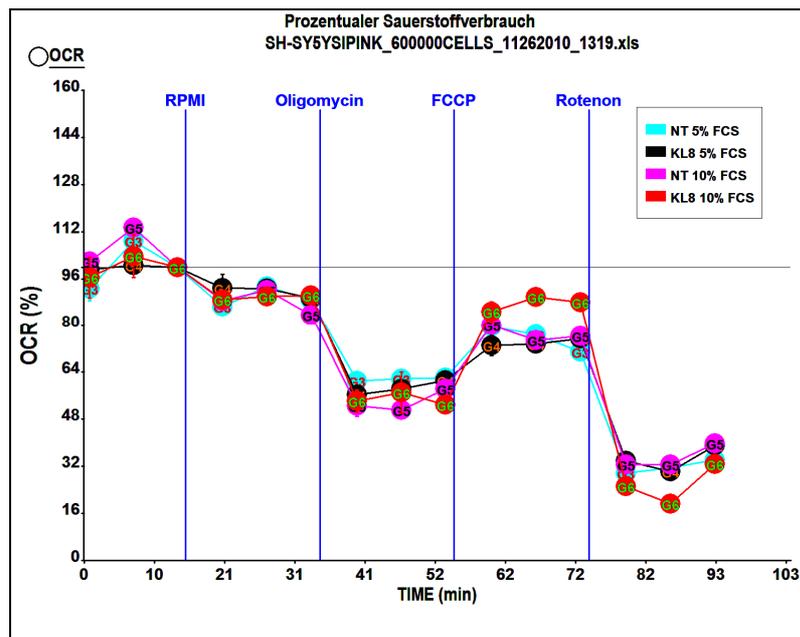


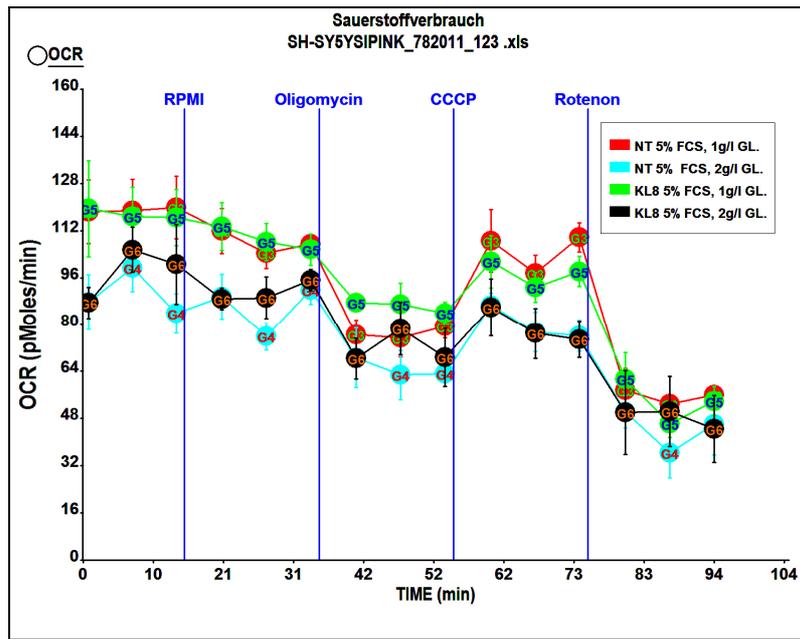
Abb.28: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch (a, in pmol/min, bzw. b, bezogen auf die erste Messung) der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei dem regulären FCS-Gehalt von 10% oder unter Serumentzug (5% FCS) kultiviert wurden. Für die Messung wurden 60 000 Zellen ausgesät. n=5 für NT 10% FCS; n=4 für KL8 5%; n=3 für NT 5% FCS und KL8 10% FCS

3.6.2. Die Reduktion des Serums und der Glucose im Medium hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung in PINK1 KD SH-SY5Y Zellen

Um die physiologischen Bedingungen aus dem Gehirn besser *in vitro* repräsentieren zu können, wurde ein Teil der unter 5% FCS kultivierten NT und Klon8 SH-SY5Y Zellen auf ein Wachstumsmedium mit zusätzlicher 50%iger Reduktion von Glucose (auf 1g Glucose/L Kulturmedium) umgestellt. Nach einem Anpassungszeitraum von einem Monat wurde dann die Sauerstoffverbrauchsrate, sowie die Ansäuerung des Mediums bestimmt. Als Kontrolle für den Versuch wurden die Zellen mit der regulären Glucose-Konzentration von 2g / L Medium herangezogen.

Die basale Sauerstoffverbrauchsrate lag bei den NT und Klon8 Zellen mit 2g/L Glucose ungefähr zwischen 80 und 112 pmol / min, während sie bei den Zellen mit reduziertem Gehalt an Glucose einen Durchschnitt von ca. 112 pmol/min aufwies. Der Verlauf der Respirometrie war bei allen hier untersuchten Zellen sehr ähnlich (*Abb.29*): Oligomycin bewirkte eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs um ca. 30%, die durch die Zugabe von CCCP fast vollständig aufgehoben wurde. Die Zugabe von Rotenon fuhr zu einer ca. 50%igen Reduktion des Sauerstoffverbrauchs. Obwohl die Wirkung der Inhibitoren etwas schwächer war als im vorigen Versuch (*Abb. 27 u. 28*), liefern diese Ergebnisse einen weiteren Hinweis darauf, dass der knockdown von PINK1 keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung verursacht. Die extrazelluläre Ansäuerung war bei allen Zellen während der gesamten Messzeit in etwa konstant (*Abb.30*). Sie lag bei den Zellen ohne Glucose-Reduktion zwischen 3 und 7 mpH / min und bei den Zellen mit Glucose-Reduktion im Wachstumsmedium im Bereich zwischen 7 und 9 mpH / min. Aus den Messkurven ist ferner ersichtlich, dass eine zum Serumentzug zusätzliche Deprivation der Glucose keine Auswirkung auf den Sauerstoffverbrauch und die Ansäuerung des Assay-Mediums aufwies.

a)



b)

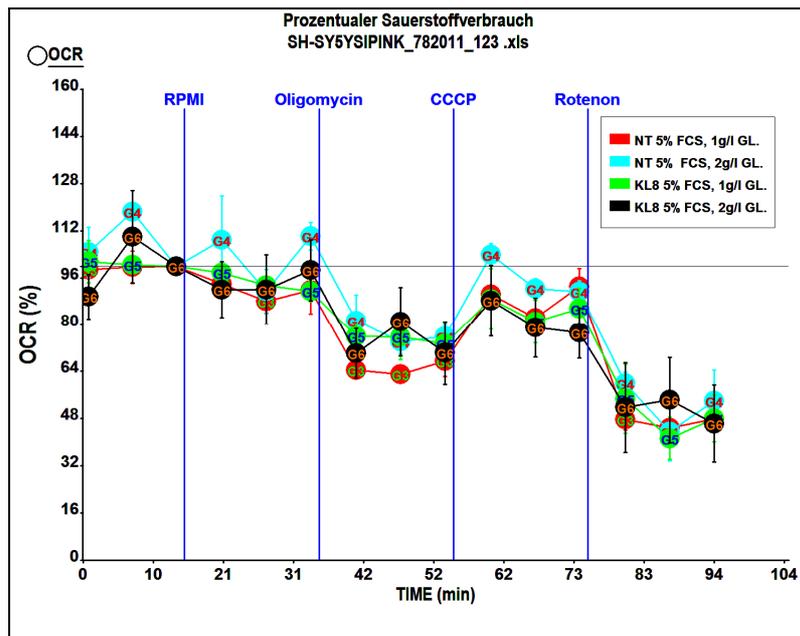


Abb.29: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch (a, in pmol/min, bzw. b, bezogen auf die erste Messung) der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei 5% FCS und 2g/L oder 1g/L Glucose im Wachstumsmedium kultiviert wurden. n=4 mit Ausnahme von NT 5% FCS (n=3).

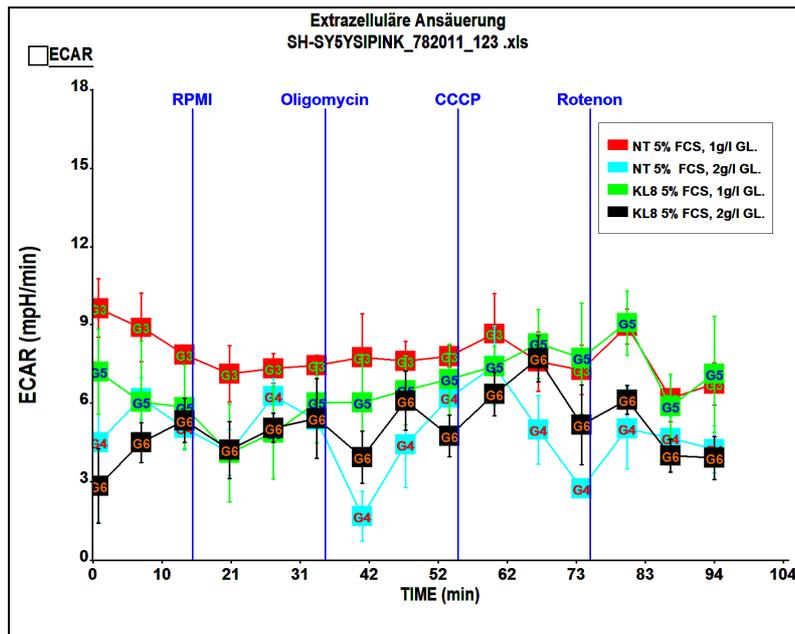


Abb.30: Extrazelluläre Ansäuerung bei den NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die bei 5% FCS und 2g/L oder 1g/L Glucose im Wachstumsmedium kultiviert wurden. n=4 mit Ausnahme von NT 5% FCS (n=3).

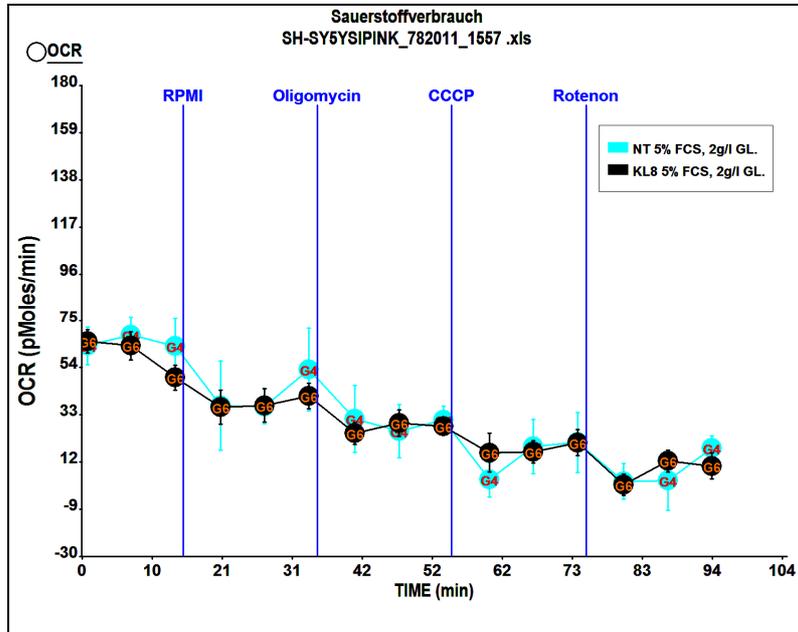
3.6.3. Mit Glucose- und Serumreduktion vorkultivierte PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung im Galaktose-haltigen Medium

Um eine Maximierung der mitochondrialen Atmung zu erzielen, wurden die NT und KL8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne vorige Reduktion der Glucose im Wachstumsmedium am Tag vor der Respirometrie-Messung auf ein Glucose-freies Wachstumsmedium mit zugesetzter Galaktose umgestellt. Außerdem wurden die Zellen bei der Messung mit der doppelten Konzentration an Inhibitoren behandelt. Den Messkurven ist zu entnehmen, dass der basale Sauerstoffverbrauch bei den Zellen ohne Glucose-Reduktion zunächst bei ca. 60 pmol / min und bei den Zellen mit weniger Glucose im Kulturmedium bei ca. 80 pmol / min lag (Abb.31 u.32).

Bereits nach Injektion des RPMI sank die Sauerstoffverbrauchsrate bei allen Zellen, allerdings unterschiedlich stark. Bei den Zellen, die mit 2g/L Glucose kultiviert wurden, sowie bei den NT Zellen, welche mit 1g/L Glucose kultiviert wurden, verringerte sie sich um ca. 20%. Bei den Klon8 Zellen mit Glucose-Reduktion auf 1g/L fiel die Sauerstoffverbrauchsrate jedoch um etwa 50% ab, woraus sich ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden NT Zellen ergab (Abb.33).

Die Verringerung der mitochondrialen Atmung setzte sich bei allen Zellen während der gesamten Messung fort und es war auch keine Entkopplung durch das CCCP zu sehen. Zum Schluss wurde noch eine relativ geringe Restatmung von etwa 20% beobachtet.

a)



b)

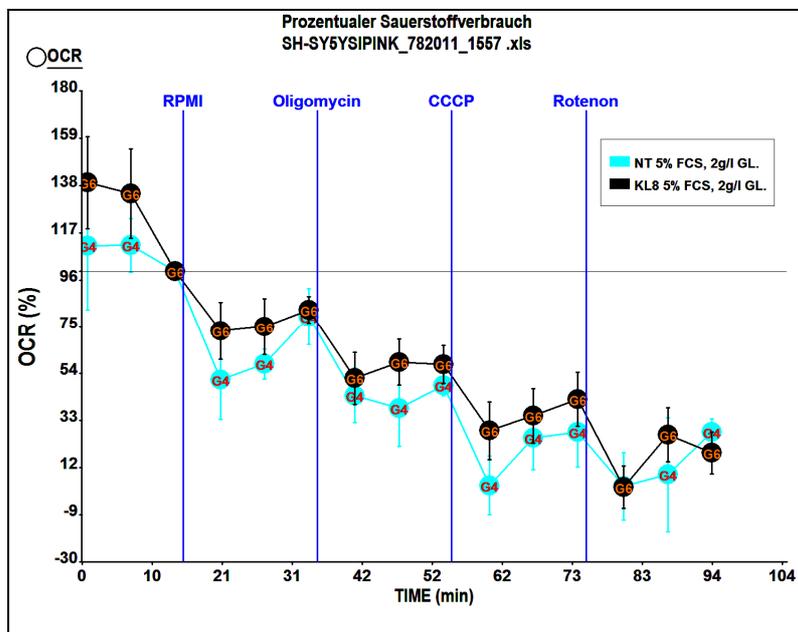
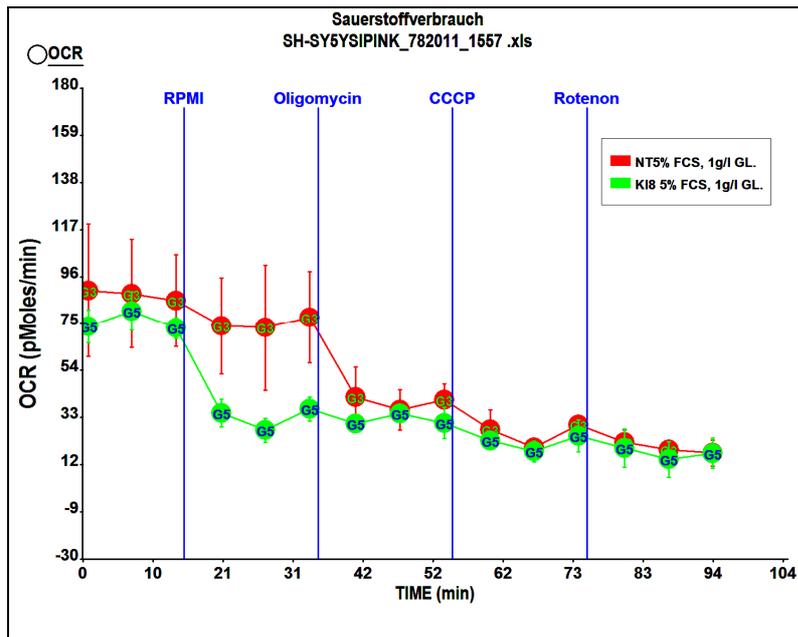


Abb.31: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch (a, in pmol/min, bzw. b, bezogen auf die erste Messung) der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die nach der Kultivierung bei 5% FCS und 2g/L Glucose im Medium 24h vor der Messung auf ein Galaktose-haltiges Medium transferiert wurden. n=4 für KL8, bzw. n=3 für NT

a)



b)

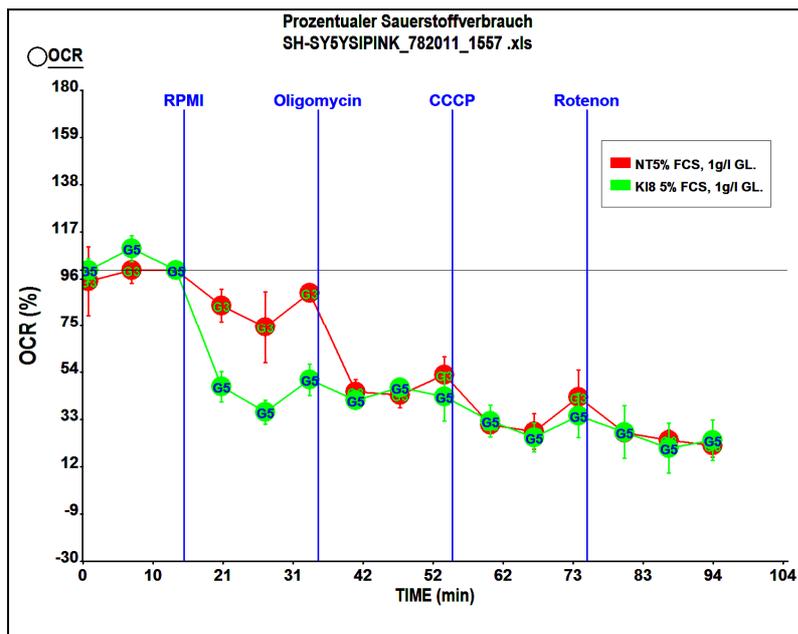


Abb.32: Absoluter und relativer Sauerstoffverbrauch (a, in pmol/min, bzw. b, bezogen auf die erste Messung) der NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die nach der Kultivierung bei 5% FCS und 1g/L Glucose 24h vor der Messung auf ein Galaktose-haltiges Medium transferiert wurden. n=5 für KL8, bzw. n=4 für NT

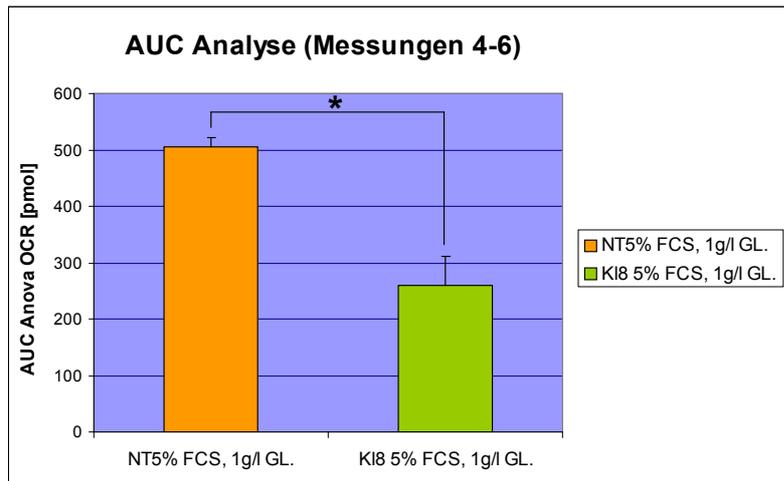


Abb.33: Quantifizierung der Sauerstoffverbrauchsrate bei den NT und PINK1 KD KL8 Zellen nach Injektion des RPMI. Die Zellen wurden bei 5% FCS und 1g/L Glucose kultiviert und 24h vor der Messung auf ein Galaktose-Medium transferiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der AUC für die Messungen 4-6 mit Fehlerbalken als SEM. NT: 505,78 ± 16,29 pmol; KL8: 259,75 ± 52,38 pmol. n=5 für KL8, bzw. n=4 für NT; AUC = "Area Under the Curve"; p=0,01.

3.7. Mitochondriale Morphologie

Es wurde bereits publiziert, dass PINK1 die mitochondriale Morphologie beeinflusst. Der akute Verlust der PINK1-Expression in SH-SY5Y Zellen wurde in Verbindung mit einer Fragmentierung der Mitochondrien gebracht (Lutz et al. 2009). Ferner wurde über eine Fragmentierung der Mitochondrien in PINK1 KO MEF ("Mouse Embryonic Fibroblasts") Zellen nach Kultivierung in einem Galaktose-haltigen Medium berichtet (Amo et al. 2011). Da außerdem der mitochondriale Teilungsfaktor FIS1 in den SH-SY5Y PINK1 KD KL8 Zellen signifikant herunterreguliert war (3.2.), wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit die mitochondriale Morphologie der KL8 Zellen unter verschiedenen Bedingungen (mit und ohne Serumdeprivation, nach Umstellung auf ein Galaktose-haltiges Medium, bei Reduktion der Glucose, sowie nach Aminosäuredeprivation) untersucht.

3.7.1. PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Morphologie bei Serumdeprivation

Um die mitochondriale Morphologie darzustellen, wurden bei 5% und 10% FCS parallel kultivierte NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen mit Mitotracker Red (MTR) gefärbt. Wie aus der Abb. 34 ersichtlich ist, war bei den PINK1 KD KL8 Zellen weder

bei 10% FCS noch unter dem trophischen Stress des Serumentzuges ein Einfluss auf die mitochondriale Länge und Form zu sehen.

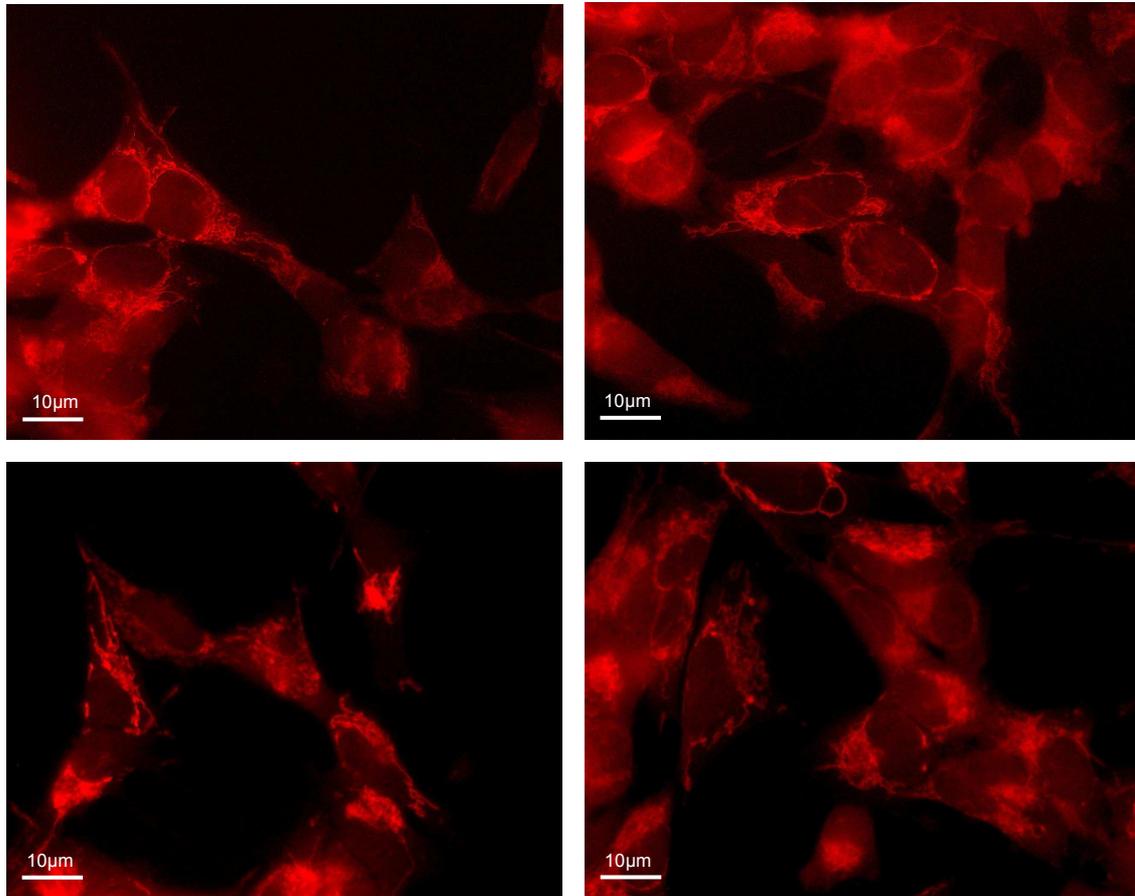


Abb.34: Mitochondriale Morphologie der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen mit und ohne Serumdeprivation. Oben: Zellen bei 10% FCS; unten: Zellen bei 5% FCS (Serumdeprivation). Links: NT, rechts: PINK1 KD Klon8.

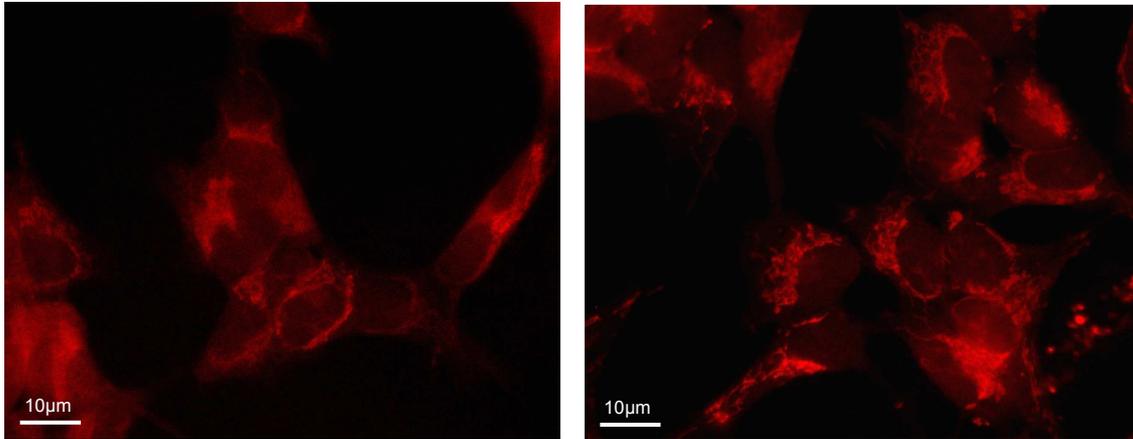
Somit zeigte die verminderte Expression von PINK1 keine Auswirkung auf den mitochondrialen Phänotyp der SH-SY5Y Zellen.

3.7.2. PINK1 KD SH- SY5Y Zellen zeigen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Morphologie nach Umstellung auf Galaktose

Die bei 5% oder 10% FCS kultivierten NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen wurden für 24h auf ein Galaktose-haltiges Medium umgestellt, um eventuelle durch die Maximierung der mitochondrialen Atmung verursachte Veränderungen in der mitochondrialen Morphologie festzuhalten. Im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen zu PINK1 KD Zellen (Amo et al. 2011), wurde keine Fragmentierung der Mitochondrien beobachtet und ihre Länge und Form war bei allen

hier untersuchten Zellen ähnlich (Abb.35 u. 36). Verglichen mit den Kontroll-Zellen in Glucose-haltigen Medium war darüber hinaus keine deutliche Veränderung der Zellform zu sehen.

a) Auf Glucose kultivierte SH-SY5Y Zellen (links NT, rechts KL8)



b) Auf Galaktose kultivierte SH-SY5Y Zellen (links NT, rechts KL8)

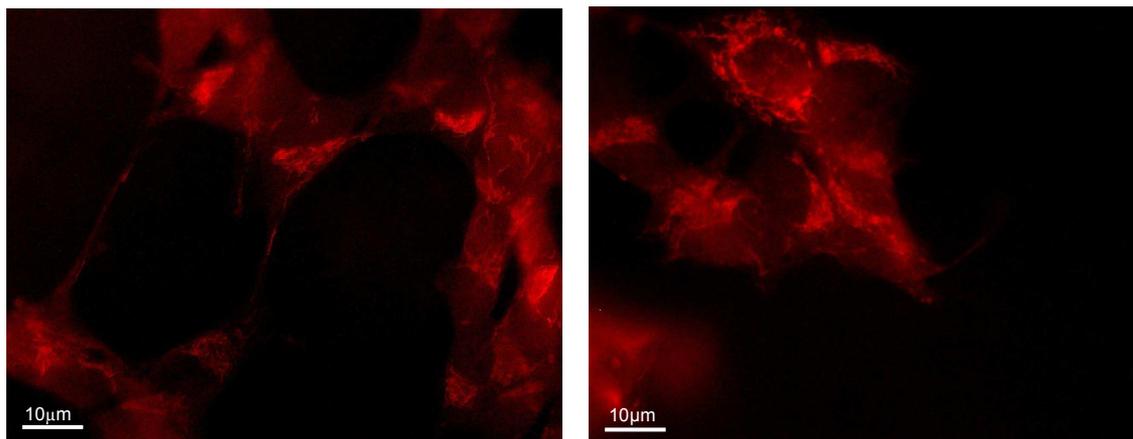
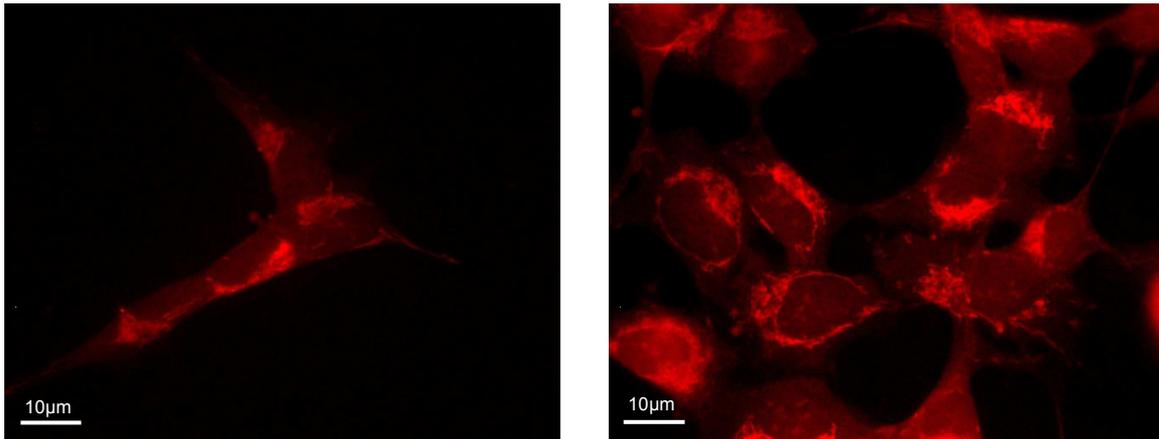


Abb.35: Mitochondriale Morphologie der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 10% FCS und Kultivierung in Medium mit Glucose (a) oder Galaktose (b). Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8

a) Auf Glucose kultivierte SH-SY5Y Zellen (links NT, rechts KL8)



b) Auf Galaktose kultivierte SH-SY5Y Zellen (links NT, rechts KL8)

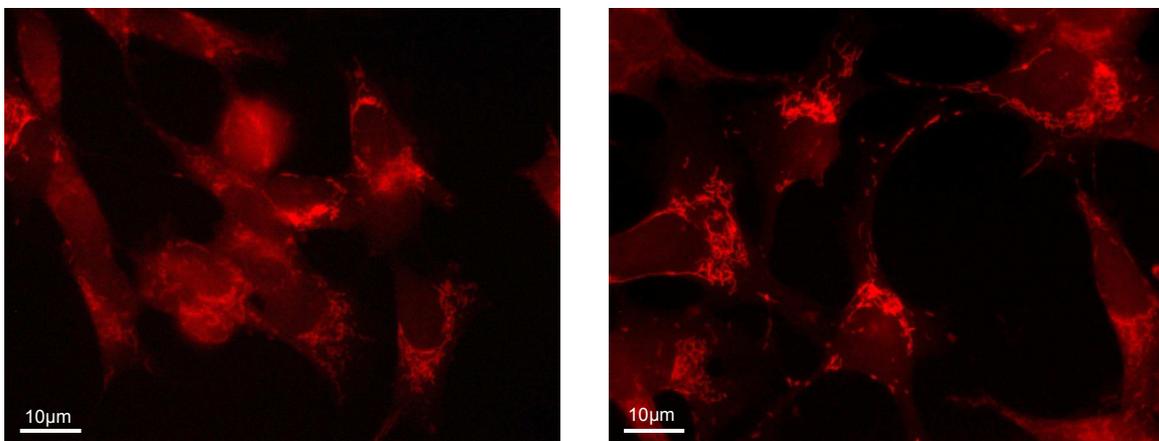


Abb.36: Mitochondriale Morphologie der NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen bei 5% FCS und Kultivierung in Medium mit Glucose (a) oder Galaktose (b). Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8

Der Entzug der Glucose aus dem Kulturmedium hatte somit keinen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie der PINK1 KD SH-SY5Y Zellen.

3.7.3. Bei Serumdeprivation vorkultivierte PINK1 KD SH-SY5Y Zellen zeigen keine Abweichung im mitochondrialen Phänotyp nach Aminosäurenentzug

Da weder unter chronischer Deprivation von Serum noch bei Umstellung auf ein Galaktose-haltiges Medium eine Veränderung des mitochondrialen Phänotyps beobachtet werden konnte, wurden die bei 5% FCS kultivierten Zellen für 2 Stunden in HBSS (d.h. mit 1g/L Glucose und ohne Aminosäuren) kultiviert. Der

Aminosäurenentzug hat bei dieser Wirkzeit keinen Effekt auf die Länge und Form der Mitochondrien gezeigt (Abb.37).

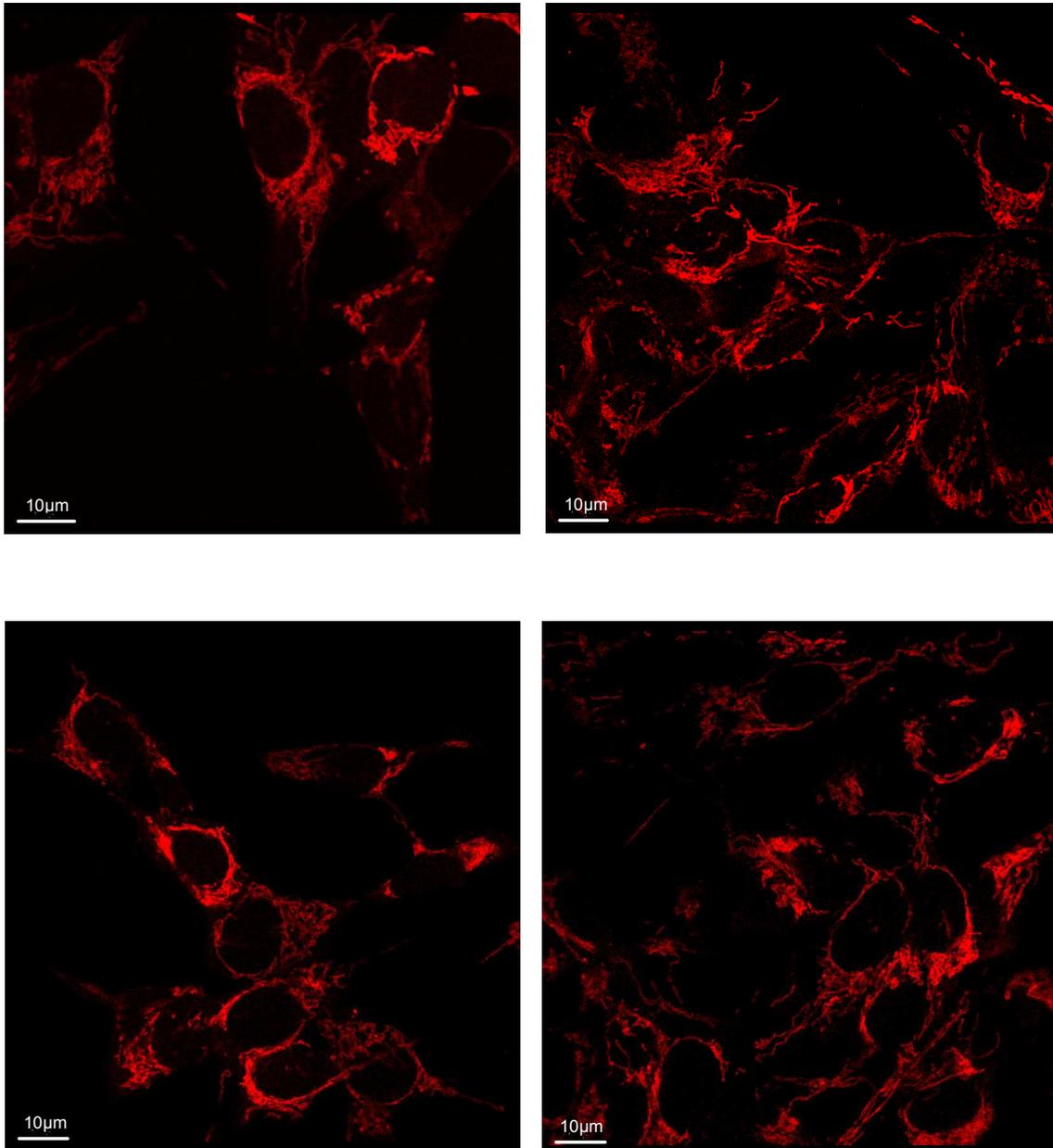


Abb.37: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 2h Aminosäurenentzug. Oben: Zellen im üblichen Wachstumsmedium; unten: Zellen nach 2h HBSS. Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8

Da sich infolge der relativ kurzen Einwirkzeit des HBSS der Effekt des Aminosäurenentzuges auf die mitochondriale Morphologie vielleicht noch nicht manifestieren konnte, wurde das Experiment erweitert, indem die Zellen in einem Zeitverlauf bis zu 24h in HBSS inkubiert wurden (Abb.38 u. 39). Außerdem wurden die Zellen mit Höchst gefärbt, um eventuelle Veränderungen in der Morphologie der Zellkerne verfolgen zu können.

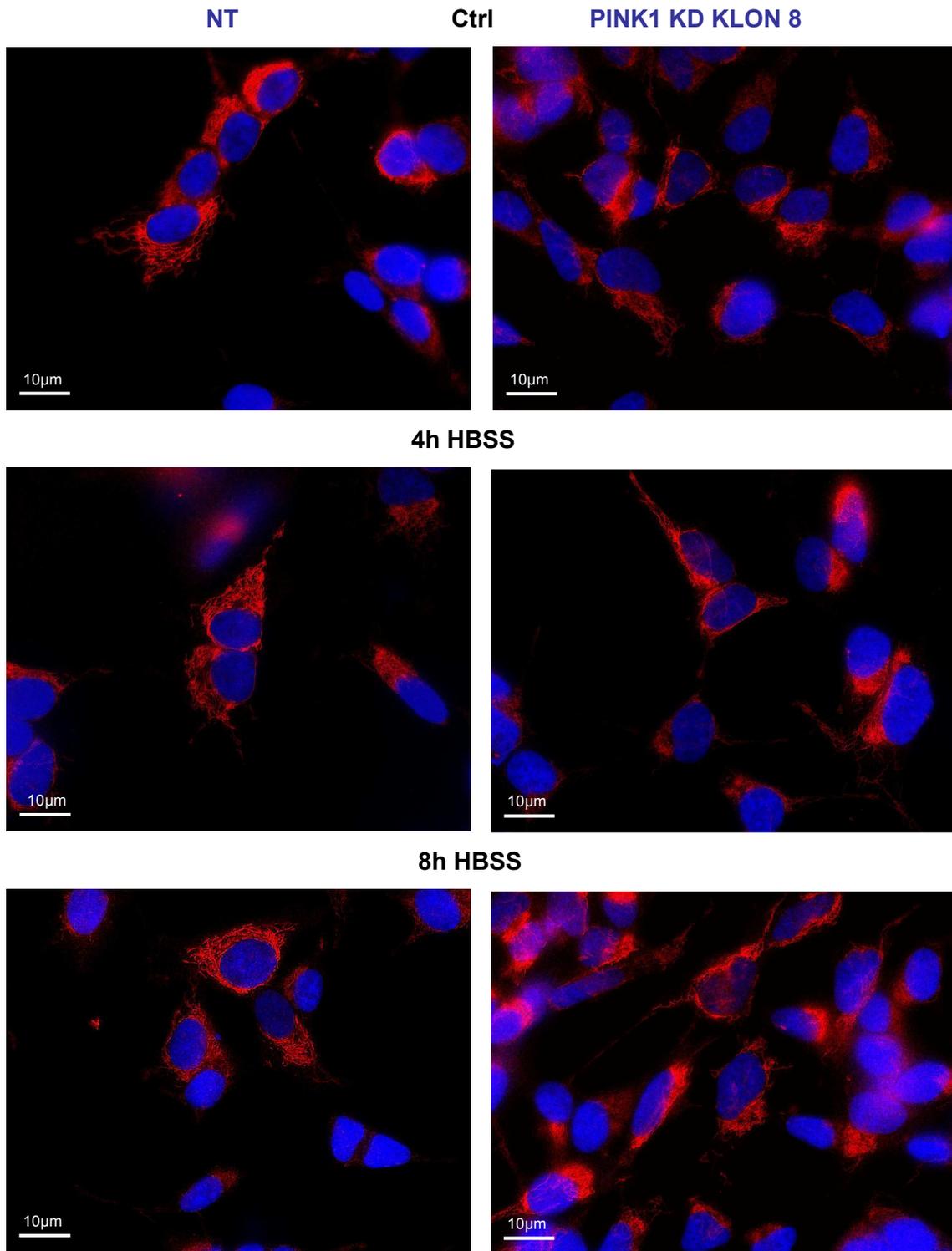


Abb.38: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 4h und 8h Aminosäurenentzug. Von oben nach unten: Kontroll-Zellen (Ctrl, kein HBSS); 4h HBSS; 8h HBSS. Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8 Zellen

Wie aus den Fluoreszenzaufnahmen in *Abb.38* ersichtlich, waren im Zeitraum bis zu 8h Behandlung mit HBSS keine deutlichen Veränderungen des mitochondrialen Phänotyps in den PINK1 KD Zellen zu sehen, weder im Vergleich zu den nicht behandelten Kontroll-Zellen, noch im Vergleich zu den entsprechenden NT-Zellen.

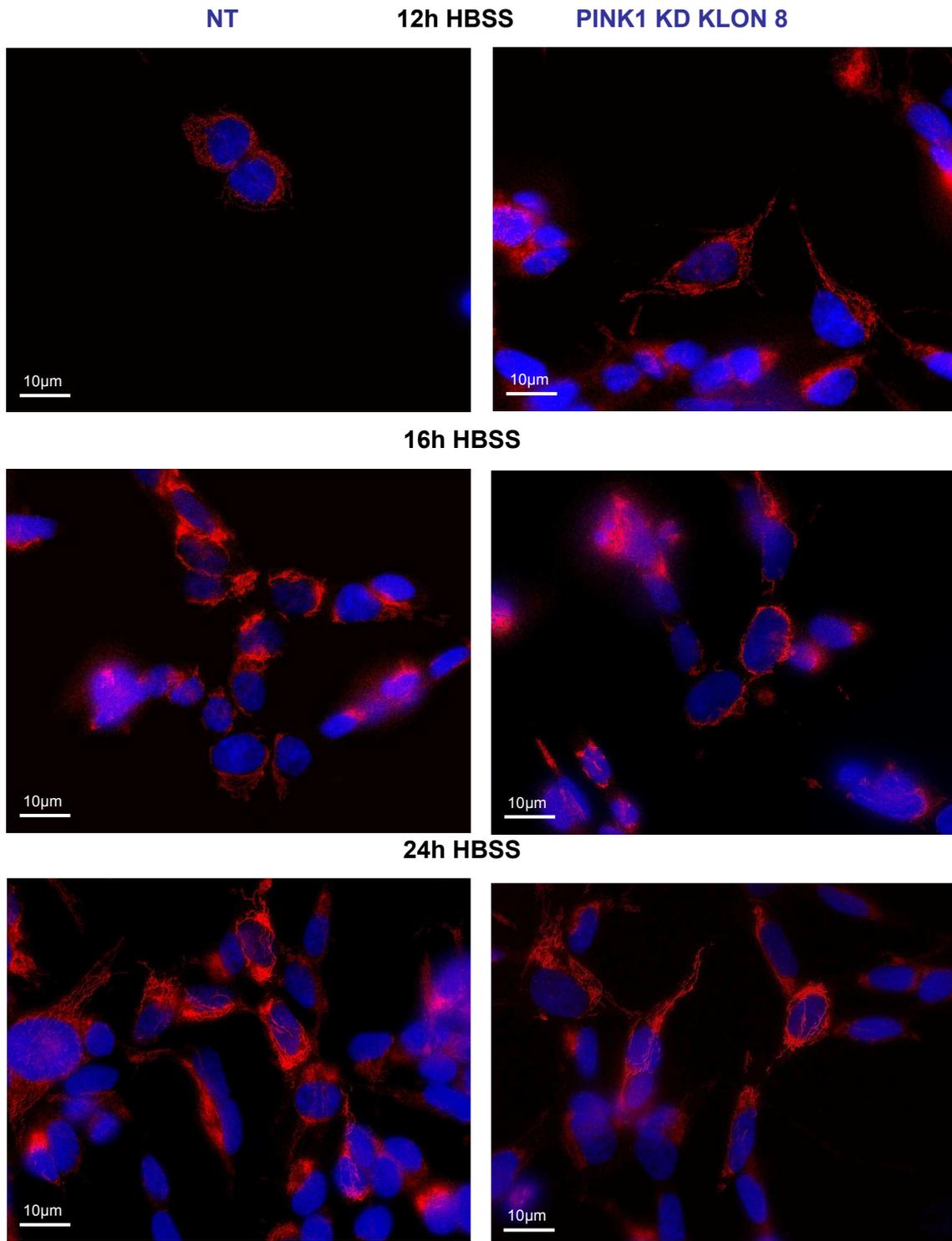


Abb.39: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 12h, 16h und 24h Aminosäurenentzug. Von oben nach unten: 12h, 16h, 24h HBSS. Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8 Zellen

Nach 12h Aminosäuredeprivation war ebenfalls kein Effekt auf die mitochondriale Morphologie zu sehen. Nach 16h HBSS hatten sich die Zellen zusammengezogen (Abb. 39). Die Mitochondrien waren im Vergleich zu vorigen Zeitpunkten eher perinuklear lokalisiert und die mitochondriale Masse schien reduziert

zu sein. Die Zellkerne waren von dem Stress der Aminosäuredeprivation nicht betroffen, d.h. es gab keine Anzeichen der Apoptose. Die erwähnten Veränderungen im mitochondrialen Erscheinungsbild waren bei den NT und Klon8 Zellen ähnlich stark, allerdings nach 24h Inkubation in HBSS nicht mehr sichtbar. Zum Schluss des Zeitverlaufs schienen die Zellen völlig erholt zu sein, d.h. sie wiesen erneut ausgedehnte tubuläre Mitochondrien auf.

Um eventuelle Effekte einer Glucose-Reduktion in Kombination mit Aminosäurenentzug zu erforschen, wurden die NT und Klon8 Zellen auf ein Kulturmedium mit 1g/L Glucose umgestellt, was einer 50%igen Reduktion der Glucose im Medium entspricht. Dieser Wechsel dient darüber hinaus der Annäherung an den physiologischen Zustand im Gehirn. Nach sechs Wochen Kultivierung unter Reduktion der Glucose wurde der HBSS-Zeitverlauf wie oben beschrieben durchgeführt.

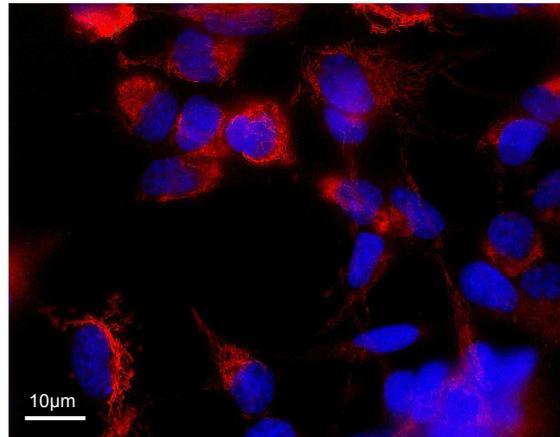
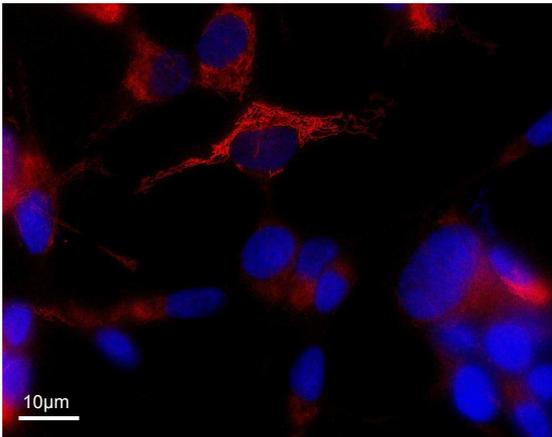
Im Vergleich zu den mit 2g/L Glucose kultivierten Zellen, wiesen die SH-SY5Y Zellen nach Reduktion der Glucose auch ohne Aminosäurenentzug eher längere Mitochondrien auf (*Abb. 40. u. 41.*), was mit den bereits veröffentlichten Daten zur stressinduzierten Hyperfusion der Mitochondrien korreliert (Tondera et al. 2009). Diese Tendenz wurde sowohl bei den NT als auch bei den KL8 Zellen beobachtet, schien aber bei den PINK1 KD Zellen stärker ausgeprägt zu sein.

Darüber hinaus wurde die Verlängerung der Mitochondrien bei den Zellen mit regulärem Glucose-Gehalt teilweise durch die Aminosäuredeprivation induziert und schien bei 12h und 16h HBSS zurückzugehen, bei 24h HBSS jedoch wieder sichtbar zu werden. Bei den Zellen mit Glucose-Reduktion blieb die Verlängerung der Mitochondrien bis zu dem 16h-Zeitpunkt deutlich, ging dann zurück und trat bei 24h HBSS wieder auf. Infolge der Glucose-Deprivation schien sich also die durch HBSS induzierte Verkürzung der Mitochondrien zu verzögern.

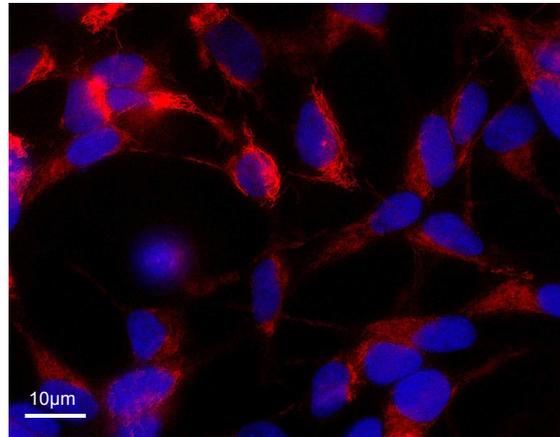
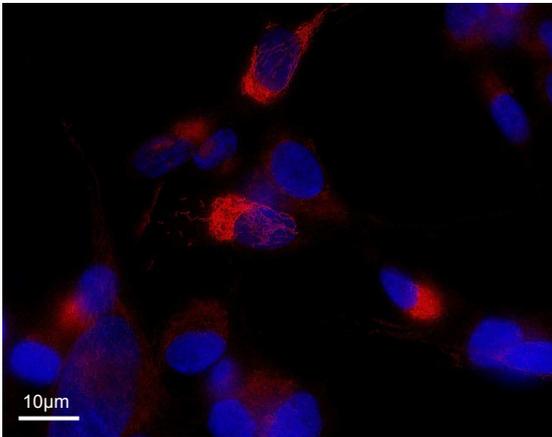
NT [1g/L Glucose]

PINK1 KD KLON 8 [1g/L Glucose]

Ctrl



4h HBSS



8h HBSS

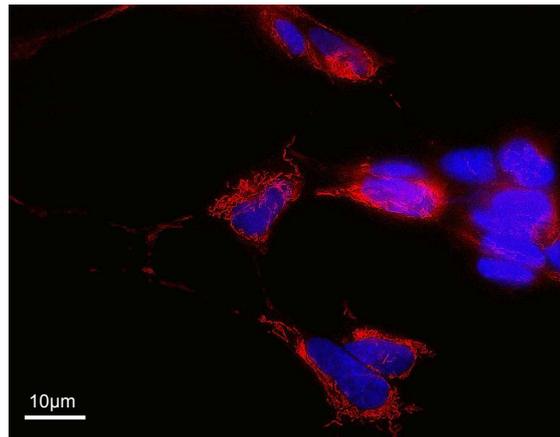
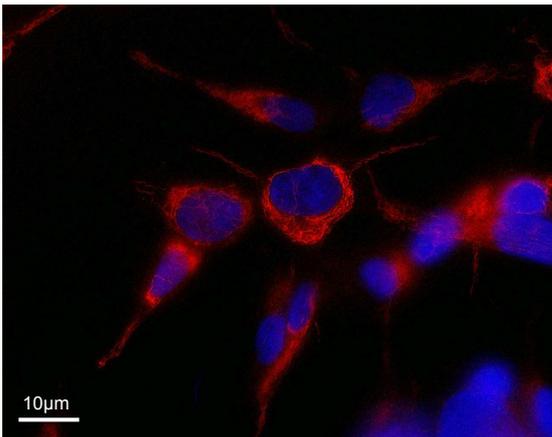
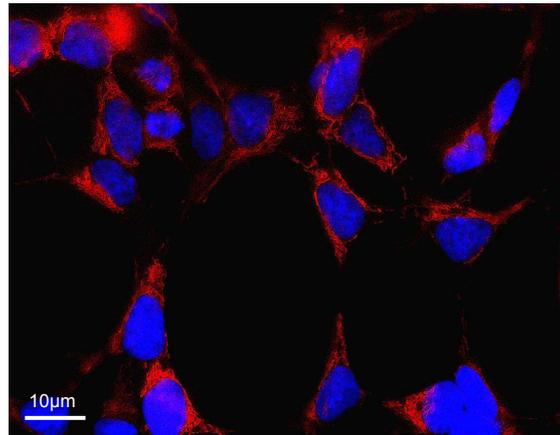
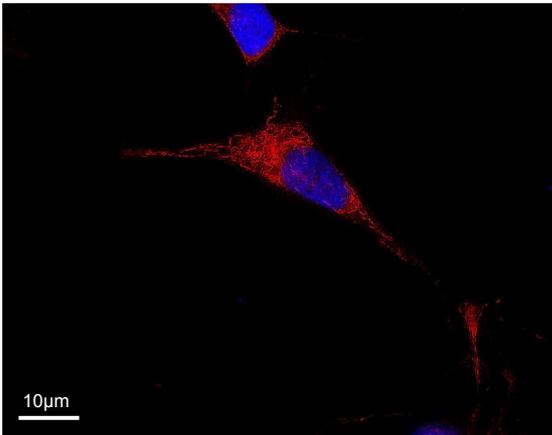


Abb.40: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS und 1g/L Glucose kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 4h und 8h Aminosäurenentzug. Von oben nach unten: Ctrl (kein HBSS); 4h HBSS; 8h HBSS. Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8

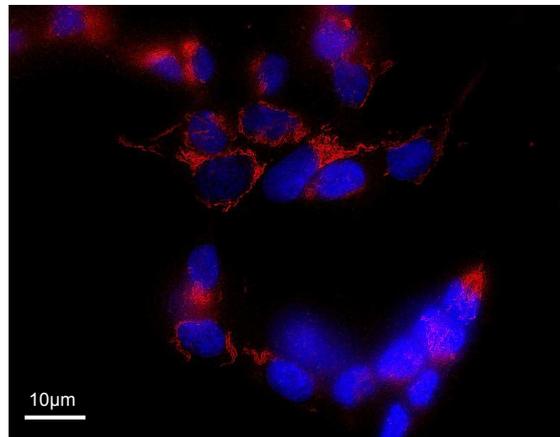
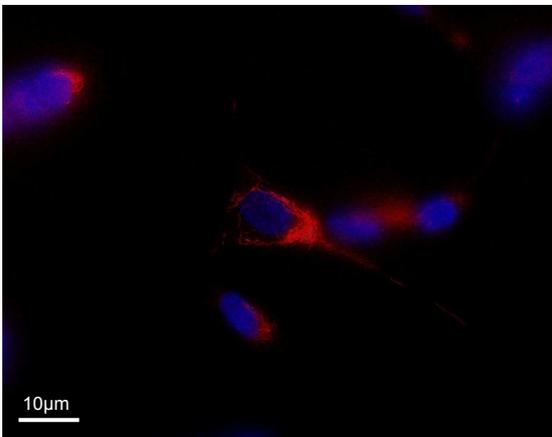
NT [1g/L Glucose]

PINK1 KD KLON 8 [1g/L Glucose]

12h HBSS



16h HBSS



24h HBSS

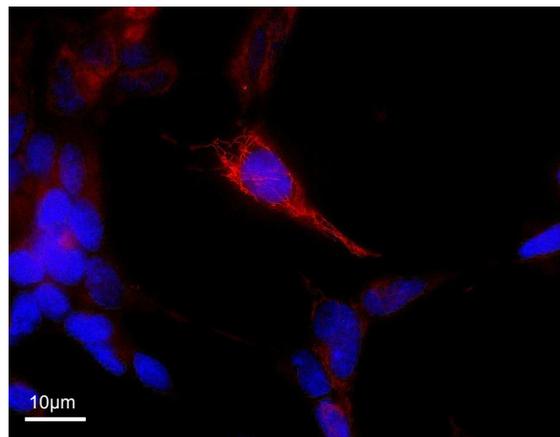
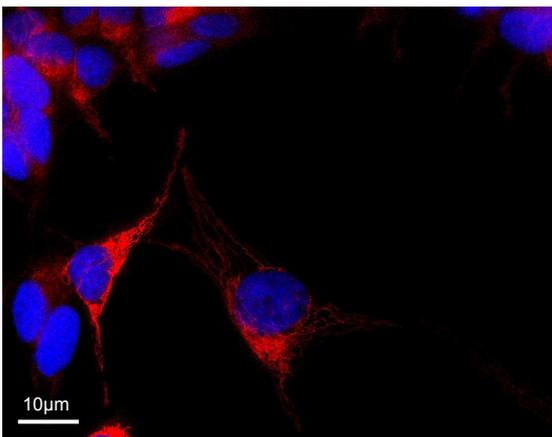


Abb.41: Mitochondriale Morphologie der bei 5% FCS und 1g/L Glucose kultivierten NT und PINK1 KD Klon8 SH-SY5Y Zellen nach 12h, 16h und 24h Aminosäureentzug. Von oben nach unten: 12h, 16h, 24h HBSS. Links: NT; rechts: PINK1 KD Klon8

Abschließend lässt sich sagen, dass der knockdown von PINK1 unabhängig von den Kultivierungsbedingungen (5% oder 10% FCS als Zusatz, Glucose oder Galaktose als Energiequelle im Medium) keine Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie

gezeigt hat. Eine 12h anhaltende Aminosäuredeprivation verursachte eine Verkürzung der Mitochondrien in den NT und PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen, die jedoch bei vorausgehender Reduktion der Glucose im Medium etwas später (bei 16h nach Beginn des Versuches) auftrat. Somit löste die in den PINK1 KD SH-SY5Y Zellen auf der mRNA-Ebene beobachtete Herunterregulierung mitochondrialer Fusions- und Teilungsfaktoren, sowie die verminderte Expression des Fis1-Proteins keine Beeinträchtigung des mitochondrialen Phänotyps in diesen Zellen aus.

Zusammenfassend wiesen die bei Serumdeprivation kultivierten SH-SY5Y PINK1 KD KL8 Zellen neben einem über 8 Monate anhaltenden stabilen knockdown des PINK1 Gens zunächst auch eine signifikant verminderte Expression diverser an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase beteiligten und Autophagie-assoziierten Gene im Vergleich zu korrespondierenden NT Zellen auf (3.1.1.). Die Herunterregulation von dem mitochondrialen "Cristae-organisation" Faktor GHITM, mitochondrialen Fusionsfaktor MFN1, Autophagie-assoziierten Gen LAMP2 und am Vesikeltransport und möglicherweise an der mitochondrialen Dynamik beteiligten α SYNUCLEIN hat sich dabei als besonders stabil erwiesen. Die bezüglich der Genexpression in den KL8 Zellen beobachteten Veränderungen blieben bei einem transienten knockdown von PINK1 in SH-SY5Y und HeLa Zellen aus (3.1.2. u. 3.1.3.). Darüber hinaus konnte das mRNA-Profil der PINK1 KD KL8 Zellen in den kortikalen Neuronen aus PINK1 KO Mäusen weder unter regulären Kulturbedingungen noch bei Aminosäuredeprivation vollständig reproduziert werden (3.1.4.1.). Bezüglich ihrer Genexpression wiesen kortikale Neurone aus PINK1 KO und A53T alpha Synuclein überexprimierenden Mäusen einige signifikante Gemeinsamkeiten mit den KL8 Zellen auf (3.1.4.2.). Auf der Proteinebene wurde in den KL8 Zellen eine signifikante Herunterregulation des mitochondrialen Teilungsfaktors FIS1 ermittelt, wobei die Expression weiterer mitochondrialer Fissionsfaktoren DRP1 und MTP18, der Fusionsfaktoren MFN1 und MFN2, des mitochondrialen Transkriptionsfaktors PGC1 α und des an der Mitophagie beteiligten Parkin unverändert war (3.2.). Dennoch wurde auch bei verschiedenen Kulturbedingungen (5% oder 10% FCS, Galaktose- oder Glukose-haltiges Medium, Aminosäurenentzug) keine Änderung der mitochondrialen Morphologie beobachtet (3.7.). Weiterhin wiesen die KL8 Zellen keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Integrität (3.3.) oder des Zellüberlebens bei H₂O₂-induziertem oxidativem Stress auf (3.4.). Eine leicht verminderte Energieladung dieser Zellen wurde festgestellt (3.5.), die aber von keiner Beeinträchtigung der respiratorischen Aktivität begleitet wurde (3.6.1. u. 3.6.2.). Nach Reduktion der Glukose und anschließender Inkubation in einem Galaktose-haltigen Medium wurde schließlich eine Verringerung der Sauerstoffverbrauchsrate beobachtet (3.6.3.). Somit wurden in den SH-SY5Y

PINK1 KD KL8 Zellen bei trophischem Stress der Serumdeprivation Veränderungen auf der mRNA- und Proteinebene ermittelt, die von keiner Beeinträchtigung der mitochondrialen Form und Funktion oder des Zellüberlebens begleitet wurden.

4. Diskussion und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Rolle des *PARK6* Gens untersucht, welches für die "Phosphatase and Tensin Homolog Induced Putative Kinase 1" (PINK1) kodiert. Mutationen in PINK1 sind ursächlich für die nach dem dazugehörigen Genlocus benannte *PARK6* Form von *Morbus Parkinson*. Dies ist eine autosomal rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung, die insofern etwas atypisch verläuft, dass sie juvenilen Ausbruchs ist, eine milde Progression aufweist und durch Medikamente und DBS (*Deep Brain Stimulation*) noch gut im Griff zu halten ist (Jendrach et al. 2009). Trotzdem beeinträchtigt sie durch bestimmte Symptome oder arzneimittelbedingte Nebenwirkungen wie die Levodopa-induzierte Dyskinesie die Lebensqualität der Patienten (Schneider u. Klein, 2010). Die Erforschung der Rolle von PINK1 könnte dazu beitragen, andere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln oder eine Weise zu finden, den Ausbruch der Krankheit zu verzögern oder im besten Falle zu verhindern.

Die Rolle von PINK1 wurde zunächst anhand von stabil transfizierten SH-SY5Y PINK1 KD Klon8 Zellen mit NT Zellen als Kontrolle untersucht. Bei den Klon8 Zellen wurde bereits beobachtet, dass sie bei Reduktion des Serumgehaltes im Medium eine wesentlich verringerte Proliferation im Vergleich zu den NT Zellen aufweisen (M. Jendrach). Die Serumdeprivation schien also der notwendige Stressfaktor zu sein, welcher zur Auslösung eines PINK1-abhängigen Phänotyps führen konnte. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage, welche anderen PINK1-abhängigen Veränderungen unter Serumentzug zur Ausprägung kommen.

Die Analyse der Genexpression der PINK1 KD KL8 Zellen (3.1.1.) ergab eine signifikante Herunterregulation der mitochondrialen Fissions- und Fusionsfaktoren (MFN1, MFN2, DRP1, FIS1, MTP18, SH3GLB1, GDAP1, MFF), der putativen Substrate von PINK1 (PARKIN, TRAP1) und weiterer Gene, deren Produkte die Form und Funktion der Mitochondrien beeinflussen (MARCH5, GHITM, STOML2). Die beobachteten Veränderungen traten nur bei stabil transfizierten SH-SY5Y PINK1 KD Zellen auf und waren durch eine transiente Transfektion nicht reproduzierbar. Eine Ausnahme dazu war die verminderte Expression von LAMP2. Da dieses Gen darüber hinaus in den stabil transfizierten SH-SY5Y Zellen über 8 Monate herunterreguliert war, könnte es sein, dass LAMP2 besonders empfindlich, aber auch konsistent auf das

Expressionsniveau von PINK1 reagiert, was eine potentielle Bedeutung von LAMP2 als Biomarker vorstellbar macht. Es wurde keine Verringerung der Genexpression der mitochondrialen Protease Omi beobachtet, was mit dem Befund korreliert, dass Omi keine essentielle Komponente des PINK1 / PARKIN Signalwegs darstellt (Yun et al. 2008). Die Ergebnisse zu der Genexpression in den PINK1 KD Klon8 Zellen deuten auf eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Dynamik hin, da die Fusions- und Fissionsfaktoren gleichermaßen betroffen waren. Daher wäre es gut vorstellbar, dass die Zahl der Fissions- und Fusionsereignisse in den chronisch gestressten PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen vermindert ist und dass dabei die Länge der Mitochondrien infolge des nicht veränderten Gleichgewichts zwischen Fusion und Teilung unverändert bleibt. Dies würde mit der unveränderten mitochondrialen Morphologie der Klon8 Zellen (3.7.), sowie mit der verminderten Expression des putativen mitochondrialen Fissionsfaktors α Synuclein korrelieren (Nakamura et al. 2011). Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Fusion- und Teilung kann durch den kombinierten Einfluss des PINK1 Verlustes und der Serumdeprivation erklärt werden. Es gibt Anzeichen dafür, dass PINK1 ein mitochondrialer Fissionsfaktor sein könnte (Deng et al. 2008). Durch den PINK1 KD und die resultierende oben beschriebene Herunterregulation der mitochondrialen Teilungsfaktoren könnte folglich eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Fission zustande kommen, was theoretisch die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Fusion bewirken sollte (Yu et al. 2011). Durch den Stress der Serumdeprivation und die resultierende Verminderung des Energiegehaltes der Zelle könnte die mitochondriale Fusion jedoch eingeschränkt sein, so dass letztendlich beide Aspekte der mitochondrialen Dynamik betroffen sind. Dies würde mit der verminderten Energieladung der Klon8 Zellen korrelieren (3.5.). Diese Frage könnte durch Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien und Quantifizierung der mitochondrialen Fusions- und Teilungsereignisse beantwortet werden. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass auf der Proteinebene soweit nur eine Herunterregulation des mitochondrialen Teilungsfaktors FIS1 beobachtet wurde (3.2.). Im Licht der oben dargestellten Hypothese wäre es denkbar, dass diese durch die Herunterregulation eines Fusionsfaktors kompensiert wird. Allerdings wurde keine verminderte Proteinexpression von MFN1 und MFN2 ermittelt, so dass diese Hypothese unbestätigt bleibt. Ein potentieller Kandidat in dieser Hinsicht wäre das für die Fusion der mitochondrialen Innenmembranen zuständige Opa1.

Weiterhin gab es Anzeichen für eine Störung der Mitophagie in den PINK1 KD KL8 Zellen, da sie eine Herunterregulation der beiden dafür verantwortlichen Gene (PINK1 und PARKIN), sowie des MAP1LC3A zeigten. Dies würde mit den Befunden zu der Induktion der Mitophagie durch PINK1 korrelieren (Matsuda et al. 2010).

Darüber hinaus wäre infolge der verminderten Expression des mitochondrialen Chaperons TRAP1 eine Einschränkung der oxidativen Stressantwort vorstellbar (Montesano et al. 2007), insbesondere da PINK1 als TRAP1-aktivierender Faktor in den KL8 Zellen ebenfalls herunterreguliert war (Pridgeon et al. 2007). Allerdings wurde keine erhöhte Sensitivität der KL8 Zellen gegenüber H₂O₂ induziertem oxidativen Stress (3.4.) und keine Beeinträchtigung der Integrität der mitochondrialen DNA beobachtet (3.3.). Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Erhöhung der Bcl-XL Expression, die laut neuesten Erkenntnissen durch Serumdeprivation induzierten oxidativen Stress hindern kann (Lee et al. 2011). Da Bcl-XL antiapoptotisch wirkt, würde seine Hochregulation auch vor Apoptose infolge von induziertem oxidativem Stress schützen. Dies würde mit den Befunden korrelieren, dass die bei H₂O₂ induziertem oxidativem Stress auftretende Herunterregulation von Bcl-XL in die Beeinträchtigung des Zellüberlebens involviert ist (Singh u. Singh 2008). Für die Klärung dieser Frage wäre eine Analyse der Bcl-XL Expression in den KL8 Zellen empfehlenswert.

Weiterhin wurde eine verminderte Expression von BECLIN, P62, ATG7, MAP1LC3A und LAMP2 in den PINK1 KD KL8 Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse könnten auf eine Beeinträchtigung der Autophagie und der damit eng verbundenen Mitophagie in den chronisch gestressten KL8 Zellen hinweisen, was mit den Publikationen zur Induktion der Autophagie durch PINK1 (Michiorri et al. 2010) und seiner Interaktion mit LC3 in der Mitophagie korreliert (Kawajiri et al. 2010). Darüber hinaus würde eine Beeinträchtigung der Autophagie auch mit der beobachteten Verminderung der SH3GLB1 Expression korrelieren, da dieses Molekül an der Autophagie beteiligt ist (Takahashi et al. 2009).

Da es vorstellbar ist, dass eventuelle PINK1-abhängige Effekte auf die Expression weiterer Gene nicht direkt durch das mitochondrial lokalisierte PINK1 Protein, sondern möglicherweise durch seinen Einfluss auf bestimmte Transkriptionsfaktoren zustande kommen, wurden weiterhin für mitochondriale Transkriptionsfaktoren kodierende Gene untersucht (PGC1 α , PGC1 β , NRF1, NRF2, TFAM). Dabei wurde eine in den PINK1 KD KL8 Zellen unabhängig vom Kultivierungsmodus auftretende Herunterregulation von PGC1 α ermittelt. Darüber hinaus wurden eine signifikant reduzierte Expression von NRF2 und ein Trend zur Hochregulation von NRF1 und TFAM in den bei Serumdeprivation kultivierten PINK1 KD KL8 Zellen festgestellt. Diese Befunde könnten auf eine vom Kultivierungsmodus unabhängige Beeinträchtigung der mitochondrialen Biogenese in den PINK1 KD Zellen hinweisen, die unter Serumdeprivation eventuell durch die Hochregulation von NRF1 und TFAM kompensiert werden könnte (Hood et al. 2006). In den unter

Serumdeprivation kultivierten PINK1 KD Zellen bestehende Verminderung der Genexpression könnte dann auf die Herunterregulation zusätzlicher Transkriptionsfaktoren (z.B. NRF2) zurückzuführen sein, die bei dem regulären Serumgehalt nicht vorkam. Allerdings wurde keine Veränderung in der Proteinexpression von PGC1 α ermittelt, so dass eine eventuelle Beeinträchtigung der mitochondrialen Biogenese eher durch die Herunterregulation der stromabwärts von PGC1 α agierenden Faktoren zustande kommen würde.

Um die physiologischen Bedingungen im Gehirn besser *in vitro* simulieren zu können, wurden die bei 5% FCS kultivierten NT und PINK1 KD KL8 Zellen zusätzlich in einem Medium mit 50%iger Reduktion der Glucose auf 1g/L kultiviert. Die einen Monat nach Umstellung auf das neue Medium durchgeführte Analyse der Genexpression ergab eine etwa vierfache Erhöhung der PINK1-Expression auf 57,8%, sowie eine Hochregulation seiner Interaktionspartner TRAP1 und PARKIN. Die mitochondrialen Fissionsfaktoren DRP1, FIS1, MTP18 und GDAP1 und der mitochondriale Fusionsfaktor MFN2 wurden ebenso wie das Autophagie-assoziierte Gen MAP1LC3A und die an der Regulation der Glykolyse beteiligten FOXO3A und SGK1 hochreguliert. Der mitochondriale Fissionsfaktor SH3GLB1, der mitochondriale Fusionsfaktor MFN1 und das Autophagie-assoziierte LAMP2 blieben dagegen herunterreguliert, wenn auch nicht so stark wie vor der Reduktion der Glucose im Kulturmedium. Folglich blieb die Korrelation zwischen der Expression von PINK1 und der Expression von den restlichen hier aufgeführten Genen in ihrer Tendenz gleich, d.h. die Gene haben auf die hungerstressbedingte Hochregulation von PINK1 entsprechend reagiert. Dies war ein zusätzlicher Beweis dafür, dass PINK1 auf Zellstress reagiert (George et al. 2010), sowie für die PINK1-abhängige Regulation der analysierten Gene. Darüber hinaus hing der Anstieg der Genexpression davon ab, ob die betreffenden Gene auch unabhängig von PINK1 auf den zusätzlichen Hungerstress durch die Glucose-Reduktion reagieren würden. So könnte die starke Hochregulation von MAP1LC3A ein Zeichen dafür sein, dass die PINK1 KD KL8 Zellen durch die Einleitung der Autophagie versucht haben, den aus der Glucose-Reduktion resultierenden Nährstoffmangel zu kompensieren.

Da eines der Ziele dieser Arbeit war, mehr über die physiologische Rolle von PINK1 zu erfahren, wurden weitere PINK1 KD Zellmodelle für die Genexpressionsanalyse herangezogen. Dies machte darüber hinaus möglich, die Reproduzierbarkeit der Befunde aus den PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen in anderen Zellmodellen zu überprüfen und gegebenenfalls Effekte, die in einer neuronalen Zelllinie auftreten, von ubiquitären Effekten abzugrenzen. Diesbezüglich wurden zunächst HeLa Zellen mit einem transienten PINK1 KD analysiert. Festgestellt wurde eine signifikante Hochregulation von SH3GLB1 und MFN1, die wahrscheinlich auf den

Transfektionsstress zurückzuführen ist. Dies ist jedoch das dritte Ergebnis, dass von einer ähnlichen Expression von SH3GLB1 und MFN1 zeugt. Diese beiden Gene waren nämlich in den PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen herunterreguliert und wiesen im Gegensatz zu anderen untersuchten Genen auch nach Reduktion der Glucose im Medium eine verminderte Expression auf. Ferner waren sie auch durch ähnlich hohe mRNA-Spiegel gekennzeichnet. Anhand von diesen Ergebnissen wäre eine Co-Regulation von SH3GLB1 und MFN1 denkbar, die bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen der mitochondrialen Teilung und Fusion eine Rolle spielen könnte. Da HeLa Zellen kein PARKIN exprimieren (Denison et al. 2003) und trotz eines signifikanten PINK1 knockdowns keine Herunterregulation weiterer Parkinson-relevanter Gene aufwiesen, könnte PARKIN als ein stromabwärts von PINK1 wirkender Effektor an der Regulation der Expression dieser Gene beteiligt sein. Dies würde bedeuten, dass die in den PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen beobachteten Veränderungen PARKIN-vermittelt zustande kamen und in den HeLa Zellen nicht reproduzierbar wären. Beispielsweise ist die PARKIN-vermittelte Wirkung von PINK1 in der Mitophagie stark argumentiert (Jin et al. 2010). Diese Frage könnte vielleicht durch eine Einleitung der PARKIN-Expression in den HeLa Zellen beantwortet werden. Andererseits könnte das Fehlen der erwarteten PINK1-abhängigen Effekte auch daran liegen, dass es sich hier um eine transiente Transfektion handelte. Dieses Rätsel könnte durch die Generierung stabil transformierter PINK1 KD HeLa Zellen gelöst werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden kortikale Neurone aus PINK1 KO Mäusen auf Veränderungen in der Genexpression im Vergleich zu WT (Wildtyp) Neuronen überprüft. Dies war von besonderem Interesse, da PINK1 KO Mäuse eine progressive Störung der mitochondrialen Funktion aufweisen (Gispert et al. 2009). Zunächst wurden PINK1 KO Neurone nach unterschiedlicher Kultivierungszeit (14, 20 und 28 DIV) untersucht, wobei vor allem nach Gemeinsamkeiten mit dem mRNA-Profil der PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen gesucht wurde. Diese wurden in geringer Zahl bei den 14DIV Neuronen beobachtet (Herunterregulation von MTP18, GHITM, GDAP1). Allerdings waren diese Beobachtungen mit zunehmender Kultivierungszeit nicht konsistent und folglich konnte das mRNA-Profil der PINK1 KD KL8 Zellen auf diese Weise in den PINK1 KO Neuronen nicht reproduziert werden. Somit scheint die PINK1-abhängige Herunterregulation Parkinson-relevanter Gene bei den PINK1 KO Neuronen keinen progressiven Charakter mit zunehmender Kultivierungszeit aufzuweisen. Das mRNA-Profil der SH-SY5Y PINK1 KD KL8 Zellen konnte in den PINK1 KO Neuronen bei Aminosäuredeprivation zum Teil reproduziert werden, was

die Bedeutung von Zellstress bei der Induktion PINK1-abhängiger Effekte weiter belegt.

Somit war der vorübergehende Stress der Aminosäuredeprivation nicht ausreichend, um die in den SH-SY5Y KL8 Zellen beobachteten PINK1-abhängigen Effekte in den kortikalen Neuronen reproduzieren zu können. Die nächste Frage war, ob sich der chronische Stress des Serumentzuges bei den SH-SY5Y Zellen in den kortikalen Neuronen besser simulieren lässt, etwa durch einen endogenen Stressor, wie z.B. der Überexpression eines mutierten Proteins. Dieser Frage wurde mit Hilfe von PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierenden kortikalen Neuronen nachgegangen. A53T ist eine der drei Punktmutationen in α Synuclein, welche die PARK1 Form von *M. Parkinson* verursachen. Transgene Mäuse mit einer Überexpression des humanen A53T SNCA sind ein Modell für α Synuclein induzierte Neurodegeneration (Gispert et al. 2003) und weisen mitochondriale Defekte auf (u. a. Beeinträchtigung der mitochondrialen DNA; Dawson et al. 2010). In diesen kortikalen Neuronen wurde eine Herunterregulation etlicher Parkinson-relevanter Gene beobachtet. Das einzige hochregulierte Gen war interessanterweise Glo1, was angesichts der Publikation von Williams et al. (PlosOne 2009) jedoch eine Genduplikation als Ursache haben könnte. Somit kamen die kortikalen Neurone aus transgenen PINK1 KO und A53T α Synuclein überexprimierenden Mäusen dem SH-SY5Y PINK1 KD Zellmodell am nächsten. Als offene Frage verbleibt, ob neben dem endogenen Stress weitere exogene Stressoren auf diese Neurone einwirken müssten, um zusätzliche PINK1-abhängige Effekte zur Ausprägung zu bringen. So würden sich diese kortikalen Neurone als nützliches Zellmodell bieten, um die kombinierte Wirkung von chronischem und transientem Stress auf die Zellphysiologie zu erforschen. Allerdings müsste dabei beachtet werden, dass die PINK1-abhängigen Effekte von den durch die Überexpression von A53T SNCA entstehenden Folgen abgegrenzt werden.

Über die Regulation der mitochondrialen Atmung durch PINK1 wurde bereits berichtet (Liu et al. 2011). Weiterhin wurde ermittelt, dass die für PARK6 *M. Parkinson* kausalen Mutationen in PINK1 die Aktivität von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette beeinträchtigen (Morais et al. 2009, Amo et al. 2011). Daher war die Untersuchung der respiratorischen Aktivität der PINK1 KD KL8 SH-SY5Y Zellen ein unerlässlicher Ansatz. Die Versuche wurden mit dem XF24 Analyser von Seahorse Bioscience durchgeführt (Akos et al. 2009), wobei Oligomycin, FCCCP (CCCP) und Rotenon zur Analyse bestimmter Aspekte der mitochondrialen Atmung eingesetzt wurden. In mehreren unabhängigen Ansätzen wurde keine Verringerung der Sauerstoffverbrauchsrate bei den PINK1 KD KL8 Zellen im Vergleich zu den entsprechenden NT Zellen ermittelt (3.6.). Ferner wurde keine Beeinträchtigung der

respiratorischen Aktivität der PINK1 KD KL8 Zellen bei variierender Zusammensetzung des Kulturmediums beobachtet (5% oder 10% FCS als Zusatz; 1g/L oder 2g/L Glucose). Darüber hinaus war die Ansäuerung im Medium (ECAR) bei den NT und KL8 Zellen gleich, was bedeutet, dass die PINK1 KD Zellen auch keine Steigerung (oder Beeinträchtigung) der Glykolyse zeigen. Dabei ist zu beachten, dass Seahorse Bioscience bei einer ECAR-Messung $\leq 1\%$ FCS im Medium empfiehlt, da FCS eine gewisse Pufferkapazität besitzt, welche die Messung beeinflussen kann. Allerdings wurden die Zellen vor der Messung mit FCS-freiem Grundmedium gewaschen und inkubiert, so dass die Wahrscheinlichkeit einer technischen Beeinträchtigung der Messwerte an dieser Stelle gering ist. Für künftige Versuche empfiehlt es sich, die Pufferkapazität des Mediums zu beachten und, um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten, entweder in den Analyzer einzuprogrammieren oder bei der Analyse der generierten Messwerte zu berücksichtigen.

Zur Steigerung der mitochondrialen Respiration wurden die bei 5% FCS kultivierten Zellen für 24h in einem Galaktose-Medium inkubiert (Amo et al. 2011). Daraufhin wurde beobachtet, dass die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) bereits nach der Injektion des Grundmediums RPMI stark gesunken war und sich danach nicht mehr erholt hatte. Die OCR war in dem Fall bei den NT Zellen doppelt so hoch wie bei den PINK1 KD KL8 Zellen. In diesem Ansatz wurden die Zellen nicht nur in einem Galaktose-haltigen Medium inkubiert, sondern auch eine Stunde vor der Messung mit Glucose-freiem RPMI gewaschen und anschließend mit der doppelten Menge an Inhibitoren behandelt. Die resultierenden Befunde lassen vermuten, dass dieses Vorgehen für die Zellen überwältigend war, so dass sie höchstwahrscheinlich nach dem ersten darauffolgenden Stressereignis (Injektion des RPMI) apoptotisch wurden. Obwohl das erwähnte Ergebnis demzufolge keine Auskunft über die respiratorische Aktivität der NT und PINK1 KD KL8 Zellen gibt, würde es zeigen, dass die KL8 Zellen unter bestimmten Umständen schlechter als NT Zellen mit Zellstress umgehen können und schneller in die Apoptose gehen. Um diese Frage zu klären, wären weitere respirometrische Messungen notwendig, wobei allerdings aus der vorigen Erfahrung zu beachten ist, dass die Zellen nur bedingtem Stress auszusetzen sind, solange der Versuchsansatz nicht etwas anderes vorsieht.

Abschließend lässt sich sagen, dass stabil transformierte PINK1 KD SH-SY5Y Zellen bei Serumdeprivation eine konsistente über mehrere Monate anhaltende Herunterregulation von PINK1 aufweisen und daher ein gutes Zellmodell für die Erforschung langfristiger Effekte einer verminderten PINK1-Expression auf die Zellphysiologie darstellen. Allerdings treten die genannten Effekte nicht spontan auf, sondern eher im Kontext des Zellüberlebens in einer dynamischen, sich ständig

verändernden Umgebung, die durchaus auf die Zellen negativ einwirken kann. Ebenso wie Zellstress in die Auslösung des genetisch bedingten, aber erst später im Laufe des Lebens auftretenden PARK6 *M. Parkinson* involviert sein sollte, scheint er auch *in vitro* die treibende Kraft zu sein, welche die durch den Verlust von PINK1 bedingten Nachteile zur Ausprägung kommen lässt. Für die weitere Arbeit mit dem PINK1 KD SH-SY5Y Zellmodell wird es vor allem wichtig sein nachzuvollziehen, inwiefern sich die verminderte mRNA-Expression des PINK1 auf seine Proteinexpression auswirkt, und den Einfluss verschiedener Stressoren auf die Physiologie der stabil transfizierten Zellen auszutesten. Angesichts des Verlustes von dopaminergen Neuronen in *M. Parkinson* wird es bedeutsam sein, die Umstände nachzuvollziehen, bei denen in einem Zellmodell die Nachteile des PINK1 knockdowns überwiegen und das Zellüberleben nicht mehr gewährleistet werden kann. Einmal geklärt, würde dies eventuell eine Eingriffsmöglichkeit erkennen lassen, die letztendlich die Funktionalität der Zelle erneuern könnte, so dass sie ihr gestellte Hindernisse überwinden und überleben kann.

5. Literaturverzeichnis

- Akundi RS, Huang Z, Eason J, Pandya JD, Zhi L, Cass WA, Sullivan PG, Büeler H. (2011): Increased mitochondrial calcium sensitivity and abnormal expression of innate immunity genes precede dopaminergic defects in Pink1-deficient mice. *PLoS One*. 6(1):e16038.
- Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B (1997): Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69, 1196-1203
- Albanese A, Valente EM, Romito LM, Bellacchio E, Elia AE, Dallapiccola B. (2005): The PINK1 phenotype can be indistinguishable from idiopathic Parkinson disease. *Neurology*. 64(11):1958-60.
- Aliev G, Li Y, Palacios HH, Obrenovich ME. (2011): Oxidative Stress Induced Mitochondrial DNA Deletion as a Hallmark for the Drug Development in the Context of the Cardiovascular Diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. [Epub ahead of print]
- Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. (2011): Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol Dis*. 41(1):111-8.
- Applied Biosystems (2008): StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems. 4376785, Rev. E
- Arduíno DM, Esteves AR, Cardoso SM. (2011): Mitochondrial fusion/fission, transport and autophagy in Parkinson's disease: when mitochondria get nasty. *Parkinsons Dis*. 2011:767230.
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N (2010): Opposing Function of Mitochondrial Prohibitin in Aging. *Aging* 2(12):1004-1011
- ATCC (August 2011):
<http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2266&Template=cellBiology>
- Auburger Georg, Kurz Alexander (2011): The role of glyoxalases for sugar stress and aging, with relevance for dyskinesia, anxiety, dementia and Parkinson's disease. *Aging* Vol.3, No.1, 5-9.
- Batty E, Jensen K, Freemont P (2009): PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Frontiers in Bioscience* 14, 1182-1196

- Bereiter-Hahn J, Jendrach M (2010): Mitochondrial dynamics. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 284, pp. 1-65.
- Benard G, Karbowski M (2009): Mitochondrial fusion and division: regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol.* 20(3):365-374.
- Busch KB, Bereiter-Hahn J, Wittig I, Schagger H, Jendrach M. (2006): Mitochondrial dynamics generate equal distribution but patchwork localization of respiratory Complex I. *Mol Membr Biol.* 23(6):509-20.
- Cherra SJ 3rd, Dagda RK, Chu CT. (2010): Review: Autophagy and neurodegeneration: survival at a cost? *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36, 125-132.
- Chu Charleen T. (2011): Diversity in the Regulation of Autophagy and Mitophagy: Lessons from Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* 789431
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M (2006): *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441(7097):1162-6.
- Costa RA, Romagna CD, Pereira JL, Souza-Pinto NC. (2011): The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr.* 43(1):25-9.
- Cui T, Fan C, Gu L, Gao H, Liu Q, Zhang T, Qi Z, Zhao C, Zhao H, Cai Q, Yang H (2011): Silencing of PINK1 induces mitophagy via mitochondrial permeability transition in dopaminergic MN9D cells. *Brain Research*, 1394:1-13.
- Dagda RK, Slavatore CJIII, Kulich SM, Anurag T, Park D, Chu CT (2009): Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. *Journal of Biological Chemistry* Vol.284, No.20, pp.13843-13855.
- Dawson TM, Ko HS, Dawson VL (2010): Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron Review* DOI 10.1016/j.neuron.2010.04.034
- Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S, Desmond H, Kjaer S, Loh SH, Renton AE, Harvey RJ, Whitworth AJ, Martins LM, Abramov AY, Wood NW. (2011): PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet.* 20(5):867-79.
- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. (2008): The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(38):14503-8.
- Denison SR, Wang F, Becker NA, Schüle B, Kock N, Phillips LA, Klein C, Smith DI. (2003): Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. *Oncogene.* 22(51):8370-8.

- 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(45):12413-8.
- Gautier CA, Kitada T, Shen J (2008): Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *PNAS*, Vol. 105, 11364-11369
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. (2010): Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet.* 19(24):4861-70.
- Gegg ME, Cooper JM, Schapira AH, Taanman JW. (2009): Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. *PLoS One.* 4(3):e4756.
- GENATLAS (August 2011): <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr>
- George S, Mok SS, Nurjono M, Ayton S, Finkelstein DI, Masters CL, Li QX, Culvenor JG. (2010): α -Synuclein transgenic mice reveal compensatory increases in Parkinson's disease-associated proteins DJ-1 and parkin and have enhanced α -synuclein and PINK1 levels after rotenone treatment. *J Mol Neurosci.* 42(2):243-54.
- Gerencser AA, Neilson A, Choi SW, Edman U, Yadava N, Oh RJ, Ferrick DA, Nicholls DG, Brand MD. (200): Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal Chem.* 81(16):6868-78.
- Gispert S, Del Turco D, Garrett L, Chen A, Bernard DJ, Hamm-Clement J, Korf HW, Deller T, Braak H, Auburger G, Nussbaum RL (2003) Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol Cell Neurosci.* 24(2):419-29.
- Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, Voos W, Leuner K, Müller WE, Kudin AP, Kunz WS, Zimmermann A, Roeper J, Wenzel D, Jendrach M, García-Arencibia M, Fernández-Ruiz J, Huber L, Rohrer H, Barrera M, Reichert AS, Rüb U, Chen A, Nussbaum RL, Auburger G (2009): Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PlosOne* 4(6):e5777.
- Glick D, Barth S, Macleod KF (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221: 3-12.

- Hoepken HH, Gispert S, Azizov M, Klinkenberg M, Ricciardi F, Kurz A, Morales-Gordo B, Bonin M, Riess O, Gasser T, Kögel D, Steinmetz H, Auburger G. (2008): Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp Neurol.* 212(2):307-13.
- Holtzhauer Martin (2006): *Biochemische Labormethoden.* Springer Verlag Berlin Heidelberg. Kap. 2.5.3, S.68-70.
- Hood D, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM (2006): Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2265-2275.
- Huang H, Frohman M (2009): Lipid Signaling on the Mitochondrial Surface. *Biochim Biophys Acta* 1791(9):839-844.
- Izumi Y, Kume T, Akaike A. (2011): Regulation of dopaminergic neuronal death by endogenous dopamine and proteasome activity. *Yakugaku Zasshi.* 131(1):21-7.
- Jendrach M, Gispert S, Ricciardi F, Klinkenberg M, Schemm R, Auburger G (2009): The mitochondrial kinase PINK1, stress response and Parkinson`s disease. *J Bioenerg Biomembr* DOI 10.1007/ s10863-009-9256-0
- Jendrach M, Mai S, Pohl S, Vöth M, Bereiter-Hahn J. (2008): Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion.* 8(4):293-304.
- Jendrach M, Pohl S, Vöth M, Kowald A, Hammerstein P, Bereiter-Hahn J. (2005): Morpho-dynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells. *Mech Ageing Dev.* 126(6-7):813-21.
- Ježek P, Hlavata LP. (2009): Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation and hypoxia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1790-1804.
- 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.* 191(5):933-42.
- Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. (2007): The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol.* 178(1):71-84.
- Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, Hattori N. (2010): PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett.* 584(6):1073-9.

- Kessler KR, Hamscho N, Morales B, Menzel C, Barrero F, Vives F, Gispert S, Auburger G. (2005): Dopaminergic function in a family with the PARK6 form of autosomal recessive Parkinson's syndrome. *J Neural Transm.* 112(10):1345-53.
- Khatri S, Yepiskoposyan H, Gallo CA, Tandon P, Plas DR. (2010): FOXO3a regulates glycolysis via transcriptional control of tumor suppressor TSC1. *J Biol Chem.* 285(21):15960-5.
- Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, Kitada T, Kim JM, Chung J. (2008): PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(3):975-80.
- Klinkenberg M, Thurow N, Gispert S, Ricciardi F, Eich F, Prehn JH, Auburger G, Kögel D. (2010): Enhanced vulnerability of PARK6 patient skin fibroblasts to apoptosis induced by proteasomal stress. *Neuroscience.* 166(2):422-34.
- Koh H, Chung J (2010): PINK1 and Parkin to control mitochondria remodeling. *Anatomy and Cell Biology* 43(3):179-84.
- Kurz A, Rabbani N, Walter M, Bonin M, Thornalley P, Auburger G, Gispert S. (2011): Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress. *Cell Mol Life Sci.* 68(4):721-33.
- Lang F, Görlach A, Vallon V. (2009): Targeting SGK1 in diabetes. *Expert Opin Ther Targets.* 13(11):1303-1311
- Lee SB, Kim HJ, Shin J, Kang ST, Kang S, Yoo YD. (2011): Bcl-XL prevents serum deprivation-induced oxidative stress mediated by Romo1. *Oncol Rep.* 25(5):1337-42. doi: 10.3892/or
- Liu W, Acín-Peréz R, Geghman KD, Manfredi G, Lu B, Li C. (2011): Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(31):12920-4.
- Lutz AK, Exner N, Fett ME, Schlehe JS, Kloos K, Lämmermann K, Brunner B, Kurz-Drexler A, Vogel F, Reichert AS, Bouman L, Vogt-Weisenhorn D, Wurst W, Tatzelt J, Haass C, Winklhofer KF. (2009): Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem.* 284(34):22938-51.
- Mai S, Klinkenberg M, Auburger G, Bereiter-Hahn J, Jendrach M (2010): Decreased Expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *Journal of Cell Science* 123, 917-926
- Marongiu R, Brancati F, Antonini A, Ialongo T, Ceccarini C, Scarciolla O, Capalbo A, Benti R, Pezzoli G, Dallapiccola B, Goldwurm S, Valente EM.

- (2007): Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum. *Hum Mutat.* 28(1):98.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K. (2010): PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol.* 189(2):211-21.
 - Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, Selkoe DJ, Lemberg MK. (2011): The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J Neurochem.* 117(5):856-67. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07253.
 - 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.
 - Montesano Gesualdi N, Chirico G, Pirozzi G, Costantino E, Landriscina M, Esposito F. (2007): Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress.* 10(4):342-50.
 - 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.
 - Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami J, Yamada H, Kataoka K, Huh NH. (2011): A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via mTORC2. *J Biol Chem.* 286(9):7182-9.
 - Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, Skibinski G, Levy JM, Egami K, Munishkina L, Zhang J, Gardner B, Wakabayashi J, Sesaki H, Cheng Y, Finkbeiner S, Nussbaum RL, Masliah E, Edwards RH. (2011): Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 286(23):20710-26.
 - NCBI (August 2011): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
 - Pallanack LJ (2010): Culling sick mitochondria from the herd. *J. Cell Biol.* Vol 191, No.7, 1225-1227

- Pankratz Nathan D (2010): Parkinson Disease Overview. GeneReviews PMID: 20301402.
- Papa S, Sardanelli AM, Capitanio N, Piccoli C. (2009): Mitochondrial respiratory dysfunction and mutations in mitochondrial DNA in PINK1 familial parkinsonism. *J Bioenerg Biomembr.* 41(6):509-16.
- Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS (2010): Reactive Oxygen Species: Stuck in the Middle of Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer`s Disease* 20, S357-S367.
- 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
- Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L. (2007): PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol.* 5(7): e172.
- Puigserver P (2005): Tissue-specific regulation of metabolich pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α (*International Journal of Obesity* 29, S5-S9).
- Rakovic A, Grünewald A, Kottwitz J, Brüggemann N, Pramstaller PP, Lohman K, Klein C (2011): Mutations in PINK1 and Parkin Impair Ubiquitination of Mitofusins in Human Fibroblasts. *PlosOne*, Vol.6, e16746
- Rehm Hubert u. Letzel Thomas (2010): *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 6. Auflage, Kap 1.3, S. 8-13; Kap. 1.6, S. 25-31.
- Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. (2006): Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet.* 38(10):1184-91.
- Richter Gerhard (2003): *Praktische Biochemie.* Georg Thieme Verlag, Kap. 4.4.2, S.89-90.
- Sämman J, Hegemann J, von Gromoff E, Eimer S, Baumeister R, Schmidt E. (2009): *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 284(24):16482-91.
- Santos J, Mandavilli B, Van Houten B (2002): Measuring Oxidative mtDNA Damage and Repair Using Quantitative PCR. *Methods in Molecular Biology*, Vol 197, S. 159-176

- Schapira A, Gegg M (2011): Mitochondrial Contribution to Parkinson's Disease Pathogenesis. *Parkinson's Disease*, Article ID 159160, 7 pages.
- Schneider SA, Klein C (2010): *PINK1* Type of Young-Onset Parkinson Disease. *GeneReviews*, PMID: 20301792.
- Seahorse Bioscience XF24 Extracellular Flux Analyzer and Prep Station Installation and Operation Manual (2009), Version 1.5.
- Singh M, Singh N. (2008): Induction of apoptosis by hydrogen peroxide in HPV 16 positive human cervical cancer cells: involvement of mitochondrial pathway. *Mol Cell Biochem.* 310(1-2):57-65.
- Sklar FH, McKee KL (1984): Adenylate Energy Charge (AEC) Response to Stress and Extraction Technique in the Louisiana Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 33:584-591.
- Spielmann H, Jacob-Müller U, Schulz P. (1981): Simple Assay of 0.1-1.0 pmol of ATP, ADP and AMP in Single Somatic Cells Using Purified Luciferin Luciferase. *Analytical Biochemistry* 113, 172-178.
- Takahashi Y, Meyerkord CL, Wang HG (2009): Bif-1/Endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ.* 16(7):947-955
- Thomas B, Beal MF (2007): Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, Vol.16, R183-194
- Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C, Ehses S, Krause F, Chan DC, Alexander C, Bauer C, Youle R, Langer T, Martinou JC. (2009): SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28(11):1589-600
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. (2004): Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science.* 304(5674):1158-60.
- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR. (2004): *PINK1* mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 56(3):336-41.
- Vives-Bauza C, Przedborski S. (2010): Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 17(3):158-65.
- Westermann Benedikt (2010): Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol. 11: 872-884

- Williams R 4th, Lim JE, Harr B, Wing C, Walters R, Distler MG, Teschke M, Wu C, Wiltshire T, Su AI, Sokoloff G, Tarantino LM, Borevitz JO, Palmer AA. (2009): A common and unstable copy number variant is associated with differences in Glo1 expression and anxiety-like behavior. PLoS One. 4(3):e4649.
- Xie H, Hu L, Li G. (2010): SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson`s disease. Chin Med J 123(8):1086-1092.
- Xie Y, Noble S, Ekker M (2011): Modeling Neurodegeneration in Zebrafish. Curr Neurol Neurosci Rep 11:274-282.
- Youle RJ, Narendra DP (2011): Mechanisms of mitophagy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Vol.12: 9-14
- Yu W, Sun Y, Guo S, Lu B. (2011): The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. Hum Mol Genet. 20(16):3227-40.
- Yun J, Cao JH, Dodson MW, Clark IE, Kapahi P, Chowdhury RB, Guo M. (2008): Loss-of-function analysis suggests that Omi/HtrA2 is not an essential component of the PINK1/PARKIN pathway in vivo. J Neurosci. 28(53):14500-10.
- 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(33):12022-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlich bei Prof. Dr. Georg Auburger für die Gelegenheit bedanken, meine Diplomarbeit auf dem aufregenden Gebiet der Parkinson-Forschung verfassen zu dürfen, sowie für die dabei erwiesene Unterstützung und Betreuung. Ein großer Dank ergeht auch an Prof. Dr. Enrico Schleiff aus dem Institut für molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt für die Begutachtung meiner Arbeit und die vielen konstruktiven Vorschläge bei ihrer Verfassung.

Ferner möchte ich mich bei Marthe Chimi aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Brandt am Gustav-Embden Zentrum der Biologischen Chemie der Uni-Klinik Frankfurt, sowie bei Berit Langer aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Stelzer am Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft der Universität Frankfurt und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Osiewacz am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt, insbesondere bei Dr. Andrea Hamann, für die gute Kooperation bedanken.

Ein herzlicher Dank ergeht an alle Mitarbeiter im Arbeitskreis Auburger für ihre Hilfsbereitschaft, gute Stimmung und die Schaffung einer angenehmen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich besonders herzlich bei PD Dr. Marina Jendrach für ihre durchgehende Unterstützung und Betreuung in den experimentellen und theoretischen Aspekten dieser Diplomarbeit bedanken. Frau Jendrach war jederzeit ansprechbar und durch ihre Kreativität und Freude an der Arbeit für mich als angehende Wissenschaftlerin ein großes Vorbild.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere bei meiner Mutter Ljiljana und meinem Bruder Denis, deren unschätzbare Unterstützung mein Studium und folglich diese Diplomarbeit ermöglicht hat.

Vielen Dank!

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 19.09.2011

Dajana Parganlija